



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme MANON OLIOT

le mardi 30 mai 2017

Titre :

Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes

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

MME MARIE LINE DELIA

Rapporteurs :

M. FRANÇOIS LAPICQUE, UNIVERSITÉ LORRAINE

Mme ELISABETH LOJOU, AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Membre(s) du jury :

M. GERARD MERLIN, INP DE GRENOBLE, Président

M. ALAIN BERGEL, INP TOULOUSE, Membre

Mme ANNETTE MOSDALE, PAXITECH SA, Membre

Mme MARIE LINE DELIA, INP TOULOUSE, Membre

Remerciements

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

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse, Alain Bergel et Marie-Line Délia. Merci de m'avoir confié ce sujet passionnant et enrichissant tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci à vous deux pour votre confiance et votre soutien inconditionnel au cours de ce projet. Votre méthode de management a finalement porté ses fruits ☺ ! Merci Alain pour ton éternelle bonne humeur et ta « positive attitude ». Merci Marie-Line pour ta gentillesse et tes conseils avisés. Je n'oublie pas le reste de l'équipe : je remercie Luc Etcheverry pour son aide sans faille sur la partie technique et cela toujours avec le sourire ; Régine Basséguy pour la partie impédance, pour sa bienveillance et son oreille attentive en toutes circonstances, merci pour ces discussions sur la vie en général ; Benjamin Erable pour ses conseils et son humour ! Merci à tous pour ces trois années passées trop rapidement à mon goût ! Peut-être aurons-nous l'occasion de tous nous retrouver pour manger à la terrasse de *Maccheroni* à Rome ?!

Je tiens également à remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner ces travaux de thèse. Merci à Elisabeth Lojou et François Lapicque d'avoir été les rapporteurs. Je remercie également Annette Mosdale et Gérard Merlin d'avoir accepté le rôle d'examineurs.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant contribué à la réalisation de ces travaux : l'ensemble des membres du projet Bioelec pour les discussions enrichissantes et cela toujours dans la bonne humeur ; tous les membres du département Biosym ; Marie-Line de Solan pour les images MEB ; Sophie Pécastaings et Alexis Simons pour l'extraction d'ADN ; l'atelier du LGC qui a confectionné la majorité de mes prototypes et sans qui mes piles n'auraient jamais vu le jour. Je remercie également l'ensemble du personnel administratif et en particulier Alain Philippe pour son éternel dévouement à la vie du laboratoire et pour son aide précieuse pour la préparation de mon repas de thèse. J'ai également une pensée pour mes collègues d'avenant d'enseignement de l'ENSAT avec qui je garde un excellent souvenir du module de vinification !

Un énorme merci également à mes chers collègues et amis du laboratoire avec qui j'ai créé des liens forts et sans qui ces trois années n'auraient pas été aussi remplies de joie. Une pensée particulière pour Célestine, Elise et Ingrid avec qui nous formons le quatuor infernal de La Galante Cotonnerie ☺ merci pour votre soutien incontestable pendant ces trois années et je l'espère bien plus encore ! Merci aux nouveaux arrivés comme aux plus anciens : Mickael, Yan, Bia, Coline, Alex, Freddy, Polo, Silvia, Mehran, Laeticia C., Binta, Pierre C., Pierre A., Poe, Emma, Nadège, Rémi, Refka, Pedro, Leticia, Loren, Lucas, Fatine, Omar, ... Vous allez me manquer !

Je ne peux oublier tous mes amis proches ou lointains : mes amis toulousains et en particulier Julie et Jérôme pour leur soutien inconditionnel dans toutes les épreuves de la vie, mes coéquipières de basket de l'UVBN (c'est long !). Merci également à tous mes amis nancéens, grenoblois, basketteurs, ingénieurs ou amis du lycée, les périodes sans se voir sont souvent trop longues mais l'important est de toujours se retrouver comme au premier jour... alors MERCI d'être toujours présents ! Je n'oublie pas Ludovica, mon amie italienne ! Je suis également très heureuse d'avoir participé au concours de « Ma thèse en 180 secondes », ce fut une expérience extraordinaire qui m'a permis d'apprendre beaucoup sur moi-même et de rencontrer de superbes personnalités.

Je souhaite adresser un merci tout particulier à Jean François Portha, Claire et Olivier Cuisinier ainsi qu'à Fanny Martin pour leurs conseils et ces longues discussions qui m'ont encouragé à me lancer dans cette belle aventure qu'est la thèse. Je ne regrette rien !

Mes remerciements se tournent enfin vers ma famille. Je remercie de tout mon cœur mes grands-parents, Maria-Pia et Louis, alias les Pilous, leur force et leur joie de vivre m'épateront toujours. Je remercie également mes parents, Muriel et Dominique, pour leur confiance et leur soutien éternel, et enfin mon frère Valentin, mon exemple de toujours. Je vous aime et j'ai de la chance de vous savoir près de moi en toutes circonstances.

Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes

Résumé

Une Pile à Combustible Microbienne (PCM) convertit l'énergie chimique issue de l'oxydation de la matière organique directement en énergie électrique. L'oxydation du combustible est assurée par un biofilm dit « électroactif » se développant à la surface de l'anode et jouant le rôle de catalyseur microbien. L'anode microbienne formée à partir d'un consortium bactérien, issu dans cette étude de terreau de jardin, est associée à une cathode à air abiotique à la surface de laquelle se produit la réduction de l'oxygène.

L'assemblage d'une anode microbienne et d'une cathode à air abiotique pour construire une PCM est un réel challenge tant les conditions optimales de chacune sont différentes. Ces travaux de thèse ont donc pour objectif d'anticiper le fonctionnement global de la PCM pour concevoir une anode microbienne et une cathode abiotique capables de fonctionner ensemble de façon optimale. Une partie expérimentale conséquente vise à concevoir une PCM optimale en menant des essais sur différents designs de réacteur. Un modèle numérique, basé sur l'expérimentation et calculant les distributions secondaires de courant et de potentiel au sein de la PCM, vient compléter l'étude expérimentale afin d'optimiser l'architecture de la PCM et maximiser les performances délivrées.

La configuration « Assemblage Séparateur-Electrodes » consiste à intercaler le séparateur entre la bioanode et la cathode à air dans le but de diminuer la résistance interne du système. Ce design a permis de concevoir des PCMs délivrant d'excellentes performances jusqu'à 6.42 W.m^{-2} . In fine, le prototype « Bioelec », utilisé comme modèle de démonstration, est réalisé à l'échelle du laboratoire avec un assemblage en série et en parallèle de plusieurs PCMs élaborées avec cette configuration « ASE ».

Mots-clés : Pile à combustible microbienne ; Ingénierie bioélectrochimique ; Anode microbienne ; Distribution de potentiel ; Extrapolation ; Assemblage séparateur électrodes.

Bio-engineering for microbial fuel cells

Abstract

A Microbial Fuel Cell (MFC) can convert the chemical energy contained in low-cost organic matter directly into electrical energy. The oxidation of organic matter is performed by a biofilm known as "electroactive" that develops on the anode surface and acts as a microbial catalyst. The microbial anode, formed from indigenous bacteria of compost leachate, is combined with an abiotic air-cathode catalyzing the reduction of oxygen.

The association of a bioanode and an abiotic air-cathode in an MFC is a major challenge as their optimal conditions are so divergent. The purpose of this PhD work is to anticipate the global mechanisms of an MFC in order to develop a microbial anode and an abiotic air-cathode able to operate together in an optimal way.

A consequent experimental part aims to develop an optimal MFC by carrying out tests on several reactor designs. A numerical model, based on the experimental results, calculates the secondary distributions of current and potential in the cell. The model supports the experimental study and is used to optimize the MFC architecture and maximize the delivered performances.

The configuration "Separator-Electrodes Assembly" consists of sandwiching the separator between the bioanode and the air-cathode in order to decrease the internal resistance of the system. This design provided excellent results as MFCs delivered great power densities up to 6.42 W.m^{-2} . Finally, a prototype "Bioelec", used as a demonstrative model, was built with several MFCs connected in series or in parallel, each of them designed with the "ASE" configuration.

Keywords : Microbial fuel cells ; Bioelectrochemical engineering ; Microbial anode ; Potential distribution ; Scale-up ; Separator electrodes assembly.

Sommaire

Sommaire

Nomenclature.....
11 Introduction générale
.....15	
<u>CHAPITRE 1 : Bibliographie.....</u>	<u>21</u>
1. Un peu d'histoire	23
2. Pile à combustible microbienne (PCM)	23
2.1. Principe de base	23
2.2. L'anode microbienne	24
2.2.1. Mécanismes de transfert électronique	24
2.2.2. Substrats.....	25
2.2.3. Matériaux supports	26
2.3. La cathode	26
2.4. Développement de la technologie pile à combustible microbienne	27
3. Transport ionique dans les piles à combustible microbiennes	28
3.1. Limitations dans une pile à combustible microbienne	29
3.1.1. L'électrolyte.....	30
3.1.2. La bioanode	30
3.1.3. La cathode à air abiotique	30
3.2. Séparateurs dans une pile à combustible microbienne.....	31
<u>CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes - Approche expérimentale.....</u>	<u>83</u>
1. Inoculum et milieu.....	85
1.1. Inoculum	85
1.2. Milieu synthétique.....	85
2. Dispositifs expérimentaux.....	86
2.1. Electrodes.....	86
2.1.1. Anode	86
2.1.2. Cathode	87
2.1.3. Electrode de référence.....	87
2.1.4. Contre-électrode	87
2.2. Réacteurs électrochimiques	87

2.2.1. Réacteurs électrochimiques « standards »	87
2.2.2. Réacteurs électrochimiques de pile à combustible microbienne	88
3. Techniques d'analyses	89
3.1. Méthodes électrochimiques	89
3.1.1. Chronoampérométrie.....	90
3.1.2. Voltammétrie cyclique	90
3.1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique	91
3.2. Montages d'étude de piles à combustible microbiennes	91
3.3. Dosage enzymatique de l'acétate	93
3.4. Observation des électrodes	93
3.4.1. Microscopie à épifluorescence 3D	93
3.4.2. Microscopie électronique à balayage	94
3.5. Analyse des populations microbiennes par pyroséquençage	95
<u>CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes - Approche numérique.....</u>	<u>97</u>
1. Aspects théoriques	99
1.1. Notion de potentiels	99
1.1.1. Potentiel absolu d'électrode	99
1.1.2. Potentiel d'électrode mesuré expérimentalement.....	99
1.1.3. Tension d'une pile à combustible microbienne	100
1.1.4. Calcul des distributions de potentiel et de courant	101
1.2. Distributions de potentiel	102
1.2.1. Distribution primaire	102
1.2.2. Distribution secondaire	102
1.2.3. Distribution tertiaire.....	102
2. Distribution secondaire de potentiel dans une pile à combustible microbienne	103
2.1. Hypothèses simplificatrices	103
2.2. Ajustement des cinétiques expérimentales des électrodes.....	104
2.2.1. Correction de la chute ohmique.....	105
2.2.2. Lissage par des équations (bio)électrochimiques	106
2.2.3. Ajustement des paramètres	107
2.3. Distributions de courant et de potentiel	107

CHAPITRE 4 : Optimisation des électrodes d'une pile à combustible microbienne...111

1. Cathode à air	113
1.1. Tentatives d'amélioration des performances de la cathode à air	113
1.2. Le biofouling : une limitation importante pour les cathodes à air	117
2. Anode microbienne	118
2.1. Tests préliminaires : Modification de l'inoculum « lixiviat de terreau ».....	118
2.1.1. Acclimater les microorganismes du terreau à des milieux alcalins.....	118
2.1.2. Rendre le lixiviat de terreau « propre » pour retarder le (bio)fouling de la cathode à air	
119 2.2. Former une bioanode à haute température pour un fonctionnement à température ambiante (Publication 1).....	121
2.3. Procédure optimale de formation d'une bioanode.....	140
2.3.1. Volet n°1 : Du lixiviat de terreau au milieu synthétique	140
2.3.2. Volet n°2 : De la bioanode primaire à la bioanode secondaire.....	149
2.4. Effet du mode d'alimentation en substrat	158
2.5. Première tentative d'extrapolation des bioanodes (Publication 2).....	159
3. Conclusions du Chapitre 4	178

CHAPITRE 5 : Optimisation d'une pile à combustible microbienne.....181

1. Contourner le biofouling de la cathode à air grâce à l'architecture de « pile à combustible microbienne (PCM) avec cathode amovible » (Publication 3).....	183
2. Augmenter la surface de la cathode à air.....	196
2.1. Prototype « Multiple Air-Cathodes » ou « MAC ».....	196
2.1.1. Description du prototype	196
2.1.2. Résultats expérimentaux d'une pile à combustible microbienne avec une bioanode plane	197
2.1.3. Analyse de la contribution des cathodes à air	198
2.1.4. Résultats expérimentaux de piles à combustible microbiennes avec une bioanode tridimensionnelle	200
2.2. Prototype « Cube ».....	201
2.2.1. Description du prototype	201
2.2.2. Résultats avec le prototype « Cube ».....	203
2.2.3. Extrapolation du prototype grâce au modèle numérique	203
3. L'Assemblage Séparateur-Electrodes (ASE) avec une bioanode tridimensionnelle et une cathode à air amovible booste les performances d'une pile à combustible microbienne (Publication 4)	207
4. Conclusions du Chapitre 5	229

CHAPITRE 6 : Optimisation d'un assemblage de piles à combustible microbiennes 233

1. Connexion en série de piles à combustible microbiennes dans un électrolyte commun : des résultats mitigés (Publication 5).....	235
2. Prototype de démonstration « Bioelec »	260
2.1. Conception du prototype	260
2.2. Procédure expérimentale.....	261
2.3. Résultats expérimentaux	262
2.3.1. Détermination de la configuration optimale.....	262
2.3.2. Suivi des performances du prototype « Bioelec » au cours du temps.....	264
3. Conclusions du Chapitre 6	267
Conclusions générales.....	269
Références bibliographiques.....	277
Annexes	287

Nomenclature

Symbole	Signification physique	Valeur / Unité
C	Concentration	mol.L ⁻¹ ou mol.m ⁻³
E	Potentiel de Nernst d'une électrode	V
E _{eq}	Potentiel à l'équilibre d'une électrode	V
E _{KA}	Potentiel atteint pour j correspondant à la moitié de j _{max}	V
E _{mesuré}	Potentiel d'une électrode mesuré expérimentalement	V
η	Surtension	V
F	Constante de Faraday	96 485 C.mol ⁻¹
grad	Opérateur gradient	/
i	Intensité du courant électrique	mA
i ₀	Intensité du courant d'échange	mA
j _{max}	Densité de courant électrique maximale	A.m ⁻²
j ₀	Densité de courant d'échange	A.m ⁻²
k	Coefficient de transfert de masse	m.s ⁻¹
K _M	Constante d'affinité du substrat	mol.L ⁻¹
K ₁ , K ₂	Paramètres cinétiques	/
n	Nombre d'expériences	/
n _e	Nombre d'électrons échangés	/
\vec{n}	Vecteur normal	/
P	Puissance	W ou W.m ⁻²
R	Constante des gaz parfaits	8.314 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹
R _s	Résistance	Ω
S	Concentration en substrat	mol.L ⁻¹
T	Température	K
U _{cellule}	Tension de cellule délivrée par une pile	V
U ₀	Tension théorique d'équilibre d'une pile	V
V	Volume	mL ou m ³
α	Coefficient de transfert	/
Δ	Opérateur Laplacien	/
σ	Conductivité de la solution	S.m ⁻¹
φ _M	Potentiel électrostatique du matériau d'électrode	V
φ _S	Potentiel électrostatique de la solution au contact de l'électrode	V

Introduction générale

La transition énergétique des énergies fossiles, épuisables et émettrices de gaz à effet de serre, vers des énergies renouvelables, durables et respectueuses de l'environnement, constitue un enjeu majeur qui n'en est qu'à ses prémices. A l'horizon 2030, l'Union Européenne s'engage à porter la part des énergies renouvelables à 27 % de la consommation européenne, à réduire de 40 % les émissions de gaz à effet de serre et à améliorer l'efficacité énergétique d'au moins 27 %¹. Parmi les énergies renouvelables figurent principalement l'énergie solaire, l'énergie éolienne, l'énergie hydraulique, l'énergie géothermique et les bioénergies.

Les technologies électro-microbiennes, utilisant les interactions entre microorganismes et électrodes, ont émergé ces dernières années en tant que solutions innovantes propres et durables. Depuis les années 2000, la pile à combustible microbienne (PCM), produisant de l'énergie électrique grâce à l'oxydation de toutes sortes de matières organiques par des biofilms électroactifs, se positionne comme l'archétype de ces technologies. La multiplication des recherches effectuées sur les PCMs ces dernières années ont permis des progrès extrêmement rapides mais, depuis 2008, les performances délivrées tendent à stagner autour de quelques watts par mètre carré de surface d'électrode. De nombreuses études se sont concentrées sur la compréhension et la maîtrise des biofilms électroactifs, mais l'analyse globale des processus qui contrôlent le fonctionnement des PCMs a souvent été négligée. Peut-être faut-il y voir une raison de la stagnation actuelle des performances.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de recherche Bioelec « Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes » soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Cinq partenaires français sont impliqués dans le consortium : l'entreprise PaxiTech SAS (Grenoble), le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et d'Environnements Extrêmes (LEMIRE, Cadarache), le Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE, Evry), Toulouse Tech Transfer (TTT, Toulouse) et nous-même le Laboratoire de Génie Chimique (LGC, Toulouse).

L'objectif de ce projet est de développer une nouvelle génération de PCM en mettant en œuvre les conditions qui assureront des densités de puissances maximales. Il faut noter que les recherches sur les PCMs se développent actuellement suivant plusieurs axes complémentaires en fonction des objectifs applicatifs visés. Lorsque les PCMs sont destinées à traiter des effluents, il est important de les développer dans des conditions compatibles avec une extrapolation en station d'épuration. De même, lorsqu'elles visent la production d'énergie en milieu marin, il est évidemment essentiel de les étudier dans ce milieu. Le projet Bioelec choisit de développer une ingénierie qui s'affranchit des contraintes applicatives. L'objectif est de déterminer les meilleures conditions possibles, même si elles ne sont réalisables qu'en laboratoire, dans le seul but de porter le niveau de performance au maximum. La démarche, qui consiste à analyser le fonctionnement global de la PCM afin de concevoir une anode microbienne et une cathode abiotique capables de fonctionner ensemble de façon optimale, constitue également une approche relativement novatrice dans le contexte bibliographique. In fine, l'intention pratique est de concevoir un prototype qui puisse être utilisé comme une vitrine de la technologie PCM pour la production d'électricité autonome. Le prototype devra être énergétiquement indépendant et n'exigera pour fonctionner pas plus d'énergie qu'il ne peut en produire.

¹ European Commission, 2030 Energy Strategy, <https://ec.europa.eu/energy/en/topics/energy-strategy-and-energy-union/2030-energy-strategy>

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont effectués dans le cadre de ce projet Bioelec. Ils s'inscrivent dans une démarche de recherche à la frontière entre l'électrochimie, la microbiologie et les bioprocédés. Des choix fondamentaux ont été faits en amont de la thèse. La cathode est abiotique et utilise la réduction de l'oxygène. Elle pallie la faible concentration de l'oxygène en solution grâce à une configuration qui consiste à exposer une face à l'air afin de maximiser l'arrivée de l'oxygène vers le catalyseur, lui attribuant le nom de « cathode à respiration » ou « cathode à air ». L'anode microbienne est préparée avec un inoculum issu de terreau de jardin, inoculum qui a fait ses preuves lors de la formation de bioanodes performantes au cours d'une thèse antérieure au LGC (Pocaznoi, 2012).

Le lecteur lira dans la suite que les conditions de fonctionnement optimales de la cathode à air et de ce type de bioanode sont assez éloignées. Des tentatives ont été faites pour identifier des inocula qui permettraient de rapprocher les optima des deux électrodes, mais sans succès, et la bioanode initiale a donc dû être conservée. Le travail expérimental s'est ensuite déployé sur l'étude de différentes configurations de réacteur. Un modèle numérique, calculant les distributions secondaires de courant et de potentiel au sein de la PCM, complète l'étude expérimentale afin d'optimiser l'architecture de la pile et évaluer les maxima théoriques des performances.

Ce manuscrit de thèse est organisé en six chapitres. Le chapitre 1 présente l'état de l'art nécessaire pour appréhender les travaux présentés. Une première partie décrit les PCM et leur principe de fonctionnement. La seconde partie s'appuie sur une revue scientifique mettant l'accent sur le transport ionique dans les PCM, et faisant une classification des différents séparateurs utilisés dans ces systèmes :

- « Ion transport in microbial fuel cells : Key roles, theory and critical review » publié dans le journal *Applied Energy*

Le chapitre 2 décrit les matériels et les protocoles utilisés dans le travail expérimental. Le chapitre 3 est dans la même lignée des chapitres « Matériel et méthodes » mais consacré au modèle numérique.

Les chapitres 4 à 6 présentent l'ensemble des résultats obtenus en mode « crescendo ».

Le chapitre 4 concerne l'optimisation de chaque électrode d'une PCM, avec une première partie portant sur la cathode à air et une seconde sur l'anode microbienne. Il s'appuie sur deux articles :

- « Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature » soumis pour publication dans le journal *Electrochimica Acta*.
- « Influence of the electrode size on microbial anode performance » publié dans le journal *Chemical Engineering Journal*.

Le chapitre 5 décrit l'optimisation d'une PCM dans sa globalité au travers de l'étude de différentes architectures. Il a servi de base à la rédaction de deux articles :

- « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells » publié dans le journal *Bioresource Technology*.
- « Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensionnal bioanode and removable air-cathode boots microbial fuel cell performance » publié dans le *Journal of Power Sources*.

Le chapitre 6 présente deux possibilités d'assemblage de plusieurs PCMs. La première partie concerne la connexion en série de PCMs dans un électrolyte commun. Cette solution ne conduisant pas à des résultats satisfaisants en termes de puissance délivrée, il a été choisi de construire le démonstrateur final en assemblant des modules de PCMs indépendants, comme décrit dans la seconde partie du chapitre. La première partie est présentée sous forme d'article :

- « Microbial fuel cells connected in series in a common electrolyte underperform: Understanding why and in what context it can be applied » publié dans le journal *Electrochimica Acta*.

CHAPITRE 1 : Bibliographie

1. Un peu d'histoire ...	23
2. Pile à combustible microbienne (PCM)	23
2.1. Principe de base	23
2.2. L'anode microbienne	24
2.2.1. Mécanismes de transfert électronique	24
2.2.2. Substrats	25
2.2.3. Matériaux supports	26
2.3. La cathode	26
2.4. Développement de la technologie pile à combustible microbienne	27
3. Transport ionique dans les piles à combustible microbiennes	28
3.1. Limitations dans une pile à combustible microbienne	29
3.1.1. L'électrolyte	30
3.1.2. La bioanode	30
3.1.3. La cathode à air abiotique	30
3.2. Séparateurs dans une pile à combustible microbienne	31

1. Un peu d'histoire ...

Le concept de production d'énergie par des bactéries a été lancé au début du 20^{ème} siècle. C'est en 1910 que Michael Cresse Potter, professeur de botanique à l'Université de Durham au Royaume-Uni, a découvert la capacité de la bactérie *Escherichia coli* à produire de l'électricité (Potter, 1911). En 1931, Barnet Cohen a repris l'idée de Potter en connectant plusieurs piles microbiennes en séries pour augmenter la tension totale (Cohen, 1931). Dans les années 1980, une équipe du King's College de Londres, dirigée par Peter Bennetto, a tenté d'améliorer le transfert d'électrons entre les microorganismes et les électrodes par le biais de médiateurs électrochimiques (Bennetto, 1981). Cette équipe fut notamment la première à proposer une architecture de pile à combustible microbienne (PCM) composée d'une cathode et d'une bioanode séparées par une membrane échangeuse d'ions. Peter Bennetto, également musicien amateur de talent, fit découvrir très tôt les piles microbiennes au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) lors d'une visite à l'équipe du professeur Maurice Comtat à la faveur de l'une des premières fêtes de la musique. Toutefois, ce n'est que dans les années 2000 que le développement des PCMs a définitivement franchi un palier. L'équipe de Derek Lovley de l'Université du Massachusetts a mis en évidence le concept de catalyse électro-microbienne par des biofilms en découvrant que certains microorganismes étaient capables de transférer directement des électrons à une électrode (Chaudhuri & Lovley, 2003). Le transfert direct d'électrons entre bactéries planctoniques et électrode avait été démontré peu de temps avant par B.-H. Kim et des chercheurs de Corée (B. H. Kim et coll., 1999). En parallèle en Europe, un partenariat entre le CNR centre de Gênes (Italie), le CEA de Saclay et le LGC avait également démontré la possibilité de catalyser des réactions de pile, côté cathode cette fois, par un biofilm microbien (brevet français CNRS-CEA (Bergel & Féron, 2002).

2. Pile à combustible microbienne (PCM)

2.1. Principe de base

Une pile à combustible microbienne (PCM) convertit l'énergie chimique issue de l'oxydation de matières organiques directement en énergie électrique. L'oxydation du combustible est catalysée par des microorganismes qui se développent sous la forme d'un biofilm adhérent à la surface de l'anode. Les microorganismes du biofilm assurent le transfert d'électrons du combustible vers l'anode, on parle alors de biofilm « électroactif ». Les électrons collectés à l'anode circulent dans un circuit électrique externe et sont réinjectés à la cathode. Celle-ci est en contact avec la même solution électrolytique que celle du compartiment anodique dans le cas d'une configuration simple compartiment, ou avec une solution différente dans le cas d'une configuration à deux compartiments. Dans ce dernier cas, les compartiments anodique et cathodique sont séparés par un séparateur ou simplement distingués par sédimentation, comme par exemple les piles benthiques, dont le compartiment anodique est constitué par les sédiments et le compartiment cathodique par l'eau de mer (W.-W. Li et coll., 2015).

2.2. L'anode microbienne

2.2.1. Mécanismes de transfert électronique

La respiration anodique est le processus par lequel un microorganisme exporte les électrons issus de son métabolisme cellulaire, non pas vers un accepteur d'électron soluble, mais vers une anode. Différents mécanismes spécifiques sont mis en jeu au sein du biofilm pour transférer l'électron depuis la membrane externe de la cellule jusqu'à l'électrode (Figure 1).

2.2.1.1. Transfert d'électrons indirect

Le transfert des électrons de la cellule microbienne vers l'anode est dit indirect lorsqu'il n'y a pas de contact entre la cellule et l'électrode. Il est assuré par des molécules qui jouent le rôle de médiateurs électrochimiques, en se réduisant à l'intérieur de la cellule puis en s'oxydant à la surface de l'électrode en cycles successifs. Certaines bactéries sont capables de produire leur propre médiateur, comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa* qui produit de la pyocyanine, un pigment identifié comme responsable de l'activité électrochimique de la bactérie (Rabaey et coll., 2005). Les médiateurs peuvent également être des molécules ajoutées en solution par l'expérimentateur, cependant la toxicité et l'instabilité de ces dernières limitent leur utilisation dans les systèmes électro-microbiens (Schroeder, 2007). Le transfert indirect d'électrons peut également s'effectuer par l'intermédiaire d'un produit issu du métabolisme bactérien. Ainsi l'hydrogène, des alcools, l'ammoniac, des sulfures, etc, produits par fermentation par certaines bactéries peuvent être oxydés à la surface de l'anode (exemple de l'hydrogène, Niessen et coll., 2006).

2.2.1.2. Transfert direct

Le transfert direct s'effectue comme son nom l'indique par contact direct entre la membrane externe de la bactérie et l'électrode (Bond et coll., 2002; Leang et coll., 2003). L'échange d'électrons est assuré à l'interface par des protéines membranaires, des cytochromes de type C (Shi et coll., 2007). Le mécanisme de transfert direct via les cytochromes a été clairement démontré chez *Geobacter sulfurreducens* grâce à des expériences réalisées avec des mutants pour lesquels le gène codant pour les cytochromes C a été délété ou surexprimé (Lovley, 2006).

L'année 2005 a vu naître le concept de pili conducteurs (Gorby et coll., 2006; Reguera et coll., 2005; Reguera et coll., 2006). De nombreuses cellules microbiennes sont connues pour produire des pili qui assurent plusieurs fonctions au sein des biofilms, comme par exemple l'échange de matériel génétique. Il a été avancé que certains de ces pili auraient des propriétés de conduction électrique (Malvankar et coll., 2011), et seraient des sortes de nano-fils électriques assurant le transfert d'électrons directement de la cellule vers l'électrode. Cette hypothèse, d'abord très controversée (Strycharz-Glaven et coll., 2011), semble maintenant totalement démontrée (Malvankar et coll., 2014).

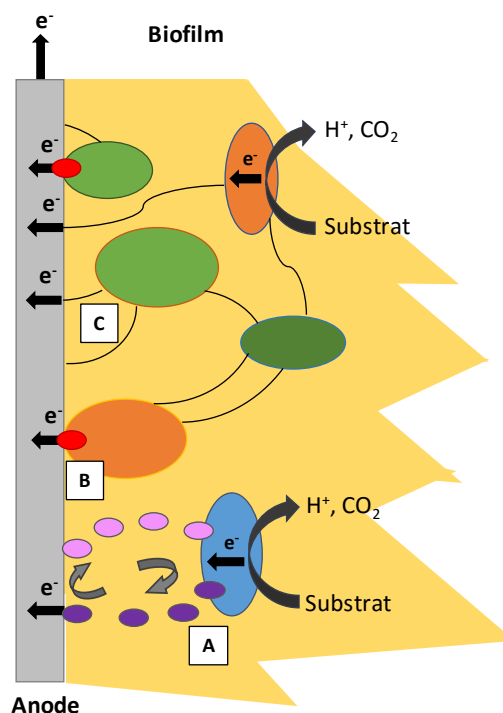


Figure 1. Schéma des différents mécanismes de transfert d'électrons : (A) Transfert indirect via des médiateurs, (B) transfert direct via des cytochromes, (C) transfert direct via des pili conducteurs. (D'après Alain Bergel).

Ces mécanismes de transfert sont décrits ici de manière simplifiée car ils n'étaient pas dans l'axe du travail de thèse. Plus de détails sont toutefois disponibles dans d'autres thèses réalisées au LGC (Ketep, 2012; Pocaznoi, 2012). Par ailleurs, un grand nombre de revues ont été publiées sur ce thème (Kumar et coll., 2015; Schaetzle et coll., 2008; Schroeder, 2007). Certaines études s'intéressent également aux techniques utilisées pour caractériser ces mécanismes de transfert (Zhi et coll., 2014). D'autres, plus récentes, sont dédiées aux interactions entre microorganismes de même espèce ou d'espèces différentes au sein de biofilms électroactifs (Q. Cheng & Call, 2016; Kouzuma et coll., 2015; Shi et coll., 2016).

2.2.2. Substrats

La pile doit être alimentée par un combustible ajouté dans le compartiment anodique. Il est le plus souvent appelé « substrat » dans le cas des PCMs, car il sert de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes composant le biofilm électroactif. Les microorganismes peuvent oxyder une grande variété de molécules organiques en produisant de l'énergie utile pour leur croissance et le maintien de leur métabolisme. Toutes sortes de matières organiques peuvent donc être utilisées comme combustible à l'anode, allant des plus simples (glucose, acétate, ...) aux plus complexes (cellulose, mélasse, ...). Pour les substrats complexes, il est généralement admis que des consortia bactériens assurent la dégradation en molécules simples, qui sont ensuite oxydées par les espèces électroactives. La variété des molécules qui peuvent être oxydées par des biofilms électroactifs multi-espèces permet aux PCMs d'exploiter comme combustible les déchets organiques contenus dans les eaux usées, les déchets agricoles (laiteries, lisiers, ...) ou les déchets domestiques. De nombreuses revues se sont penchées sur l'utilisation des PCMs comme procédé de traitement d'effluents. La revue récente de He et coll. rapporte les performances actuelles délivrées par les PCMs destinées à traiter les effluents et se concentre en particulier sur les architectures variées des réacteurs mis en œuvre (He

et coll., 2017). D'autres études sont consacrées aux verrous technologiques auxquels se heurte l'installation de PCMs dans ce domaine et présentent les challenges liés au développement à grande échelle de ces systèmes (W.-W. Li et coll., 2014; Oh et coll., 2010; Rozendal et coll., 2008). La possibilité d'intégrer la technologie PCM pour le traitement d'effluents à d'autres procédés constitue également un axe de recherche bibliographique (He et coll., 2017; W. Liu & Cheng, 2014; Pant et coll., 2011).

Les différents substrats utilisés à l'anode dans les PCMs sont répertoriés dans de nombreux travaux (Ferreira Mercuri et coll., 2016; Pandey et coll., 2016; Pant et coll., 2010). Toutefois, l'acétate est le substrat qui donne les plus forts courants anodiques, et est donc le plus couramment utilisé dans le développement des anodes microbiennes et des PCMs (Bond & Lovley, 2003; Parot et coll., 2008; Torres et coll., 2009). La réaction anodique d'oxydation de l'acétate :



conduit à la production de huit électrons et neuf protons. La simple écriture de cette réaction permet d'anticiper une limite à la production de forts courants : l'acidification locale du biofilm risque d'être très défavorable à la vie microbienne, qui se développe le plus souvent à des valeurs de pH proches de la neutralité.

2.2.3. Matériaux supports

Les matériaux d'électrodes doivent présenter une bonne conductivité électrique, une bonne stabilité chimique, une bonne tenue mécanique et être bon marché (M. Zhou et coll., 2011). Pour les bioanodes, une contrainte supplémentaire apparaît : le matériau doit favoriser le développement du biofilm électroactif (Morozan et coll., 2007).

De nombreuses revues listent les divers matériaux et les multiples revêtements qui ont été envisagés dans le cadre des anodes microbiennes. Ainsi, des matériaux d'électrodes plutôt sophistiqués ont été proposés dans la bibliographie, tels que le graphite revêtu de graphène ou les nano-tubes de carbone (Ghasemi et coll., 2013; Krieg et coll., 2014). Des matériaux insolites ont également été testés, allant du carton ondulé pyrolysé (S. Chen et coll., 2012) aux matériaux naturels pyrolysés comme du charbon de bambou, des champignons ou du maïs (Sonawane et coll., 2017).

La configuration des bioanodes constitue également un axe privilégié d'analyse bibliographique. Des électrodes de surface plane ainsi qu'une large variété de structures à trois dimensions (tissus, grilles, feutres, brosses) ont été expérimentées parmi les matériaux des bioanodes dans les PCMs (Krieg et coll., 2014; Rimboud et coll., 2014). Le remplacement des électrodes planes par des électrodes tridimensionnelles permet d'augmenter la surface active, c'est-à-dire la surface accessible pour la colonisation microbienne, et améliore ainsi les performances (Wei et coll., 2011; Xie et coll., 2015).

2.3. La cathode

L'oxygène est l'oxydant le plus commun utilisé à la cathode dans les PCMs. Deux mécanismes de réduction de l'oxygène sont mis en jeu selon le pH:



L'équation (1.2) est souvent utilisée dans les études de PCM probablement par similitude avec les piles échangeuses de protons (PEMFCs). Cependant, les conditions dans une PCM sont bien différentes de celles dans une PEMFC. Le développement du biofilm à l'anode impose à l'électrolyte un pH proche de la neutralité. La concentration en protons ne dépasse donc que très rarement 10^{-6} M ce qui n'est pas suffisant pour assurer le mécanisme de l'équation (1.2). La réduction de l'oxygène dans une PCM devrait donc dans la majorité des cas être considérée selon l'équation (1.3).

La cathode est dite abiotique lorsque la catalyse de la réduction de l'oxygène ne fait pas intervenir de mécanisme microbien. La majorité des PCM de laboratoire sont équipées d'une cathode à air abiotique dite « à respiration » ou « à air », parce qu'elle expose une face à l'électrolyte et une face à l'air (Fan et coll., 2007; Logan et coll., 2015). Ce dispositif permet de pallier la faible solubilité de l'oxygène en solution. Le platine est le catalyseur le plus souvent utilisé. C'est un excellent catalyseur de la réduction de l'oxygène en milieu acide, mais il perd une grande partie de ses capacités catalytiques dans des milieux à pH neutre (Erable et coll., 2010). De nombreuses études ont pour objectif d'élaborer des catalyseurs de la réduction de l'oxygène moins cher que le platine et plus efficaces aux valeurs de pH proches de la neutralité (Hernandez-Fernandez et coll., 2015; Ramachandran et coll., 2015; Z. Wang et coll., 2014). Ben Liew et coll. reportent notamment que les nanomatériaux, tels que le graphène ou les nano-tubes de carbone, pourraient constituer de bons candidats pour remplacer le catalyseur platine. Ils présentent en effet une activité catalytique élevée, mais les coûts importants liés à leur fabrication limitent encore leur utilisation dans les PCM (Ben Liew et coll., 2014). Il semble que d'autres catalyseurs moins coûteux pourraient avoir des performances similaires à celle du platine (Santoro et coll., 2014, 2015, 2017), mais les résultats ne sont à l'heure d'aujourd'hui pas exceptionnels.

Une alternative pourrait être offerte par les cathodes microbiennes (Bergel et coll., 2005). Un biofilm se développant à la surface de la cathode catalyse les réactions de réduction en assurant le passage des électrons du matériau de l'électrode vers l'accepteur final en solution. Ce sujet, hors du champ du travail de thèse, n'est pas développé en détail dans ce manuscrit, mais les études sur les biocathodes se sont multipliées ces dernières années (Erable et coll., 2012; Huang et coll., 2011) et en particulier au LGC (Debuy et coll., 2015; Desmond-Le Quéméner et coll., 2016; Rimboud et coll., 2015).

2.4. Développement de la technologie pile à combustible microbienne

Les systèmes électro-microbiens sont devenus, ces dernières années, un sujet d'étude très prisé auprès des chercheurs. Pour clarifier les nombreuses terminologies employées et aider à la communication sur le sujet, Schröder et coll. (Schroeder et coll., 2015) et Wang & Ren (H. Wang & Ren, 2013) ont proposé une classification des technologies à la frontière entre les domaines de la microbiologie et de l'électrochimie. Parmi les technologies électro-microbiennes, les chercheurs ont eu la farouche volonté de faire évoluer la pile à combustible microbienne (PCM) d'un concept fondamental à une technologie. Ferreira Mercuri et coll. ont effectué une analyse bibliographique grâce à une approche scientométrique afin de suivre l'évolution de la technologie PCM entre 1985 et 2015 (Ferreira Mercuri et coll., 2016). Cette étude montre que l'année 2008 a été un tremplin pour la recherche sur les PCM, avec une augmentation considérable du nombre de publications sur le sujet. Cependant, à l'heure actuelle, la PCM n'existe qu'à l'échelle de laboratoire. L'extrapolation à plus grande échelle n'a mené qu'à de modestes résultats (Dewan et coll., 2008; Logan, 2010; Logan et coll., 2015; Santoro et coll.,

2013), et un important travail de recherche est encore nécessaire avant d'envisager son développement.

Les performances actuelles reportées dans la littérature ne dépassent généralement pas 1 ou 2 W.m^{-2} . Des valeurs de l'ordre de 7 W.m^{-2} ont été relevées (Fan et coll., 2008; Pocaznoi et coll., 2012) mais en exprimant la densité de puissance par rapport à la surface de la bioanode, qui dans ces cas, était bien inférieure à celle de la cathode. Ces PCMs avaient été configurées de sorte que la bioanode soit l'électrode limitante de la pile, et il était donc logique d'exprimer la densité de puissance par rapport à la surface de la bioanode. En revanche, pour la plupart des PCMs, la cathode, dont la cinétique est plus lente que celle de la bioanode, constitue l'étape limitante. Utiliser la surface de la cathode pour le calcul de la densité de puissance est donc plus approprié, comme cela est effectué dans la majorité des études. Sur cette base, la plus haute densité de puissance atteinte jusqu'à présent est de 4.7 W.m^{-2} (W. Yang & Logan, 2016).

En espérant augmenter davantage les performances des PCMs, les chercheurs ont proposé des architectures extrêmement variées : PCMs à double ou simple compartiment, des réacteurs miniaturisés, tubulaires, à lit fluidisé, des assemblages de plusieurs PCMs, etc. Toutes ces configurations donnent matière à de multiples revues (Choi, 2015; Fan et coll., 2007; Krieg et coll., 2014; Logan et coll., 2006, 2015; Schroeder et coll., 2015). Certaines de ces configurations mettent en œuvre des séparateurs. Nombreux sont les séparateurs à avoir été testés dans les PCMs, ce qui en fait un sujet privilégié pour la rédaction de revues bibliographiques. Entre autres, Li et coll. listent les différentes configurations de PCMs intégrant un séparateur (W.-W. Li et coll., 2011), tandis que Leong et coll. détaillent les effets d'un séparateur sur les performances délivrées par une PCM (Leong et coll., 2013). Les revues de Dhar et coll. (Dhar & Lee, 2013) et Daud et coll. (Daud et coll., 2015) portent sur les problèmes liés à la mise en place d'un séparateur dans les technologies électro-microbiennes.

Ces revues focalisent sur les aspects techniques des séparateurs et listent leur impact sur les performances des PCMs, mais très peu se sont intéressées à des aspects plus théoriques. Certains articles ont proposé des éléments théoriques portant sur le transport ionique dans les PCMs (Harnisch & Schroeder, 2009; Harnisch et coll., 2009; Popat et coll., 2014). Récemment, une étude menée par Popat et Torres fait état de tous les phénomènes de transport pouvant être limitants dans les technologies électro-microbiennes, en particulier le transport d'électrons et le transport de matière au sein d'un biofilm électroactif (Popat & Torres, 2016). Toutes ces études confirment le rôle crucial du transport ionique dans les PCMs, mais curieusement, aucune n'en fait une approche globale.

3. Transport ionique dans les piles à combustible microbiennes

Cette partie du chapitre 1 s'appuie sur la revue présentée ci-après, intitulée « Ion transport in microbial fuel cells : Key roles, theory and critical review » et publiée dans le journal *Applied Energy*.

A notre connaissance, les nombres de transport n'ont jamais été utilisés dans le contexte des technologies électro-microbiennes, bien qu'ils représentent pourtant un outil essentiel pour les études du transport ionique dans les domaines des procédés électrochimiques et des procédés membranaires. Le concept de nombre de transport est repris dans la revue et offre une approche théorique simple mais novatrice pour l'étude du transport ionique dans les PCMs.

La première partie de l'article tente de montrer comment l'analyse de la composition ionique de l'électrolyte permet de prédire en grande partie le comportement des transferts ioniques dans une PCM et les limites associées. L'exercice est fait en absence et en présence de séparateur. Cette approche théorique est ensuite utilisée comme base d'une étude critique des données expérimentales de la bibliographie. La confrontation entre les prédictions théoriques et les données expérimentales montre que certains résultats étaient parfaitement prévisibles (ou, plus clairement, les expérimentations étaient inutiles) mais que d'autres restent surprenants et nécessitent des recherches plus approfondies. Cette revue met en lumière l'étonnant manque de cadre théorique d'une grande partie des travaux décrits dans la bibliographie. L'aspect très descriptif de certaines études, sans grand recul théorique, amène à des conclusions parfois antagonistes entre différents travaux. L'article propose de s'appuyer sur un bilan relativement simple des transports ioniques pour éviter quelques écueils majeurs. Il identifie les domaines expérimentaux pour lesquels plus de rigueur serait souhaitable, et propose quelques pistes pour progresser dans la maîtrise du transport ionique dans les PCMs.

3.1. Limitations dans une pile à combustible microbienne

Les électrolytes utilisés dans les PCMs possèdent des caractéristiques très différentes de ceux utilisés dans les systèmes électrochimiques abiotiques conventionnels. Le développement et le maintien en vie d'un biofilm dans le compartiment anodique impose à l'électrolyte des contraintes particulières liées à la croissance d'organismes vivants. Ces contraintes ont un impact sur les comportements électrochimiques de la bioanode et de la cathode. Le schéma de la Figure 2 présente le principe de fonctionnement d'une PCM. Les chiffres se rapportent à différents points fondamentaux, décrits très rapidement ici et développés plus en détail dans la partie 2 « Back to basics » de la revue.

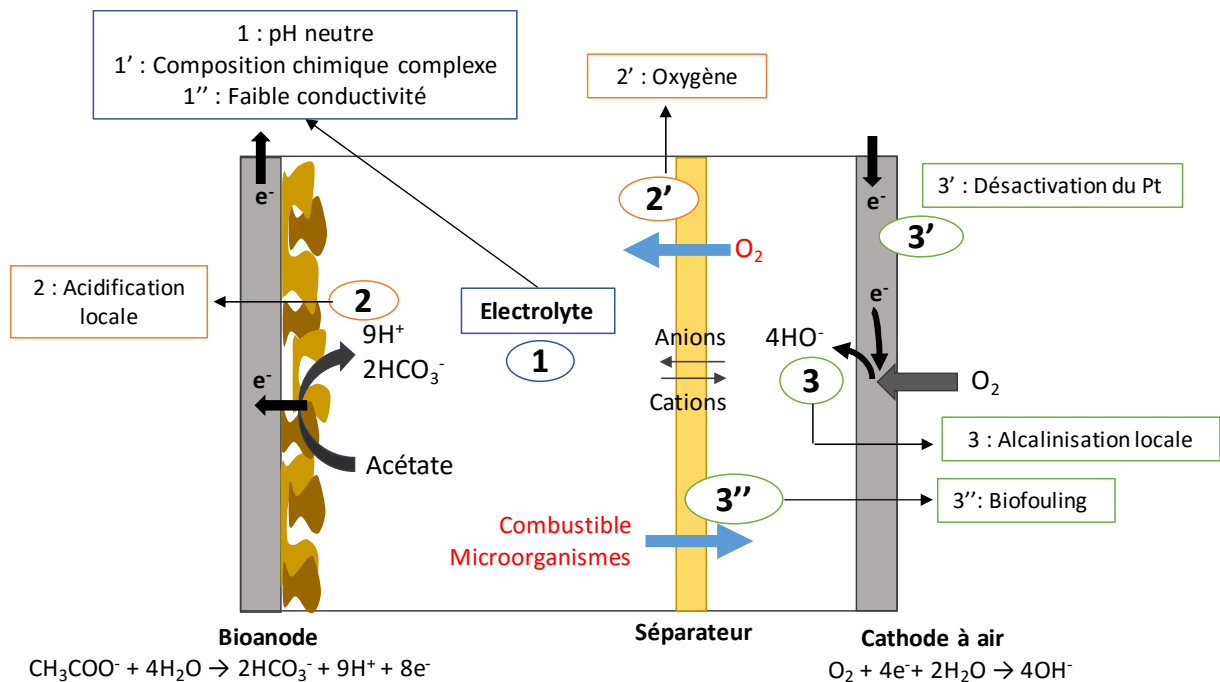


Figure 2. Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne. Les chiffres sont relatifs aux différents composants de la PCM (1) dans l'électrolyte, (2) à la bioanode, (3) à la cathode.

3.1.1. L'électrolyte

1 : Il est indispensable pour la bioanode de travailler dans un milieu dont le pH est proche de la neutralité pour assurer une croissance microbienne optimale.

1' : La bioanode se développe dans des milieux très complexes, souvent des milieux riches tels que les sédiments marins ou les eaux usées, dont les compositions exactes ne sont pas toujours connues. Il est donc fortement probable de trouver dans ces électrolytes de nombreux composés chimiques dont des cations tels que Mg^{2+} ou Ca^{2+} .

1'' : Les microorganismes du biofilm électroactif sont sensibles aux fortes salinités et ne se développent pour la plupart que dans des solutions de faible conductivité. Excepté pour les systèmes développés en milieu marin (Rousseau et coll., 2013), la majorité des anodes microbiennes sont étudiées dans des solutions dont la conductivité se trouve dans la gamme $0.5-2 \text{ S.m}^{-1}$, ce qui est d'un ordre de grandeur inférieur aux valeurs de conductivité des électrolytes mis en œuvre dans les systèmes électrochimiques abiotiques conventionnels.

3.1.2. La bioanode

2 : La réaction d'oxydation de l'acétate (Equation (1.1)) produit des protons ce qui provoque une acidification locale de la solution à proximité de la bioanode. Cette diminution de pH est rapidement défavorable pour les microorganismes, qui n'acceptent généralement pas de valeur de pH inférieure à 5, et affecte donc sévèrement l'activité catalytique du biofilm.

2' : L'arrivée d'oxygène depuis la cathode à air vers la bioanode (crossover) est un problème général pour les piles à combustibles qui utilisent l'oxygène comme comburant. Dans le cas des PCM, le problème est encore plus épineux car l'anode microbienne requiert un environnement anaérobie. L'arrivée d'oxygène peut tuer les bactéries du biofilm strictement anaérobies. Certaines bactéries peuvent tolérer l'oxygène mais, dans ce cas, la présence d'oxygène les dévie de la respiration anodique : les électrons sont préférentiellement transférés à l'oxygène comme accepteur final d'électrons plutôt qu'à l'anode.

3.1.3. La cathode à air abiotique

3 : La réduction de l'oxygène (Equation (1.3)) dans une PCM entraîne une alcalinisation locale de la cathode. D'un point de vue thermodynamique, cette évolution du pH est défavorable à la réaction de réduction de l'oxygène. Par ailleurs, l'augmentation du pH au voisinage de la cathode peut entraîner la précipitation des cations Ca^{2+} et Mg^{2+} présents dans l'électrolyte, en produisant des dépôts d'hydroxydes et de calcaire à la surface de l'électrode. On parle alors de fouling, un anglicisme très répandu et utilisé dans ce manuscrit pour désigner un encrassement de la surface provoqué par un dépôt non microbien.

3' : Comme indiqué plus haut, le catalyseur platine utilisé à la cathode à air perd ses performances à un pH proche de la neutralité, et il est en outre fortement sensible aux pollutions organiques.

3'' : En l'absence de séparateur, la cathode est directement exposée à l'électrolyte et donc en contact avec les matières organiques et les microorganismes nécessaires au développement et au maintien de

la bioanode. Même lorsqu'un séparateur est utilisé pour différencier les compartiments anodique et cathodique, il est pratiquement impossible d'éviter que les composés nécessaires à la croissance cellulaire ne soient à terme transférés vers le milieu cathodique. Dans la mesure où le compartiment cathodique n'est pas en conditions stériles, un biofilm ne tarde pas à se développer à la surface de la cathode. On parle alors de biofouling, anglicisme également très employé dans ce manuscrit pour désigner un encrassement de nature microbienne. Le biofilm est supposé limiter les transferts au niveau de la cathode.

3.2. Séparateurs dans une pile à combustible microbienne

La section 3 de l'article ci-dessous est consacrée aux « Separator-less MFC », c'est-à-dire aux PCMs sans séparateur. Cette architecture présente de nombreux avantages, notamment la simplicité et le coût réduit en comparaison aux systèmes qui nécessitent la mise en place d'un séparateur, en particulier si celui-ci est une membrane échangeuse d'ions. Cette configuration présente cependant certaines limites. Aucune barrière physique ne s'oppose au transfert de l'oxygène vers la bioanode, si bien que l'espace inter-électrode doit être suffisamment grand pour diminuer le flux d'oxygène à la bioanode et le flux de substrat à la cathode, comme présenté sur la Figure 2. Cependant, augmenter la distance entre bioanode et cathode augmente la chute ohmique, ce qui est particulièrement préjudiciable aux faibles conductivités mises en jeu dans les PCMs.

Pour ces raisons, il a souvent été tenté d'intégrer des séparateurs dans les PCMs. La section 4 « Functions of a separator » fait la revue des séparateurs testés dans les PCMs en les classant en deux grands groupes (Tableau 1) : les séparateurs non poreux et les séparateurs poreux. Suivant cette classification, les caractéristiques de chaque séparateur sont décrites dans la revue et les résultats obtenus dans la bibliographie sont analysés en se basant sur la partie théorique développée au début de l'article.

Tableau 1. Classification des séparateurs mis en œuvre dans les PCMs selon le type de membrane, le diamètre des pores et les espèces rejetées.

	Membrane échangeuse d'ions (IEM)			Osmose et Osmose inverse (RO / FO)	Nano-Filtration (NF)	Ultra-Filtration (UF)	Micro-Filtration (MF)	Macro-Filtration
	Membrane échangeuse de cations (CEM)	Membrane échangeuse d'anions (AEM)	Membrane bipolaire (BPM)					
Type	Non poreuse			Poreuse				
	Sélective d'ions			Non sélective d'ions	Sélective d'ions	Non sélective d'ions		
Diamètre de pores (Å)	/				10-100	100-1000	1000-10 ⁴	> 10 ⁴
MWCO (Da)	/				250-2000	2000-500,000	/	
Espèces rejetées	Atomes			Ions monovalents et divalents	Petites Particules, Sucres, Sels aqueux	Protéines, Poly-saccharides, Virus	Solides, Bactéries	Macro-particules, Colloïdes, Granules
Technique d'observation	Microscopie électronique à transmission				Microscopie électronique à balayage		Microscopie optique	CEI nu



Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review



Manon Oliot ^{*}, Sylvain Galier, Hélène Roux de Balmann, Alain Bergel

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

HIGHLIGHTS

- MFC behaviour is predicted from the analysis of the electrolyte content.
- The theoretical concept of transport number is detailed.
- A comprehensive classification is provided of separators reported in MFCs.
- The experimental effects of the various separators are compared with theory.
- Future research directions are recommended.

Sommaire

1. Introduction.....	34
2. Back to basics.....	36
2.1. Electrolytes of MERs vs. abiotic electrochemical reactors.....	36
2.2. Microbial anode.....	37
2.2.1. Electron transfer and limitation due to local acidification.....	37
2.2.2. Deactivation by oxygen.....	38
2.3. The cathode.....	38
2.3.1. Electron transfer and limitation due to local alkalization.....	38
2.3.2. Deactivation by organic matter.....	39
2.4. Theoretical basis of ion transport in electrolytes and transport number.....	39
2.4.1. Importance of ion transport in the electrolyte bulk.....	39
2.4.2. Ion transport, general theory.....	40
2.4.3. Ion transport in the bulk and transport number.....	41
2.4.4. How to use transport numbers and balance sheets.....	42
2.4.5. MFC performance assessment.....	43
3. Separator-less MFC.....	44
3.1. Why chemical gradients of fuel and oxygen are required in the electrolyte.....	44
3.2. Principle and limit of separator-less MFCs.....	44
3.3. Interest of separator-less MFCs and how to develop them.....	45
3.4. Ion transport in separator-less MFC: numerical illustration.....	46
3.4.1. Current transport in the bulk.....	46
3.4.2. Balance sheet close to the electrode surfaces and buffering.....	47
3.4.3. Effect of adding a supporting salt (Table 2.B, Fig. 2.B).....	49
3.4.4. Evolution of pH and ionic concentrations in an MFC during operation.....	49
3.4.5. Numerical illustration with wastewater used as electrolyte.....	50
4. Functions of a separator in MFC.....	51
4.1. The ideal separator and even more.....	51
4.2. Separator characteristics and classification.....	53
5. Non-porous separators.....	53
5.1. Cation exchange membrane (CEM).....	55
5.1.1. Basics on ion transport controlled by CEM.....	55

5.1.2. CEM in the MFC literature.....	57
5.2. Anion exchange membrane (AEM).....	59
5.2.1. Advantages of AEM vs. CEM.....	59
5.2.2. In a few circumstances AEM perform less well than CEM.....	60
5.3. Bipolar membrane (BPM).....	60
5.4. Reverse and forward osmosis (RO/FO) membrane.....	61
5.4.1. Characteristics and theoretical advantages and limit.....	61
5.4.2. Experimental work.....	62
6. Porous separators.....	63
6.1. Classification and basics.....	63
6.2. Nanofiltration (NF) membrane.....	65
6.3. Ultrafiltration (UF) membrane.....	65
6.4. Microfiltration (MF) membrane.....	66
6.5. Macrofiltration.....	67
7. Concluding remarks.....	68
Acknowledgements.....	69
References.....	69

Abstract

Microbial fuel cells (MFCs) offer the possibility to convert the chemical energy contained in low-cost organic matter directly into electrical energy. Nevertheless, in the current state of the art, microbial electrocatalysis imposes the use of electrolytes of low ionic conductivity, at around neutral pH and with complex chemical compositions, which are far from being ideal electrolytes for an electrochemical process. In this context, ion transport through the electrolyte is a key step, which strongly conditions the electrode kinetics and the global cell performance.

The fundamentals of ion transport in electrolytes are recalled and discussed in the light of MFC constraints. The concept of transport number is emphasized in order to provide an easy-to-use theoretical framework for analysing the pivotal roles of ion transport through the electrolyte. Numerical illustrations show how the concept of transport number can be used to predict MFC behaviour on the basis of the electrolyte composition. The tricky problem of pH balance is discussed, the interest of separator-less MFCs is emphasized, and the concept of “microbial separator” is proposed as a worthwhile future research direction.

The role of separators in driving ion transport is then reviewed following a comprehensive classification, from the most compact, non-porous membranes to the most porous separators. For each group, basic are first recall to guide the critical analysis of the experimental data. This analysis brings to light a few research directions that may be reoriented and some critical issues that need in-depth investigation in the future. The suitability of cation-/anion-exchange membranes is discussed in comparison to that of porous separators. Finally, the large discrepancy observed on data obtained for the same separator type suggests that, in the future, specific analytical set-ups should be developed.

Keywords : Microbial electrochemical technology, bioelectrochemical systems, separators, membranes, mass transport.

1. Introduction

For around 15 years, it has been known that microbial biofilms can act as electrocatalysts and be very efficient in this role [1–5]. Microbial electrocatalysis makes possible electrochemical reactions that “abiotic electrochemists” would never have dared to imagine before, such as the oxidation of acetate, organic fatty acids, sugars, etc. [6,7] or the reduction of carbon dioxide to acetate, ethanol and fuels [8,9]. Numerous reviews have presented the wonderful perspectives opened up by microbial electrochemical technology [10] in a wide variety of application domains [11–13], and particularly for the production of renewable energy from non-fossil sources. Microbial fuel cells (MFCs) can convert the chemical energy contained in low-cost organic matter directly into electrical energy [14,15], microbial electrolysis cells can produce hydrogen from the same renewable, low-cost compounds [16,17], and microbial electrosynthesis cells [8,9,18] can use carbon dioxide to store electrical energy in chemical form.

Microbial fuel cells (MFCs) are considered as the archetype of microbial electrochemical technologies [19] for several reasons. Firstly, the beauty of the concept of transforming the chemical energy contained in organic matter directly to electricity is doubtless a reason for its success. Secondly, MFCs were the pioneering systems at the origin of microbial electrochemical technologies [2–4,20]. Finally, MFCs can be cheap devices. The microbial anode, often graphite, does not involve expensive materials and the electrocatalytic biofilm forms spontaneously on its surface from the microorganisms contained in the electrolyte, without requiring any sophisticated chemical procedure. The cathode can be abiotic or biotic [19,21], most often achieving oxygen reduction. As an MFC produces its own current, monitoring does not require expensive electrochemical equipment. Measuring the current and the cell voltage may be sufficient for a first, simple approach. Although an MFC cannot be assimilated with an electroanalytical system [22], it has had the advantage of opening up the exciting field of electroactive biofilms to a large variety of research groups. The number of papers referring to MFCs has increased continuously year on year, reaching more than 1000 articles published last year.

Any electrochemical process is based on a continuous chain composed of three successive steps: i) electron transfer from the cathode to dissolved species, ii) ion transport through the electrolyte and iii) electron transfer from dissolved species to the anode. For each electron that is released from the cathode and collected at the anode a positive ionic charge must move to the cathode or a negative ionic charge must move to the anode (Figure 1). The slowest step(s) in this chain controls the system performance. If ion transport in the electrolyte is not fast enough, it can severely limit the electron transfer rate at the electrodes. The rate of electrochemical reactions depends straightforwardly on the capacity of the electrolyte to ensure efficient ion transport. The risk of ion transport being rate-limiting increases with decreasing ionic conductivity of the electrolyte.

Introducing a biofilm into an electrochemical process considerably increases the level of complexity of each step by imposing new constraints related to microbial growth. The kinetics of electron transfer at microbial anodes and microbial cathodes have been the subject of very many studies, which have led to remarkable fundamental and technical advances [23,24]. In comparison, the new constraints that biofilm catalysis imposes on ion transport through the electrolyte have been less comprehensively evaluated so far.

Microorganisms generally grow in solutions at around neutral pH and do not tolerate high salinity. In consequence, most MERs use electrolytes at around neutral pH and low salinity, which means

electrolytes with low ionic conductivity. The large majority of MERs have so far been implemented in synthetic culture media with conductivity of the order of 1 S m^{-1} [25,26] but the conductivity can fall lower than 0.06 S m^{-1} [27,28] when wastewater is used as the electrolyte. In comparison, the electrolytes used in conventional electrochemical reactors (abiotic processes) have ionic conductivities of several tens of S m^{-1} . For example, 10 to 33% KOH, which is commonly used for water electrolysis, has conductivity of up to 60 S m^{-1} . The low ionic conductivity of the electrolyte used in microbial electrochemical reactors (MERs) has often been identified as a major drawback.

Ion transport through the electrolyte costs energy, which is lost as heat. The power consumed by the ion motion through the electrolyte is inversely proportional to the conductivity of the electrolyte (see Eq. (15)). A decrease of conductivity of one, two or up to three orders of magnitude, as is the case for MERs in comparison with conventional abiotic electrochemical reactors, leads directly to an increase of the same proportion in power loss. For example, when 33% KOH is used as the electrolyte in an abiotic electrochemical reactor, a current density of 100 A m^{-2} between an anode and a cathode that are 1 cm apart creates an ohmic drop of less than 17 mV, i.e. a power loss of 1.7 W m^{-2} . In similar conditions, a MER using an electrolyte of 1 S m^{-1} conductivity would induce an ohmic drop of 1000 mV, i.e. a power loss of 100 W m^{-2} . This elementary calculation shows how essential the issue of ion transport through the electrolyte is, and how severely it can impact the large-scale development of microbial electrochemical technologies.

A reduction of the power loss due to ion transport can be achieved by reducing the distance to be travelled by the ions, i.e. the distance between anode and cathode (see Eq. (15)). Nevertheless, in most MERs, the chemical composition of the anode electrolyte must be different from the composition of the cathode electrolyte. These two opposite objectives, decreasing the inter-electrode distance while keeping chemical gradients between anode and cathode, are commonly pursued by using a separator between anode and cathode.

A large diversity of separators of various natures has been screened in the context of MERs, and reviewed in several recent articles. Reviews by Dhar and Lee (2013) [29] or Daud et al. (2015) [30] have thus analysed the major technical barriers related to membranes in MERs. Other review articles have focused on MFCs: Li et al. (2011) [31] have listed the different separator configurations while Leong et al. (2013) [32] have detailed the effects of separators on MFC performance. Recently, a review has focused specifically ceramic material, which has the great advantage of being usable as the structural material, the electrode material and also the ion exchange medium [33]. Integration of membranes into MFC designs, such as cation-exchange membranes, anion-exchange membranes, or osmosis membranes can bestow an additional function on an MFC or even fully transform its essential objective. In this context, MFCs designed for water reclamation, saline water desalination and wastewater treatment have been reviewed by Yuan and He [34], Sevda et al. [35] and Xu et al. [36], respectively. A different kind of approach has been proposed by Varcoe et al. [37], who considered only anion exchange membranes used as the separator and reviewed the applications of this separator in all kinds of fuel cells, including both chemical and microbial fuel cells.

Reviews of separators in MERs, and specifically MFCs, have mainly focused on the technical aspects of separators and their experimental impact on the MER behaviour and performance. Some attempts at theoretical modelling have started to be proposed. Ion transport through an ion-exchange membrane has been modelled numerically [38] and a theoretical approach has also shown the impact of buffer transport through the electrolyte on the cathode overpotential [39]. Harnisch and Schröder have

proposed a detailed description of the intricate effects of ion transport on the other phenomena that control the behaviour of an MER, particularly emphasizing the problem of pH splitting between the anode and cathode zones [40]. Recently, Popat and Torres have shaped the general framework of all the transport phenomena that can be rate-limiting steps in MERs, including electron transport and mass transports occurring inside the electroactive biofilms [41]. These studies have confirmed the pivotal role of ion transport through the electrolyte in MERs. Nevertheless, the theory of ion transport in electrolytes has rarely been used to develop a unified theory to analyse the huge amount of experimental data reported in the literature.

Curiously, to the best of our knowledge, transport numbers have never been used so far in the context of MERs, although they are very useful theoretical tools, widely used to investigate ion transport in electrochemical and membrane processes. The transport number concept offers a simple theoretical approach to ion transport in electrolytes and gives an easy-to-handle theoretical basis for analysing experimental data and, very interestingly, for predicting some aspects of the behaviour of an electrochemical reactor based on the analysis of the electrolyte composition.

The objectives of the present review are, firstly, to provide a simple theoretical tool to tackle the thorny problem of ion transport in MFCs and, secondly, to review the experimental data reported in the literature from the standpoint of this theoretical basis. The theoretical explanation is based on MFCs but the approach and the main conclusions should also be useful for other kinds of MERs. Fundamentals of MFCs are briefly recalled by emphasizing how the specific electrolytes required for microbial growth can impact the anode and cathode electrochemical behaviours and how ion transport through the electrolyte can enhance or mitigate these phenomena.

The concept of transport numbers is presented and used as a theoretical breadcrumbs trail to analyse ion transport in MFC in the absence or presence of a separator. In each case, theory is firstly used to anticipate how ion transport through the electrolyte may impact the MFC behaviour. This theoretical basis is then used for a critical review of the experimental data reported in the literature. Confronting experimental data with theoretical expectations points out predictable data that fit the theory and others, which seem rather surprising and need further investigation. As a result of this cross analysis, advice for enhancing or reorienting some current approaches is given and key issues for progressing towards mastery of ion transport in MFCs are proposed. The objective is to stimulate thinking and discussion in order to boost the advance of electrochemical technology towards practical applications.

2. Back to basics

2.1. Electrolytes of MERs vs. abiotic electrochemical reactors

The solutions used in MFCs are very different from the electrolytes used in conventional abiotic electrochemical processes. Abiotic electrochemical reactors generally implement solutions with very simple chemical compositions in order to avoid fouling and inhibition of the electrocatalytic surfaces. Metallic electrocatalysts are known to be very sensitive to any source of pollution and most of them require clean reactants. In contrast, microbial electrodes are most often developed in very complex media, even in “dirty” solutions such as marine sediments or wastewaters, the composition of which is sometimes not fully known. Even when bioelectrodes are formed from pure cultures, complex media must be used, which must contain all the micro-nutriments and trace elements required for microbial growth. Consequently, MER electrolytes generally contain various chemical compounds, and Ca^{2+} , Mg^{2+} and other cations.

As mentioned in the introduction of this article, electroactive biofilms are generally sensitive to high salinity and are consequently developed in solutions of low conductivity. A few recent articles have described halotolerant electroactive biofilms able to work in solutions with ionic conductivity higher than 10 S m^{-1} [25,42]. Benthic MFCs operate in seawater [43,44] but the energy they produce remains modest because of the low availability of organic matter in sediment. Nevertheless, the large majority of MFC electrolytes have conductivities in the range of 0.5 to 2 S m^{-1} [25,26]. When wastewater is used as the electrolyte, ionic conductivity is as low as 0.15 S m^{-1} [45,46] and even lower than 0.06 S m^{-1} [27,28]. In comparison, abiotic electrochemical processes commonly used electrolytes with conductivities two to three orders of magnitude higher.

Finally, using a microbial biofilm as the electrocatalyst most often makes it indispensable to work at pH values around neutrality. Some electroactive biofilms can develop in slightly alkaline solutions [47–50] but, except for a few cases up to pH 11 [51], generally not above pH 10. Very few have been formed in acidic solutions below pH 5 [28,47]. In consequence most MFCs work at pH values around 7-8.

In summary, the need to develop and to maintain living biofilms in MFCs imposes three main constraints on the electrolytes:

- complex chemical composition, including cations,
- low conductivity,
- pH around neutrality,

which represent three new and awkward conditions in the context of electrochemistry.

2.2. Microbial anode

2.2.1. Electron transfer and limitation due to local acidification

On the anode of an MFC, the microbial biofilm oxidizes the organic substrate(s) by transferring the electrons produced to the anode material. Acetate has been widely used as an MFC substrate [6] and can be taken as a model:



The electrochemical reaction provokes acidification of the solution near the anode surface. The local pH decrease inside the biofilm creates adverse conditions for microbial development and severely affects the electrocatalytic activity of the biofilms. This is a major limitation of the anode performance because very few electroactive biofilms have been shown to be efficient at pH values under 5 [47].

The detrimental effect of local acidification inside the biofilms of bioanodes has already been pointed out and theorized [40,41,52]. Nevertheless, ion transport inside biofilms is outside the scope of this review. This is of great interest but it would deserve specific in depth investigations because ion transport inside the biofilm matrix may be complicated by the accumulation of different compounds coming from the solution or produced by the cells, including, for instance, weak acids, which may contribute to the pH balance. The present study addresses ion transport through the bulk electrolyte of MFCs. The anode and cathode are considered as the boundaries of the electrolyte. The electroactive biofilm that develops at the anode, and at the cathode if a biocathode is implemented, is assumed to be part of the electrode kinetics and is not assimilated as part of the electrolyte [53].

2.2.2. Deactivation by oxygen

A microbial anode requires an anaerobic environment. A microbial anode may involve strictly-anaerobic anode-respiring bacteria, which are killed by the presence of oxygen. On the other hand, some electroactive bacteria can tolerate oxygen. In this case, the presence of oxygen diverts them from electron transfer to the anode and electrons are preferentially released to oxygen [40]. They prefer oxygen, their natural electron acceptor, over the electrode material. In supplement, oxygen can also support the development of non-electroactive bacteria in the biofilm or on its external side [54]. The growth of aerobic bacteria thickens the biofilm, which may distend the extracellular electron transport network and hinder mass transfer of the fuel to the anode-respiring bacteria. Consequently, in an MFC, either by killing the cells or diverting them to electron transfer to the electrode or by favouring the development of non-electroactive cells, the flux of oxygen to the anode can severely affect the electrocatalytic performance.

2.3. The cathode

2.3.1. Electron transfer and limitation due to local alkalization

Electrons collected at the anode flow through the external electrical circuit and are re-injected to dissolved species at the cathode. Oxygen is the most common oxidizer used at MFC cathodes. Many cathodes used in MFCs are abiotic and use an inorganic catalyst such as platinum, although it loses most its efficiency at the around neutral pH required in MFCs. Looking for oxygen-reduction catalysts that are efficient at neutral pH is a hot research topic [55], and many studies have aimed at finding less expensive and more efficient inorganic catalysts [56–58], including simply activated carbon [59] or more technologically-advanced materials such as graphene [60]. These abiotic cathodes are often implemented in the form of air-cathodes, with one side exposed to the electrolyte and the other side exposed to air [61]. Microbial oxygen-reducing cathodes may be another solution of interest [21,62] and enzymatic cathodes have also been envisioned [19,63].

Two mechanisms of oxygen reduction are possible, depending on pH:



Eq. (2) has frequently been used in MFC studies, mainly in pioneering works, where it was probably chosen by similarity with proton exchange membrane fuel cells (PEMFCs). However, the pH of an MFC electrolyte is very different from that in a PEMFC as the development of the microbial biofilms imposes pH close to neutrality. Proton concentration is rarely higher than 10^{-6} M in an MFC, which is not sufficient to sustain mechanism (2). Except in the few rare cases that have implemented oxygen-reducing cathodes in acidic conditions [64], the reduction of oxygen in an MFC should be considered according to mechanism (3), i.e. as a reaction that produces OH^- ions.

Thermodynamically, the pH increase near the cathode surface is detrimental to the oxygen reduction reaction [65]. Alkalinization of the cathode zone has an additional disadvantage in MFCs. It is known that the pH increase leads to the precipitation of cations on the surface of oxygen-reducing cathodes in the form of hydroxides and scale [66,67]. Cations such as Ca^{2+} or Mg^{2+} , which are commonly present in the culture, are sources of surface fouling of MFC cathodes by alkaline precipitation. The phenomenon will be all the stronger when OH^- ion production is high, that is to say it will become stronger as the current increases. In particular, this phenomenon may limit the performance of benthic MFCs because of the high proportions of these cations in seawater [68,69].

From the experimental point of view, even if the current provided by MFCs remains rather low in the present state of the art, chemical fouling of the cathode has already been observed [70,71]. A recent study has evidenced sodium carbonate and calcium carbonate deposits on the air-side and the water-side of an MFC air-cathode, respectively, and showed their major role in decreasing the cathode performance [72].

2.3.2. Deactivation by organic matter

In the absence of a separator, the cathode is exposed to the organic matter contained in the electrolyte. However, even when a separator is used, the cathode may be exposed to organic matter, e.g. fuel, which flows through the separator, depending on its nature. The mechanisms of deactivation of the cathode may be different for abiotic and microbial cathodes.

For abiotic cathodes, the presence of organic compounds can be a source of conventional inhibition. Metallic catalysts of oxygen reduction, such as platinum, are known to be very sensitive to organic pollution [73]. The formation of mixed potentials due to simultaneous catalysis of oxygen reduction and the oxidation of organic compounds also results in a lowering of the cathode performance [74]. Biocathodes using pure enzymes as catalysts can be affected by the same kind of inhibition mechanism [75] as, similarly to metallic catalysts, enzymes are known to be very sensitive to inhibition.

Cathodes generally work in non-sterile conditions. If they are provided with organic compounds, a biofilm develops on the cathode surface, which can hinder mass transfers to or from the electrode [76,77]. When an air-cathode is used, the parasitic biofilm can develop either on the side exposed to the electrolyte or on the side exposed to air. In the first case, mass transfer of the OH^- ions (Reaction (3)) from the surface [70,78] is hindered by the biofilm; in the second case biofouling hinders the mass transfer of oxygen to the catalyst [78,79]. Nevertheless, in some cases, the biofilm has been observed to become virtuous by acquiring oxygen electrocatalytic ability [80].

For microbial cathodes, the presence of organic compounds can lead the oxygen-reducing electroactive bacteria to preferentially use the fuel, rather than the cathode, as the electron donor [81]. This phenomenon is similar to the deactivation of microbial anodes by the presence of oxygen. On the other hand, the presence of both oxygen (electron acceptor) and organic matter (possible electron donor) favours the development of non-electroactive bacteria, which can thicken the biofilm, disturb the electron transport mechanisms and slow down mass transfers.

2.4. Theoretical basis of ion transport in electrolytes and transport number

2.4.1. Importance of ion transport in the electrolyte bulk

The balance sheet of reactions (1) and (3) shows that positive charges are created at the anode, while the same quantity of negative charges is created at the cathode. To maintain electroneutrality, an equivalent amount of anions must be transported to the anode or cations to the cathode. The motion of ions through the electrolyte is the only way to carry electricity inside the MFC. If ion transport through the electrolyte is low, it can drastically limit the rate of electron transfer at the electrodes. Electron transfers at the electrodes cannot be faster than ion transport through the electrolyte.

In chemical hydrogen fuel cells, ion transfer is rather simple, because the protons produced at the anode by hydrogen oxidation migrate to the cathode where they are involved in oxygen reduction

(Reaction (2)) [82]. The flux of protons produced at the anode is equal to the flux of protons transported through the electrolyte and to the flux of protons consumed at the cathode.

In MFCs the situation is far more complex due to the specificity of the electrolyte imposed by microbial growth requirements (section 2.1). Around neutral pH, the contribution of protons and hydroxide ions to electricity carrying through the bulk is nil (see section 3.3.1); the anode produces protons, the cathode produces hydroxide ions, but other ions ensure ion transport through the electrolyte (Figure 1). As a result, a sharp pH split can occur between the anode zone, which acidifies (section 2.2), and the cathode zone, which alkalizes (section 2.3). The possible pH buffering of these two zones depends on the way buffer species are transported through the bulk. Moreover, the fuel, most often acetate or other dissociated volatile fatty acids, can also be involved in ion transport through the bulk. The flux of fuel to the anode and the detrimental effect of the fuel flux to the cathode (section 2.3.2) can thus be strongly impacted by their transport through the electrolyte. Similarly, the possible biofouling of the cathode by the precipitation of cations also depends on the way these cations are transported through the electrolyte.

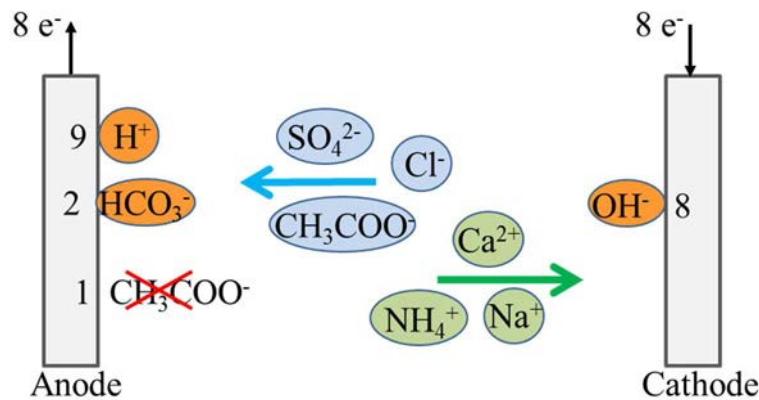


Fig. 1. Scheme of ion transport pattern in an electrolyte with a chemical composition roughly representative of wastewater with 5 mM sodium acetate added, pH 7.0: Na⁺ 6 mM, Ca²⁺ 3.2 mM, NH₄⁺ 3.6 mM, H⁺ 10⁻⁴ mM, CH₃COO⁻ 5 mM, Cl⁻ 4 mM, SO₄²⁻ 3.5 mM, OH⁻ 10⁻⁴ mM. Transport numbers were: Na⁺ 14.9 %, Ca²⁺ 18.9 % (z=2), NH₄⁺ 13.1 %, H⁺ 0 %, CH₃COO⁻ 10.1 %, Cl⁻ 15.1 %, SO₄²⁻ 27.8 % (z=2), OH⁻ 0%. For the scheme presented on the basis of 8 exchanged electrons, the transport numbers corresponded to molar flux around 1 ion for each species, except H⁺ and OH⁻. Ionic conductivity of the electrolyte was 0.20 S m⁻¹.

In summary, because of the low ionic conductivity of MFC electrolytes, ion transport may be a rate-limiting step of the electrochemical chain. Moreover, because of the neutral pH and the chemical complexity of the MFC electrolytes, ion transport through the bulk is at the crossroad of multiple fluxes, which directly impact the operating conditions of the electrodes. Ion transport through the electrolyte is clearly an essential step, which must be optimized if the objective is to design efficient MFCs.

2.4.2. Ion transport, general theory

The motion of the ionic species ensures current transport through the electrolyte(s), each ionic species carrying a current density (J_i) proportional to its charge:

$$J_i = z_i F \phi_i \quad (4)$$

where the subscript i refers to the species i , J_i is the current density (A m⁻²), z_i is the charge (e.g. +1 for Na⁺, -1 for Cl⁻), F is Faraday's constant (96 485 C.mol⁻¹), ϕ_i is the molar flux (mol m⁻² s⁻¹).

The molar flux of species i (ϕ_i) is described through the Nernst-Planck equation:

$$\phi_i(x) = -D_i \frac{\partial a_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (5)$$

where D_i is the diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), a_i is the activity (no unit), x is the distance along the X-axis, z_i is the charge, C_i is the concentration (mol m^{-3}), ϕ is the electrostatic potential (V), R is the gas constant ($8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T is the temperature (K) and v is the convective velocity along the X axis (m s^{-1}). Each term on the right hand side of Eq. (5) represents a specific mass transport mode: diffusion driven by the activity gradient, migration driven by the electrostatic potential gradient and convection due to the fluid motion, respectively:

$$\phi_i = \phi_{diff,i} + \phi_{mig,i} + \phi_{conv,i} \quad (6)$$

2.4.3. Ion transport in the bulk and transport number

In an MFC, steep activity gradients can occur in the vicinity of the electrode and separator surfaces. In contrast, in the bulk, far from the electrodes and separator, activity gradients are not so marked and, in absence of convection, the current is mainly driven by migration. Introducing the migration term into Eq. (4) gives the current density transported by each ionic species through the electrolyte, far from the separator and electrode surfaces:

$$J_i = J_{mig,i} = -\lambda_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} \quad (7)$$

Where λ_i is the molar ionic conductivity ($\text{m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$) defined as:

$$\lambda_i = D_i z_i^2 \frac{F^2}{RT} \quad (8)$$

Values of λ_i are available in the literature. The λ_i value of a given species depends on the ionic composition of the electrolyte because interactions between ions alter the mobility of each ion. This is the reason why λ_i are often given for pure electrolytes and extrapolated to infinite dilution (Table 1). In some cases, ion mobility u_i ($\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is given instead of λ_i , which is equivalent as $\lambda_i = z_i F u_i$.

Table 1. Molar ionic conductivities of cations λ^0_+ , and anions λ^0_- extrapolated to infinite dilution at 25°C [83]. Some tables available in the literature give the equivalent ionic conductivities ($\text{m}^2 \text{ S equiv}^{-1}$), which are equal to λ_i/z_i .

Cations	Molar ionic conductivity λ^0_+ ($10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$)	Anions	Molar ionic conductivity λ^0_- ($10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$)
Ca^{2+}	118.9	CH_3COO^-	40.9
Cu^{2+}	107.2	Cl^-	76.3
Fe^{2+}	108	CO_3^{2-}	138.6
H^+	349.6	HCOO^-	54.6
K^+	73.5	HCO_3^-	44.5
Mg^{2+}	106	H_2PO_4^-	36
Na^+	50.1	HO^-	198
NH_4^+	73.5	HPO_4^{2-}	114
Zn^{2+}	105.6	SO_4^{2-}	160

The current density passing through the reactor is the sum of the contributions of all species to ionic transport:

$$J = \sum_k J_k \quad (9)$$

so the part of the current that is transported through the electrolyte due to the motion of the ionic species i is given by:

$$t_i = \frac{J_{mig,i}}{J} = \frac{\lambda_i C_i}{\sum_k \lambda_k C_k} \quad (10)$$

and is called the transport number (or transference number) t_i . According to Eq. (9), the sum of the transport number of all the ionic species contained in an electrolyte is equal to unity:

$$\sum_k t_k = 1 \quad (11)$$

Finally, it should be mentioned that the denominator of Eq. (10) is the ionic conductivity, κ ($S\ m^{-1}$ or $\Omega^{-1}\ m^{-1}$), which measures the capacity of an electrolyte to ensure efficient ion transport:

$$\kappa = \sum_k \lambda_k C_k \quad (12)$$

Electrolytes can also be characterized by their ionic resistivity ρ ($\Omega\ m$), defined as the inverse of conductivity. For a homogeneous electrolyte with a cross sectional area A , through which the current is transported over a distance l , the resistance to transport encountered by the ionic species (R_{tot}) is:

$$R_{tot} = \rho \frac{l}{A} = \frac{l}{\kappa A} \quad (13)$$

Applying Ohm's law, the ohmic loss (η_{ohmic} , V) due to the current flow through the electrolytes is:

$$\eta_{ohmic} = \frac{l}{\kappa} J \quad (14)$$

and the power density lost (P_{lost} , $W\ m^{-2}$) is:

$$P_{lost} = \frac{l}{\kappa} J^2 \quad (15)$$

Eq. (15) shows that the power consumed by ion transport through the electrolyte increases as the square of the current density, meaning that it is essential to tackle ion transport when the objective is to design a commercial MET able to operate at high current density.

2.4.4. How to use transport numbers and balance sheets

Transport numbers are very useful parameters which, in a straightforward manner, give the contribution of each ionic species to current carrying in conditions where migration is the dominant mode. Curiously, it has rarely been used in the context of MFCs, although this is a basic concept in electrochemistry and in membrane separation science. An objective of this article is to show how this parameter can be helpful in understanding, predicting, modelling and opening tracks for MFC development. Particularly, transport numbers can be very helpful to anticipate the behaviour of an MFC (or any other MER) from the simple analysis of the electrolyte.

On the basis of the electrolyte chemical composition, the transport number of each ionic species can be calculated using Equation (10) with the molar ionic conductivities, which are reported in Table 1 for the most common ionic species contained in MFC electrolytes. These values correspond to infinite dilution and they should be corrected i to take the ionic interactions that occur in real solutions into

account. Nevertheless, such a correction can be omitted for not too concentrated solutions. A simple and relevant way to assess the relevance of the theoretical approach is to calculate the ionic conductivity of the electrolyte through equation (12) and to compare it with the experimental measurement. It is advisable to take the opportunity of this calculation to check the charge balance of the electrolyte composition, because experimental data coming from raw analytical measures sometimes do not meet charge balance requirements (see comment in section 3.3.5).

The transport numbers give the percentage of current that is transported by each species in the zones where migration is predominant, i.e. far from steep concentration gradients, in the absence of convection. This means in the bulk of the electrolyte, far from the electrode surface and far from the separator surface when there is one. Transport numbers thus give an immediate and accurate image of ion motion through the electrolyte. Another way of representation this is to transform transport numbers into molar mass fluxes ($\phi_{mig,i}$) which are directly proportional:

$$\phi_{mig,i} = \frac{t_i}{z_i} \cdot \frac{J}{F} \quad (17)$$

The main difference is the charge z_i . The transport number, which gives the percentage of current transported, is directly proportional to the charge of the species. For instance, with identical molar fluxes, a divalent species transports twice as much current as a monovalent one.

Finally, close to the electrode surface, mass transfers are the sum of the migration and diffusion effects (absence of convection). Mass balance sheets can be calculated using Equation (6). As a first approximation, it can be assumed that the transport numbers are identical in the bulk and in the diffusion layers near the electrodes. This hypothesis is fully valid if concentrations are high enough, so that only small changes in t_i are induced by the changes of local concentrations in the diffusion layers. The mass balance sheets give an accurate image of ion transport close to the surface of electrodes, which may be considered as essential if the objective is to characterize the electrode kinetics. The mass balance sheet indicates the actual operating conditions under which the electrode operates, which is very important information if the objective is to characterize or optimize the electrode kinetics.

Such a theoretical approach is illustrated in detail in sections 3.3.1, 3.3.2 and 3.3.5 in the absence of separator and then recalled in sections 5 and 6 for each type of ion-selective separator.

2.4.5. MFC performance assessment

The essential objective of an MFC is to produce power. The main performance criterion is consequently the maximum current or the maximum power produced. Current and power are extensive variables, which depend on the electrode surface, and performance is generally expressed as current density (J_{max} , A m⁻²) or power density (P_{max} , W m⁻²) with respect to the geometrical surface area of one of the electrodes. The two values are connected by the cell voltage (U_{cell}):

$$P_{max} = U_{cell} \cdot J_{max} \quad (18)$$

When three-dimensional electrodes are implemented, these values are expressed with respect to the volume of the electrode (A m⁻³; W m⁻³).

The MFC efficiency with respect to fuel consumption is measured by the Faradic yield, often called Coulombic efficiency (CE) in the MFC field. CE expresses the percentage (%) of the fuel that is actually transformed to electricity. CE is the ratio of the electrons that flowed through the electrical circuit

during a given period of time (obtained by integrating the current) to the total amount of electrons that can be provided by the fuel consumed during the same period of time.

Several other criteria exist to assess MFC performance, particularly when the MFC has some other objective in addition to power production, such as effluent treatment, desalination, water reclamation, biosensing, etc. Nevertheless, the P_{\max} or J_{\max} and CE criteria are the most universal and the present review uses them as the basis for comparison.

3. Separator-less MFC

3.1. Why chemical gradients of fuel and oxygen are required in the electrolyte

Theoretically, both electrodes of a fuel cell could operate in exactly the same medium if each electrode was able to drive the reaction it is intended for. Selective electrodes, which are able to operate in this way, have been designed in enzymatic biofuel cells. Different enzymes are immobilized on the anode and cathode surfaces, which drive the electrode towards oxidation or reduction, respectively. For example, in enzymatic biofuel cells, the enzyme glucose oxidase wired on the anode surface and bilirubin oxidase or laccase immobilized on the cathode surface make both electrodes so selective that two electrodes can thus operate in the same electrolyte [84,85], fruit juice [86] or physiological fluids [87,88] for example, which contains uniform concentrations of both glucose and oxygen.

Unfortunately, similar selective electrodes are not available in the MFC field yet. As described in the sections 2.2.2 and 2.3.2, microbial anodes are very sensitive to the presence of oxygen and oxygen-reducing cathodes can be considerably disturbed by the presence of organic matter. To overcome these numerous detrimental effects, the anode must be immersed in an electrolyte that contains the fuel but no oxygen, while the cathode must be exposed to an environment rich in oxygen and free of fuel. Actually, no separator is required in between if the concentration gradients can be maintained between the anode and cathode zones.

3.2. Principle and limit of separator-less MFCs

Benthic MFCs are typical separator-less devices. The bioanode is immersed in anaerobic sediments rich in organic compounds and the cathode is in the overlying oxygenated seawater. The concentration gradients are maintained by taking advantage of the natural stratification of the water column caused by gravity [89,90]. Aerobic microorganisms that live in the intermediate zone between anode and cathode consume the dissolved oxygen and protect the bioanode from detrimental oxygen impact. The intermediate zone also prevents the organic compounds contained in the sediments from reaching the cathode.

In laboratory MFCs, a similar intermediate zone, in which fuel and oxygen are consumed by aerobic bacteria, also occurs between anode and cathode. This aerobic consumption of fuel can cause a considerable decrease in CE. Liu and Logan measured a CE around 40-55% in the presence of a separator that prevented oxygen from reaching the anode compartment, whereas the CE fell to 9-12% when the separator was removed [76].

In separator-less MFCs, the inter-electrode distance must be large enough to prevent oxygen from reaching the anode and the substrate from reaching the cathode. However, increasing the inter-electrode distance increases the ionic resistance (Eq. (13)) and consequently the ohmic drop (Eq. (14)) and the power density lost (Eq. (15)). This is not too much of a problem in benthic MFCs because they

display low current densities and the ionic conductivity of marine sediments and seawater is high. The resulting ohmic drop remains low even with significant inter-electrode distance [91].

3.3. Interest of separator-less MFCs and how to develop them

Except in the specific case of benthic MFCs, which work in a saline electrolyte with modest current density, increasing the inter-electrode distance to ensure chemical gradients is a major hindrance for ion transport. Nevertheless, separator-less MFCs are not devoid of interest and have been widely used at the laboratory level [76,92,93]. Actually, using a separator between anode and cathode significantly increases the technical complexity of the device. It may require onerous maintenance for long-term industrial applications [94] and may be the source of a significant increase in the investment cost, particularly if membranes are implemented. The simplicity of separator-less MFCs is certainly an essential advantage that would deserve further development.

In our opinion, a clear distinction should be made between the interactions that can deactivate the electrode kinetics (section 2.2.2 and 2.3.2) and the parasite consumption of fuel and oxygen. The former must imperatively be avoided because they impact the essential function of an MFC. In contrast, parasite fuel consumption, which only results in decreased CE [95], may be not so detrimental for some applications, such as the treatment of effluents. When the most important target is to lower the level of an organic compound, for example, it can be accepted that some of the organic compound is not used to produce electricity but to ensure better operation of the MFC by ensuring the required chemical gradients between the anode and cathode. Thus, the necessity to sustain chemical gradients in the MFC would be paid for by the consumption of part of the fuel.

Further development of separator-less MFCs should be aimed at controlling the zone where aerobic microorganisms consume oxygen and fuel. The simplest way would be to space the electrodes far enough apart to be sure that consumption of oxygen and/or fuel is completed. However, the larger the electrode spacing, the higher the internal resistance and ohmic drop (Eq. (13) and (14)) [96,97].

To be more efficient, it may be possible to anchor the microorganisms to a highly porous intermediate structure (Fig. 3.B). This porous structure would be technically less demanding than a conventional separator, because it would be solely intended to favour the development of an intermediate aerobic biofilm without strict sealing or other complex function. It would also introduce a smaller internal resistance because, with a largely open structure, the intermediate zone should have a conductivity close to that of the electrolyte. The objective would be to favour the development of an intermediate anaerobic biofilm achieving the chemical gradients of oxygen and fuel in a layer as narrow as possible. The intermediate aerobic biofilm would protect the bioanode against oxygen and the cathode against organic matter and the related inhibition effects (see section 2.3.2). In most cases, the fuel flux should be greater than the oxygen flux, so it may be useful to provide this layer with oxygen. Investigating this new concept in depth would consequently lead researchers to reconsider the MFC design and operating procedure.

We propose that this concept be named “Microbial separator”. Such a microbial separator has sometimes been observed to develop spontaneously in MFCs, for example in the form of an aerobic biofilm that grows on the cathode surface [80,98,99] or on the J-cloth used as a separator [100] (section 6.5). Until now, microbial separators have formed spontaneously on surfaces that were not initially provided for this purpose. Nevertheless, the positive effect on MFC performance is observed. Dedicated research work should now aim at optimizing the support structure and its location inside

the MFC, particularly by separating the microbial separator from the cathode surface to avoid the detrimental effect on OH^- mass transfer. It should be thus possible to gain considerable power production, at the price of fuel consumption.

3.4. Ion transport in separator-less MFC: numerical illustration

Current transport is illustrated with an electrolyte of pH 7.0 composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate, with or without addition of KCl, a medium commonly implemented in MFC laboratory experiments. This numerical illustration, proposed throughout the study, is made on the basis of a very simple medium, which is representative of a large number of MFC studies performed in laboratory conditions. The electrolyte is assumed to be quiescent and calculations are made on the basis of an initial state with uniform concentration of each species, as is the case when starting a batch cycle, for instance. The concentration of the anode product, e.g. HCO_3^- (Reaction (1)), is assumed to be nil.

3.4.1. Current transport in the bulk

The transport numbers (Table 2) show that current is mainly carried in the bulk by migration of K^+ ions towards the cathode (61%) and, to a lesser extent, by migration of phosphate ions to the anode (35%). Neither H^+ nor OH^- contributes to current carrying in the bulk. Contrary to what has too often been thought intuitively and by analogy with hydrogen fuel cells (section 2.4.1), protons and hydroxide ions play absolutely no role in current carrying.

Table 2. Transport numbers in an electrolyte composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate, pH 7.0. Calculations were made with Eq. (10) with the equivalent ionic conductivities, λ_{0i} , extrapolated to infinite dilution (Table 1) without correction for concentrations. A) The total ionic conductivity (κ) calculated with Eq. (12) was 0.95 S m^{-1} ; B) Same electrolyte with 100 mM KCl added; the total ionic conductivity was 2.45 S m^{-1} .

Species i	Concentration C_i (M)	$t_i \times 100$ (percentage)
(A) Phosphate 50mM pH 7.0 and potassium acetate 10mM		
H^+	10^{-7}	3.7×10^{-4}
OH^-	10^{-7}	2.1×10^{-4}
H_2PO_4^-	31×10^{-3}	12
HPO_4^{2-}	19×10^{-3}	23
CH_3COO^-	10×10^{-3}	4
K^+	79×10^{-3}	61
(B) Solution (A) with 100 mM KCl added		
H^+	10^{-7}	1.4×10^{-4}
OH^-	10^{-7}	8.1×10^{-5}
H_2PO_4^-	31×10^{-3}	5
HPO_4^{2-}	19×10^{-3}	9
CH_3COO^-	10×10^{-3}	2
K^+	179×10^{-3}	54
Cl^-	100×10^{-3}	31

This important conclusion can be demonstrated in a more general way. With a medium at pH 5, which can be considered as the acidic limit below which most microbial anodes are no longer able to operate,

the conductivity due to protons ($\lambda_{H^+} \cdot C_{H^+}$) is equal to $3.5 \cdot 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ (λ_{H^+} in Table 1, $C_{H^+} = 10^{-2} \text{ mol m}^{-3}$). For protons to be responsible for more than 1% of the current transport through the bulk, the transport number t_{H^+} must be greater than 0.01. Eq. (10) indicates that, for the transport number of the proton to be higher than 1%, with $\lambda_{H^+} \cdot C_{H^+} = 3.5 \cdot 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$, the conductivity of the medium (Eq. (12)) must be lower than 0.035 S m^{-1} . Consequently, protons do not contribute to current transport at pH equal to or higher than 5 for conductivity higher than 0.035 S m^{-1} . This value is very low, lower than in any electrolyte used in MFCs or other MERs so far, and it would preclude any efficient electrochemical process. It can be concluded that, for such time as acidophilic microbial anodes are not implemented, proton transport makes no contribution to current transport in the bulk of the electrolyte. An exception to this statement concerns osmotic MFCs. In this case, due to the massive rejection of all other ions, protons play the key role in current transport, but large scale development would be limited by the low concentration of protons (see section 5.4.1) [101,102].

It should consequently be strongly recommended to abandon reasoning with proton transport in the bulk when the objective is to develop MFCs that operate around neutral pH. This way of thinking has already been adopted by several research groups [40,65,78,103,104] but a large number of studies still aim at improving the proton transfer capability of proton exchange membranes with the objective of improving MFC power production. The large number of recent studies in this direction [105–109] incited to stress this issue here.

The mass transfer balance sheet presented in Fig. 2.A was achieved on the basis of 100 electrons exchanged through the external circuit per arbitrary unit of time. The molecular fluxes corresponding to 100 electrons exchanged per unit of time were calculated from the transport number according to Eq. (17).

3.4.2. Balance sheet close to the electrode surfaces and buffering

Close to the surface of the electrodes, concentration gradients are created by the electrochemical reactions and diffusion significantly impacts the mass transfer balance. In the absence of convection, each mass flux is the sum of the diffusion and the migration contributions (Eq. (6)). It was assumed here that the transport numbers were identical in the bulk and in the diffusion layers near the electrodes. This hypothesis is valid if concentrations are high, so that only small changes in t_i are induced by the changes of local concentrations in the diffusion layers.

The cathode provided with oxygen and water produced 100 OH^- ions per unit of time (Reaction (3)). For the sake of simplicity, the acid-base equilibrium of the phosphate species was assumed to be instantaneous:



and the possible involvement of the HCO_3^- ions was not taken into account in the acid-base balance, so the 100 OH^- ions produced roughly resulted in the consumption of 100 H_2PO_4^- and the production of 100 HPO_4^{2-} . According to the values of the transport numbers, migration expelled 12 H_2PO_4^- and 11.5 HPO_4^{2-} ions from the cathode surface. Consequently, to maintain the steady state, diffusion had to provide the electrode with 112 H_2PO_4^- and to remove only 88.5 HPO_4^{2-} ions. Near the cathode surface, the diffusion and migration fluxes of the H_2PO_4^- ions are opposite, while diffusion and migration cooperate to remove the HPO_4^{2-} ions produced. The ions whose concentration is not affected by the

electrochemical reaction (e.g. Ac^- and K^+ on the cathode surface) must have a nil balance sheet, and diffusion must compensate the effect of migration.

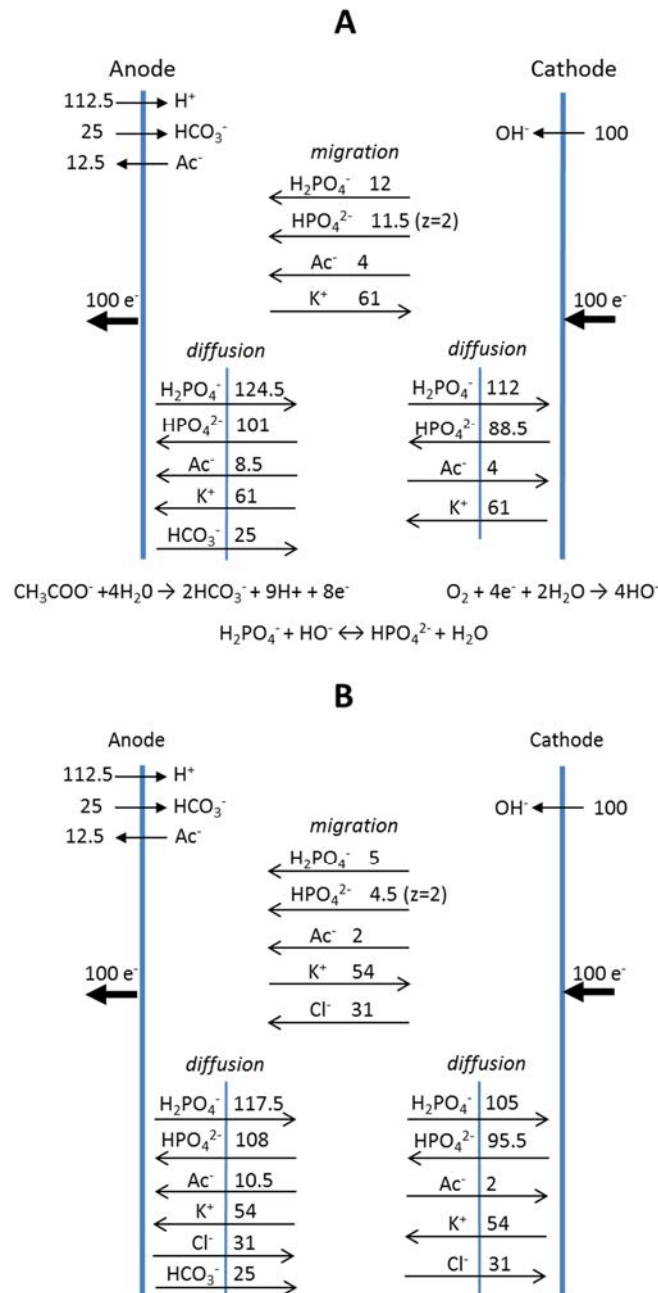


Fig. 2. Balance sheet without separator or with a non-selective separator. Molecular fluxes were calculated on the basis of 100 electrons exchanged per arbitrary unit of time. In the bulk, migration is assumed to be the dominant transport mode. Both migration and diffusion occur near the electrode surfaces. Transport numbers can be found in Table 2. A) The electrolyte is composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate. B) Same electrolyte with 100 mM KCl added.

At the anode, to sustain the steady state with 100 electrons extracted per unit of time, 12.5 acetate molecules must be supplied to the anode (Reaction (1)). Only 4 acetate molecules are provided by migration. An additional 8 acetate molecules must be supplied by diffusion. Besides, 25 HCO_3^- and 112.5 H^+ are produced per unit time by acetate oxidation (Reaction (1)). The balance on phosphate

ions is done in the same manner as for the cathode. In this case, migration hinders the motion of the H_2PO_4^- ions away from the anode, which must be compensated by diffusion.

The balance sheet shows that buffering is mainly ensured by diffusion of the phosphate species near the surface of the electrodes. Migration has only a slight effect on buffering. Actually, by moving H_2PO_4^- from the cathode towards the anode, migration makes a detrimental contribution to the buffer effect which, on the contrary, requires H_2PO_4^- to be driven away from the anode towards the cathode.

3.4.3. Effect of adding a supporting salt (Table 2.B, Fig. 2.B)

If 100 mM KCl is added into the electrolyte, migration of K^+ always makes the main contribution to current transport in the bulk (54%). The contribution of the phosphate ion migration is reduced to 14% because migration of Cl^- takes charge of 31% of the current transport. As can be expected, the supporting salt ensures a significant part of current transport in the bulk and reduces the contribution of the other ionic species. This can also be seen by calculating the ionic conductivity, which is significantly increased from 0.95 to 2.45 S m^{-1} by the addition of 100 mM KCl. The ohmic drop should thus be divided by a factor greater than 2.

The balances drawn up close to the electrode surfaces (Fig. 2.B) give similar mass fluxes to the previous ones. The negative/positive effects of migration of the phosphate species on buffering are attenuated, as can be expected when adding a supporting salt.

3.4.4. Evolution of pH and ionic concentrations in an MFC during operation

In an operating MFC, the pH decreases near the anode (Reaction (1)), while it increases near the cathode (Reaction (2)). This phenomenon has often been confirmed experimentally [103,110,111]. The numerical illustration calculated with the initial concentrations of the buffering species showed that, in the bulk, migration moves both H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} ions towards the anode with approximately equal molecular fluxes. On the basis of 100 electrons passing through the system, the conditions considered in Fig. 2.A led to 12 and 11.5 molecules of H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} respectively. Only 11.5 molecules of HPO_4^{2-} are carried by migration to the anode, while 112.5 protons are produced. Migration cannot efficiently mitigate anode acidification. Diffusion of HPO_4^{2-} must contribute strongly to pH balance, but diffusion is not a fast process and is not proportional to the current density. Consequently, the local acidification of the anode biofilm is moderately mitigated by migration of buffering species and is strongly dependent on diffusion. This would become a major hindrance if the objective is to provide high current density.

This situation is even aggravated by the addition of 100 mM KCl (Fig. 2.B). In this case only 4.5 molecules of H_2PO_4^- are moved towards the anode by migration. Adding a supporting salt improves the global ion transport and decreases the ohmic drop but, in return, it decreases the capacity of the bulk to fight against anode acidification.

One way to enhance pH balance inside the cell would be to create convective mass transport by stirring or circulating the electrolyte [39]. Nevertheless, it should be kept in mind that stirring or circulating costs energy, more energy than the MFC could produce as the state of the art stands at the moment. This solution may be suitable only for specific cases.

This situation with phosphate occurs because, around neutral pH, the two species involved in buffering are negatively charged (H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} , reaction (18)). They are both driven towards the anode by migration. A different pattern would be found if a form of the buffer was not charged:



In this case, only the alkaline form (A^-) is driven by migration towards the anode, which should result in a better mitigation of bioanode acidification.

For the same reason, Logan's group has recently shown that positively-charged non-dissociated buffers (AH^+):



are more efficient than non-charged or negatively-charged buffers to mitigate alkalinization of oxygen-reducing cathodes (Reaction (3)) [112]. Obviously, a positively-charged buffer would not be suitable for controlling the bioanode pH, but a multi-species buffer may be envisioned, including a non-charged compound and a positively-charged compound to optimally mitigate both bioanode acidification and cathode alkalinization.

The pH balance inside MFCs, or any other MER, is a major source of current limitation. When the objective is to maximize the power produced by MFCs, this issue definitely deserves dedicated studies. In this context, transport numbers in the bulk and balance sheets at the surface of electrodes would be the essential theoretical tools to optimize ion transport for pH balance. Experimental validation of the theoretical prediction is then required, at least to check whether the microorganisms accept the nature and concentration of the buffers.

3.4.5. Numerical illustration with wastewater used as electrolyte

This review does not intend to review all the possible MFC electrolytes but aims at developing a general theoretical rationale that can then be used for other cases. The numerical illustration made throughout the study with a phosphate buffer solution, supplemented or not with KCl, corresponds to the majority of laboratory studies reported so far. An additional short numerical illustration is given here relating to the field of wastewater treatment, a possible application domain for MFCs (Table 3). The transport numbers were calculated as previously with Eq. (10) from the data gathered in Table 1.

The majority of the electricity (35.9%) was carried through the electrolyte by the movement of Cl^- ions. This example confirms that the capacity of migration to mitigate bioanode acidification depends on the pH of the bulk. In this case, migration drove a larger amount of HPO_4^{2-} than H_2PO_4^- towards the anode, which is an advantage to attenuate the anode acidification. Nevertheless, the transport numbers show that pH balance will be modest as only 3.1% of the current was transported by the HPO_4^{2-} ions. In return, migration was less effective in expelling negative charges from the cathode zone. This is a strong disadvantage here because of the quantities of Ca^{2+} ions contained in wastewaters. The Ca^{2+} ions carried a considerable proportion of the electricity (18.5 %) by moving to the cathode. The poor efficiency of phosphate species in balancing the pH of the cathode zone and the large flux of Ca^{2+} ions converge to predict fast cathode fouling because of the formation of scale. This illustration shows how transport numbers can help to predict some aspects of MFC behaviour from the simple analysis of the electrolyte composition.

Table 3. Transport numbers in an electrolyte composed of wastewater. The ionic composition was extracted from Le Bonté et al. 2008 [113], with a pH value averaging 7.8. Calculations were made using Eq. (10) with the equivalent ionic conductivities, λ_{0i} , extrapolated to infinite dilution (Table 1) without correction for concentrations.

Species <i>i</i>	Concentration C_i (M)	$t_i \times 100$ (percentage)
H ⁺	1.6×10^{-8}	4.1×10^{-4}
OH ⁻	6.3×10^{-7}	9.2×10^{-3}
Ca ²⁺	2.1×10^{-3}	18.5
K ⁺	0.26×10^{-3}	1.4
Mg ²⁺	0.33×10^{-3}	2.6
Na ⁺	3.1×10^{-3}	11.5
NH ₄ ⁺	1.8×10^{-3}	9.8
Cl ⁻	6.34×10^{-3}	35.9
H ₂ PO ₄ ⁻	0.08×10^{-3}	0.2
HPO ₄ ²⁻	0.37×10^{-3}	3.1
SO ₄ ²⁻	1.42×10^{-3}	16.9

From a practical point of view, looking for data to present this numerical illustration, pointed out the difficulty to obtain an exhaustive list of the ionic contents of wastewaters; often, the existing data were not balanced from the point of view of charges. In the present case, it was necessary to multiply by a factor of 1.67 the anion concentrations reported in the article to reconcile the experimental data with charge balance. The calculated ionic conductivity, κ , of 0.13 S m^{-1} was consistent with the average experimental value of 0.11 S m^{-1} . In the context of MFC development for wastewater treatment, and given the great impact of ion transport on MFC behaviour, preliminary analytical work to determine the ionic composition of wastewaters would be most helpful.

4. Functions of a separator in MFC

4.1. The ideal separator and even more

The role of the separator is to overcome the lack of selectivity of the electrodes used in MFCs. It must allow two zones with different chemical compositions to be maintained inside an inter-electrode space that is as narrow as possible. Basically, an ideal MFC separator designed for maximizing power production would (Fig. 3.A):

- 1) prohibit the transfer of oxygen to the anode,
- 2) prohibit the transfer of the fuel and other organic matter to the cathode,
- 3) not introduce any resistance to the transfer of ionic species.

In practice, it should not be forgotten that a separator cannot fully validate condition 3. In all cases, a separator introduces resistance to the mass transfer for each species, including ions. It is essential to keep in mind that any separator introduces additional resistance to ion transport. According to Eq. (14) and (15), the function of a separator is to maintain chemical gradients while reducing the distance l to a minimum and keeping a reasonable value of κ inside the separator.

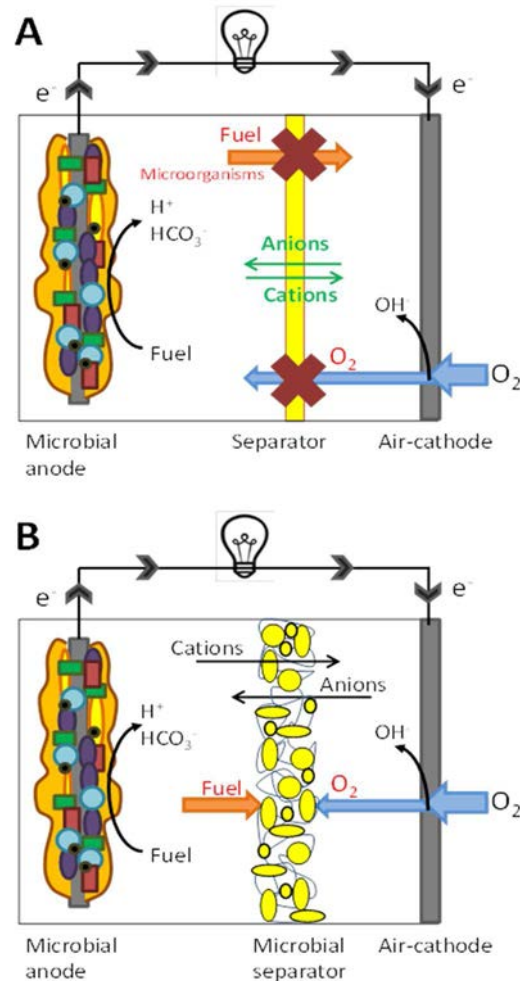


Fig. 3. Two-compartment air-cathode MFC. A) The main functions of a separator should be to avoid oxygen transfer to the bioanode, to avoid fuel transfer to the cathode and to put up the smallest possible resistance to ion transfers. **B)** These functions may also be ensured by an intermediate microbial layer implementing aerobic microorganisms, which would consume part of the fuel.

Many separators are able to modulate the resistance to mass transfer according to the size and/or the charge of the compounds. Thanks to the capacity of these separators to impact ion transports, additional functions can be attributed to them. For example, they could also:

- 4) protect the cathode against (bio-)fouling,
- 5) allow the MFC target to be enlarged far beyond the simple production of electricity. This is typically the case with ion-exchange membranes, which push the MFC towards specific operational strategies. MFC devices have thus been designed for water desalination [114–116], selective removal of ions [117], reverse electrodialysis [118,119], effluent denitrification [120,121], ammonium recovery [122,123], effluent treatment by alkalization [124], etc. Osmosis membranes can also be implemented to add a water reclamation objective [101] (see section 5.4). Such specific functions would deserve a dedicated theoretical approach, which is beyond the scope of the present article.

Depending on the nature of the cathode, the main purpose assigned to the MFC (to optimize power density, to increase CE, to maximize an effluent treatment, to abate the concentration of a given compound, etc.), or the type of process that may be associated with the MFC, many configurations have been reported to implement separators in MFCs. The different MFC designs have been reviewed elsewhere [31,125,126] and are not detailed here. It can just be recalled that the most recent

configurations include a separator-electrode assembly (also called membrane-electrode assembly), in which the separator is sandwiched between the anode and the cathode [127,128]. This technology should be a very promising way to reduce the ohmic drop by reducing the inter-electrode distance to its minimum.

4.2. Separator characteristics and classification

The literature reports a wide diversity of separators tested in MFCs. They can be divided into two major categories: non-porous and porous separators. Table 4 gives a basic classification ranging from the most compact non-porous membranes to the most porous separators. Following this classification, each type is analysed thereafter with respect to its impact on ion transport.

Table 4. Separator classification according to the membrane type, the pore diameter and the rejected species. From [129,130].

Type	Ion Exchange Membrane (IEM)			Reverse and Forward Osmosis (RO / FO)	Nano-Filtration (NF)	Ultra-Filtration (UF)	Micro-Filtration (MF)	Macro-Filtration
	Cation Exchange Membrane (CEM)	Anion Exchange Membrane (AEM)	Bipolar Membrane (BPM)					
	Non porous					Porous		
	Ion-selective			Non ion-selective	Ion-selective	Non ion-selective		
Pore diameter (Å)	/				10-100	100-1000	1000-10 ⁴	> 10 ⁴
MWCO (Da)	/				250-2000	2000-500,000		/
Smallest rejected species	Atoms			Monovalent and divalent ions	Small particles, Sugars, Aqueous salts	Proteins, Polysaccharides, Viruses	Solids, Bacteria	Macro-particles, Colloids, Granules
Observation technique	Transmission Electron Microscopy				Scanning Electron Microscopy	Optical microscopy	Naked eye	

5. Non-porous separators

Table 5 gathers together the characteristics of non-porous separators used in MFCs so far. As it is crucial to prohibit oxygen transfer to the bioanodes, many studies have focused on oxygen diffusion through the membranes, with pretty dispersed results. A quick glance at this table gives an idea of the difficulty of extracting firm, universal conclusions from experimental studies carried out with different experimental set-ups, different microbial systems and different conditions. Nevertheless, an attempt is made here to analyse these experimental data in the light of the theory.

Table 5. Characteristics of non-porous membranes reported in the MFC literature. Both manufacturer's data and parameters calculated from experimental data, such as mass transfer coefficients, are given. Manufacturer's data are indicated by an asterisk *.

Membrane	Composition	Thickness (mm)	Ohmic resistance ($\Omega \text{ cm}^2$)	Oxygen mass transfer k_o (cm s^{-1})	Oxygen diffusion coefficient D_o ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Acetate mass transfer k_A (cm s^{-1})	Acetate diffusion coefficient D_A ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Ion exchange capacity (meq g^{-1})
Cation exchange membranes (CEM)								
Nafion 117, Dupont Co., USA	Chemically stabilized perfluoro-sulfonic acid/PTFE copolymer in the acid form negatively charged sulfonate groups	183*	15 in 0.5 M NaCl * 1.5 [131] 9.2 in 0.05 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 [132]	1.3×10^{-4} [133] 2.8×10^{-4} [134] 2.8×10^{-5} [135] 8×10^{-5} [136] 0.3×10^{-4} [137] 4.3×10^{-4} [138] 7.5×10^{-5} [139]	2.4×10^{-6} [133] 5.35×10^{-6} [134] 4.2×10^{-7} [135] 0.55×10^{-6} [137] 8.2×10^{-6} [138] 1.4×10^{-6} [139]	4.3×10^{-8} [133]	0.82×10^{-9} [133]	0.95 to 1.01 * 1.23 [136]
CMI 7000, Membrane Inc., USA	Gel polystyrene cross linked with divinyl-benzene, sulphonic acid groups	450*	< 30 in 0.5 M NaCl * 45.1 in 0.05 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 [132]	0.94×10^{-4} [133] 0.1×10^{-4} [138] 2×10^{-5} [139]	4.3×10^{-6} [133] 9.8×10^{-6} [138] 0.9×10^{-6} [139]	1.4×10^{-8} [133]	0.66×10^{-9} [133]	1.6 *
SPEEK	Sulfonated poly(ether ether ketone)	180 [136]			4×10^{-6} [136]			1.47 [136]
SPEEK + 7.5% TiO_2	Modified SPEEK membranes by incorporating TiO_2	180 [136]			2.2×10^{-6} [136]			1.98 [136]
SPEEK + 7.5% SiO_2	Modified SPEEK membranes by incorporating SiO_2	120 [140]			0.84×10^{-6} [140]			1.80 [140]
Anion exchange membranes (AEM)								
AMI-7001, Membrane International Inc., NJ	Gel polystyrene cross linked with divinyl-benzene, quaternary ammonium groups	460*	< 40 in 0.5 M NaCl *	0.94×10^{-4} [133] 1.6×10^{-4} [141] 0.1×10^{-5} [142]	4.3×10^{-6} [133] 3.1×10^{-7} [141] 3×10^{-7} [142]	5.5×10^{-8} [133] 4.6×10^{-8} [141] 4.7×10^{-8} [142]	2.6×10^{-9} [133]	1.3 *
Ralex AEM-PES, MEGA a.s., Czech Republic	Polyester with polyethylene binder quaternary ammonium group	450 (dry) * 750 (swelled) *	< 7.5 in 0.5 M NaCl *					1.8 [131]
AFN, Tokuyama Co., Japan	Quaternary ammonium group	150-180 [131]	0.2-1 in 0.5 M NaCl [131]	1.26×10^{-4} [143]	1.9×10^{-6} [143]			3.2 * 2-3.5 [131]

AM1, Tokuyama Co., Japan		120-160 [131]	1.3-2 in 0.5 M NaCl [131]	0.98×10^{-4} [143]	1.4×10^{-6} [143]			1.8-2.2 [131]
ACS, Tokuyama Co., Japan		120-200 [131]	3-6 in 0.5 M NaCl [131]	0.65×10^{-4} [143]	1.2×10^{-6} [143]			1.4-2 [131]
FAD, Fumasep	Poly(ether ether ketone) (PEEK) reinforced and non- reinforced films	80-100 *	< 1 in 0.5 M NaCl * 1.2 [131] 12.4 in 0.05 M K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ [132]					> 1.5 * 1.3 [131]
QPEEK-AEM	AEM quaternized PEEK	0.2 [141]		2.1×10^{-4} [141]	4.8×10^{-8} [141]	5.2×10^{-8} [141]		1.39 [141]
LeHoAM-III Hangzhou Lvhe Environme ntal Technology Co., Ltd, China		240 [137]		0.05×10^{-4} [137]	0.11×10^{-6} [137]			
TiO ₂ - QAPVA hybrid AEM	Organic-inorganic hybrid AEM synthesized with quaternized poly(vinyl alcohol) (QAPVA) and inorganic TiO ₂	43 [137]		0.05×10^{-4} [137]	0.02×10^{-6} [137]			
QPEI-AEM	AEM-quaternized poly(ether imide)	0.03 [142]		2.3×10^{-5} [142]	4.7×10^{-7} [142]	4×10^{-8} [142]		0.968 [142]
Bipolar membrane (BPM)								
FBM, Fumasep	Mechanical reinforcement SPEEK monofil	180 *	< 3 in 0.5 M NaCl *					

5.1. Cation exchange membrane (CEM)

Cation exchange membranes (CEMs) contain negatively charged groups, such as $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{PO}_3^{2-}$ or $-\text{PO}_3\text{H}^-$, fixed to the membrane backbone, which gives them a selective permeability for cations [144]. CEMs include proton exchange membranes (PEMs), which are specially designed to allow proton transfer and to oppose a high resistance to the transfer of all other ions.

5.1.1. Basics on ion transport controlled by CEM

Theory indicates that protons are not involved in current carrying in MFCs (section 3.3). Consequently, the use of a PEM in an MFC can hardly be justified except if microbial anodes could operate at very low pH. Unfortunately, to our knowledge, acidophilic bioanodes still remain poorly developed [47,145,146] and it remains a worthwhile challenge to develop such efficient bioanodes. Much work has been carried out to improve the proton exchange capacity of PEMs [105,107] [108,109], with some successes in terms of MFC performance [147]. Nevertheless, the objectives and results should not be

discussed in terms of proton transfer, when improvement was related to the transfer of other cations present in solution (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc.) as confirmed experimentally [103,111,133].

The buffer ionic species $H_2PO_4^-$ and HPO_4^{2-} are strongly retained by a CEM. By prohibiting the diffusion of the buffer ionic species between the anode and cathode compartments, a CEM severely hinders the pH balance in an MFC implemented with phosphate buffer. The balance sheet calculated in the presence of a CEM (Fig. 4) shows that the whole current results from the motion of the K^+ ions. If KCl is added as a supporting salt, part of this desirable action is lost because the Cl^- ions cannot take part in the current transport. The balance sheet also demonstrates that the anode compartment tends to be deionized, while the ionic concentration of the cathode compartment increases.

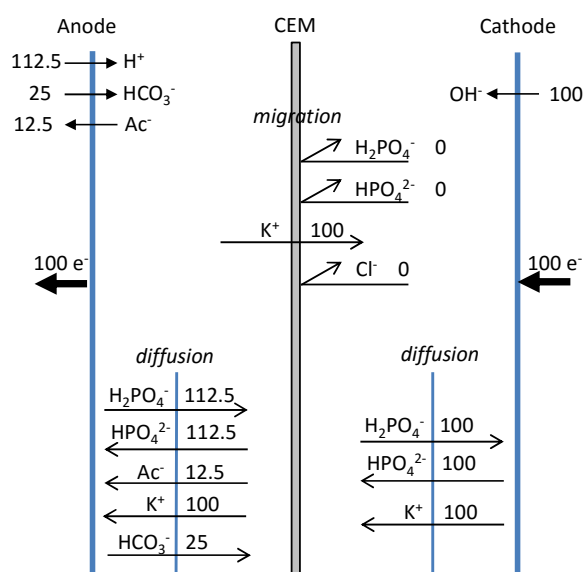


Fig. 4. Balance sheet of the molecular fluxes with a cation exchange membrane (CEM). The electrolyte is composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate. It is assumed that no acetate was initially put into the cathode compartment.

In long-term operation, complex ion transport situations can occur. Electro-osmosis, due to the transport of the water molecules that compose the K^+ solvation layer [148,149] should be taken into account. Ultimately, the K^+ concentration gradient will drive a backward diffusion flux that will oppose migration and hinder MFC operation. The gradient in water activity caused by K^+ migration may also lead to the diffusion of water from the anode to the cathode compartment by osmosis. The long-term ion transport would deserve a dedicated analysis, with the same theoretical tools as used here, by taking the modification of the chemical composition in each compartment into account.

Basic analysis of ion transport points out numerous drawbacks that make it hard to justify using a CEM in an MFC, except for specific cases. For instance, the CEM can ensure the function of fuel retention in the anode compartment perfectly when the fuel is in anionic form (see section 5.2.2). If saving fuel is seen as essential, using a CEM may be justified. Similarly, when the objective is to couple power generation with another function, such as desalination [114,116] or other kinds of separation processes [34], CEM can also be fully relevant. The balance sheet (Fig. 3) shows that cations can easily be extracted from the electrolyte, which may be essential when a separation function is assigned to the MFC (see point 5 in section 4.1). Nevertheless, except in such specific cases, which deserve a

dedicated theoretical analysis, blocking the motion of anions by a CEM is a major drawback for conventional MFCs.

5.1.2. CEM in the MFC literature

Among CEMs, PEMs have been particularly used in MFCs, probably by analogy with PEMFCs. Nafion membranes from Dupont are the most commonly used PEMs. They offer high proton conductivity due to sulfonate groups fixed on an inert backbone (PTFE-like skeleton) [134]. They are classified according to their molecular weight cut-off and nominal thickness [150]. For example, the numbers "11" and "7" in Nafion 117 refer to 1100 g "equivalent weight" and 7/1000 inch, respectively, where the equivalent weight defines the weight of Nafion in molecular mass per sulfonic acid group. Similarly, Nafion 112 and Nafion 115 are 2/1000 and 5/1000 inches thick, respectively.

Rahimnejad et al. (2010) observed that the thinner Nafion 112 led to better performance than Nafion 117 [151]. In contrast, Ghasemi et al. (2015) measured a considerably lower power production with Nafion 112 than with Nafion 117 (19.7 mW m⁻² against 126.1 mW m⁻²) and assumed that it was due to the greater diffusion of oxygen to the bioanode with Nafion 112 [152]. This discrepancy illustrates the difficulty of establishing universal conclusions, probably because of the great dependence of the results on the experimental set-ups and operating conditions.

A wide range of values have been reported for the oxygen mass transfer coefficient in Nafion 117: 1.3×10⁻⁴ cm s⁻¹ by J. R. Kim et al. (2007) [133] or 2.80×10⁻⁴ cm s⁻¹ by Chae et al. (2008) [134], while Khilari et al. (2013) [135] measured only 2.8×10⁻⁵ cm s⁻¹. Here again, the differences in the experimental set-ups (two-compartment MFC with an immersed cathode for the first two, single-compartment MFC with an air cathode for the last) or in electrolyte compositions might have been sources of discrepancy. Nevertheless, in our opinion, such significant oxygen transfer rates through Nafion membranes are surprising, as these membranes were designed to separate O₂ and H₂ under high pressures in PEMFC. The hypothesis of a different mechanism of O₂ crossover in aqueous conditions cannot be discarded, neither can possible oxygen leakages in the experimental set-up disturbing the measurements. If PEM is judged to be justified for a specific MFC, this issue should be tackled in priority.

Because Nafion remains one of the most expensive PEM (approx. \$1400/m²) low-cost alternatives have been investigated [153,154]. Among them, the Ultrex membrane (CMI 7000, Membrane Inc., USA) has been widely tested in MFCs [133]. It is a strong acid CEM composed of a polystyrene gel cross-linked with divinylbenzene that contains sulfonic acid groups. Compared in identical conditions, it presented a higher ionic resistance (45 Ω cm⁻²) than Nafion 117 (9.2 Ω cm⁻²) due to its greater thickness (457 vs. 183 μm for Nafion 117) [132].

Although trying to increase the proton transfer rate through PEM in order to enhance MFC performance is a theoretical impasse, many studies have been devoted to PEM modifications. They are overviewed in Table 6.

PEMs are affected by fouling and biofouling during long-term operation, which can significantly reduce their ion exchange capacity [155,156]. Removing the biofouling layer may not be sufficient to recover the initial characteristics and it may be necessary to regenerate the CEM functional groups [157]. The resistance to biofouling has been enhanced for some composite CEMs by increasing the proportion of a given compound: GO for GO-PVA-STA membranes [135] or polyaniline for Nafion/PANI composite membranes [158].

Table 6. Performance of various advanced laboratory-made CEMs and AEMs designed for MFC.

FGO: functionalized graphene oxide
GO-PVA-STA: graphene oxide, poly(vinyl alcohol) and silicotungstic acid
PVA: poly(vinyl alcohol)
QAPVA: quaternized poly(vinyl alcohol)
QPEEK: quaternized poly(ether ether ketone)
QPEI: quaternized poly(ether imide)
QPSU: quaternized polysulphone
SPEEK: sulfonated poly(ether ether ketone)
SSEBS: sulfonated polystyrene ethylene butylene polystyrene

Nature	MFC performance	Comment	Ref.
CEM: Modified Nafion			
Nafion 112-polyaniline composite (Nafion/PANI)	124 mW m ⁻² , around nine fold power density obtained with Nafion 112		[158]
Supported ionic liquid Nafion	215 mW m ⁻² vs 157.9 and 102.2 mW m ⁻² with Nafion 117 and Ultrex CMI-7000, respectively		[109]
Nafion 117 reinforced with PVA	Up to 91 mW m ⁻² vs. 79 mW m ⁻² with Nafion 117		[159]
CEM: Alternative membranes to Nafion			
SPEEK	77.3 mW m ⁻² vs. 106.7 mW m ⁻² with Nafion 117	Power production with SPEEK was lower than with Nafion 117 but SPEEK was assessed to be about twice as cost effective because of its lower price	[160]
	126.1 mW m ⁻² vs. 179.7 mW m ⁻² with Nafion 117		[161]
GO-PVA-STA	86.7 mW m ⁻² vs. 64.5 mW m ⁻² with Nafion 117	Oxygen mass transfer coefficient of 6.1×10 ⁻⁶ cm.s ⁻¹ was lower than that of Nafion 117 of 2.8×10 ⁻⁵ cm s ⁻¹	[135]
Composite GO-SPEEK	902 mW m ⁻² vs. 1013 mW m ⁻² with Nafion 117 and 812 mW m ⁻² with a non-modified SPEEK membrane	Nafion 117 produced the highest power density and GO-SPEEK had the highest O ₂ diffusion coefficient (1.15 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹) but GO-SPEEK is less expensive	[106]
Nanofibre-reinforced composite based on SPEEK		Lower fuel crossover compared to Nafion	[159]
Carbon nanocomposite	57.6 mW m ⁻² vs. 14.0 mW m ⁻² with Nafion 112		[162]
Modified SPEEK membranes by incorporating TiO ₂ or SiO ₂	98.1 and 1008 mW m ⁻² with TiO ₂ and SiO ₂ , respectively; higher performance than with SPEEK and Nafion 117	Oxygen mass transfer coefficient decreased with the increase in TiO ₂ or SiO ₂ , up to 2.2×10 ⁻⁶ and 0.7×10 ⁻⁶ cm s ⁻¹ respectively	[136] [140]
Modified SSEBS membrane by incorporating S-SiO ₂	1209 mW m ⁻² vs. 290 mW m ⁻² with Nafion 117	Oxygen mass transfer coefficient decreased with the increase in S-SiO ₂ into the SSBES matrix, up to 0.67×10 ⁻⁵ cm s ⁻¹	[163]
AEM			
QPEEK	60 W m ⁻³ vs. 52 W m ⁻³ with the commercial AMI-7001 from Membrane International Inc., NJ	O ₂ mass transfer coefficient and diffusion coefficient were 2.1×10 ⁻⁴ cm s ⁻¹ and 4.8×10 ⁻⁸ cm ² s ⁻¹ for QPEEK, and 1.6×10 ⁻⁴ cm s ⁻¹ and 3.1 ×10 ⁻⁷ cm ² s ⁻¹ for AMI 7001	[141]
Organic-inorganic hybrid AEM composed of QAPVA and TiO ₂	125.4 mW m ⁻² vs. 65 mW m ⁻² with Nafion 117 (here comparison was made with an CEM)	Lower O ₂ mass transfer coefficient of 0.05×10 ⁻⁴ vs. 0.3 ×10 ⁻⁴ cm s ⁻¹ with Nafion 117	[137]
QPEI	612 mW m ⁻² vs. 565 mW m ⁻² with AMI-7001	O ₂ mass transfer coefficient and diffusion coefficient were 2.3×10 ⁻⁵ cm s ⁻¹ and 4.7×10 ⁻⁷ cm ² s ⁻¹ for QPEI, and 0.1×10 ⁻⁵ cm s ⁻¹ and 3×10 ⁻⁷ cm ² s ⁻¹ for AMI 7001	[142]
QPSU membrane modified with FGO	1036 mW m ⁻² vs. 576 mW m ⁻² with AMI 7001		[164]

5.2. Anion exchange membrane (AEM)

Anion Exchange Membranes (AEMs) have a selective permeability for anions due to the positively charged groups they contain, covalently bound to their polymer backbone [37,144]. Anion exchange functional groups can be either strongly basic, such as tertiary ammonium, or weakly basic, such as primary, secondary or tertiary amine groups [131]. The wide use of AEMs in all types of fuel cells, including MFCs, has recently been detailed in a comprehensive review [37]. AEMs have been less often reported in MFC studies than CEMs but with a significant diversity of types (Table 5).

5.2.1. Advantages of AEM vs. CEM

AEMs allow anions to pass through. The theoretical balance sheet (Fig. 5) shows that this is a great advantage over CEMs for MFCs, because AEMs introduce a smaller resistance to the pH balance role of the H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} species. AEM creates minimum hindrance to the pH balance by anionic species between the two compartments.

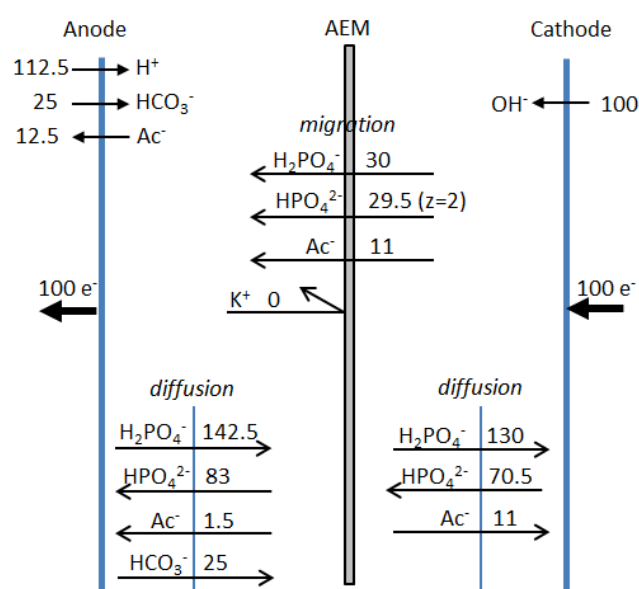


Fig. 5. Balance sheet of the molecular fluxes with an anion exchange membrane (AEM). The electrolyte is composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate.

This advantage has often been confirmed experimentally [165,166], particularly the virtuous association with phosphate or bicarbonate buffer [40,167,168]. Compared in a two-compartment MFC, an AEM produced a larger power density (610 mW m^{-2} with AMI-7001 from Membrane International Inc., NJ) than CEMs (514 mW m^{-2} with Nafion; 480 mW m^{-2} with CMI-7000 from Membrane International Inc., NJ), or an ultrafiltration membrane (462 mW m^{-2}) [133]. The better suitability of AEM than CEM or ultrafiltration membrane was also observed when the membrane was used to support an oxygen-reduction cathode. One side of the membrane was made conductive using graphite paint and a non-precious metal catalyst to form a membrane-cathode configuration [168]. AEM has also proved more appropriate than PEM in the design of a membrane-electrode assembly [169]. Similarly to CEM a few studies have been aimed at designing specific AEM for MFCs (Table 6).

A lower oxygen mass transfer coefficient has also been measured for AEM than Nafion ($0.94 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ and $1.3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ respectively) [133]. Nevertheless, a large range of values have been reported in the MFC literature. For instance, Ji et al. (2011) have measured oxygen transfer coefficients from

$0.65 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ to $1.26 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ for three different commercially available AEMs (ASTOM Co., Yamaguchi, Japan) [143]. As mentioned above for CEMs, it is difficult to make relevant comparisons on this issue.

Finally, comparing the balance sheets of CEM (Fig. 4) and AEM (Fig. 5) shows that CEM favours the access of cations to the cathode, while AEM hinders it. AEM should consequently mitigate cathode fouling due to alkaline precipitation (section 2.2). This advantage has also been noted experimentally [169,170]. An antibacterial effect of QAPVA/TiO₂ membrane has also been noted as positive [137].

5.2.2. In a few circumstances AEM perform less well than CEM

AEM may have some disadvantages compared to CEM when the fuel used is in anionic form, e.g. the widely used volatile fatty acids (acetate, propionate, butyrate, etc.). If the fuel is fed into the anode compartment only, migration through an AEM can only weakly oppose the diffusion-driven flux established from the anode to the cathode compartment. The diffusion flux from anode to cathode would form a countercurrent to migration (see balance sheet Fig. 5), in opposition to current carrying. Some of the anionic fuel is unavoidably lost with AEM, and feeding only the anode compartment would lead to detrimental diffusional flux. As described in section 2.4, the access of the fuel to the cathode compartment has detrimental effects, which have been confirmed experimentally [133,143,166].

AEMs have proved to be more subject to membrane deformation. Zhang et al. (2010) found that the performance of a single-compartment MFC equipped with a membrane pressed against the air-cathode was reduced when an AEM was used (AMI-7001 from Membrane International Inc.) rather than a CEM (CMI-7000) ($16 \pm 2 \text{ W m}^{-3}$ vs. $21 \pm 2 \text{ W m}^{-3}$, respectively) [170]. This difference was attributed to membrane swelling during ion transport through the membrane, which induced detrimental deformation of the AEM.

5.3. Bipolar membrane (BPM)

A BPM is composed of a cation exchange layer and an anion exchange layer mounted together to form a humid junction interface. The humid interface between the two layers is generally considered as a third layer. Under the effect of an electric field, the water content of the membrane is split into protons and hydroxide ions. Protons and hydroxide ions respectively migrate through the CEM, which faces the cathode compartment, and through the AEM, which faces the anode compartment. BPM would consequently be able to stabilize the pH in both compartments of an MFC by supplying the cathode compartment with protons and the anode compartment with the same amount of OH⁻ ions. The theory, already presented elsewhere [40], is not described in detail here. BPM offers an apparently very appealing solution to the thorny problem of pH gradient in MFCs. Unfortunately, water splitting requires a lot of energy, which is deducted from the power supplied by the MFC and BPM would heavily burden the energy balance. The few existing experimental achievements implemented more efficient cathode reaction than oxygen reduction [171,172].

The energy cost of a BPM is too high if energy production is the main objective envisaged and, in our opinion, BPM should be reserved for specific objectives, in which pH balance is crucial. Some clever associations of BPM with MFCs have been proposed to produce alkali and ensure desalination [173] or to remove organic and zinc contamination in parallel effluent streams [174].

5.4. Reverse and forward osmosis (RO/FO) membrane

5.4.1. Characteristics and theoretical advantages and limit

RO membranes are used in large scale industrial units for desalination and water treatment [129,175,176]. In RO units, membranes are operated by achieving a hydrostatic pressure greater than the osmotic pressure so as to drive water transfer through the membrane against the natural direction of osmosis, while the salts are retained and concentrated on the influent surface of the membrane. Forward osmosis has also been envisioned to produce electrical power from a salinity gradient [177,178]. In this case, water transfer from a low-concentration solution (e.g. a river) to a high-concentration solution (e.g. the sea) increases the pressure of the high-concentration side, which is utilized to drive a turbine.

RO and FO membranes are similar from the point of view chemistry and separation characteristics. RO membranes, which generally have to support higher pressure than FO membranes, may be designed with a stronger mechanical resistance. RO/FO membranes are composed of polymer material that forms a layered, web-like structure [175,179]. They do not have distinguishable pores and are considered to be essentially non-porous. Theoretically, all dissolved and suspended material is rejected, even the smallest contaminants such as monovalent ions, and water is considered to be the only material passing through the membrane [129,180]. Practically, RO membranes have salt rejection of more than 90%.

FO membranes have been implemented in MFCs to provide a water flux from the anode to the cathode compartment [101]. The anode compartment has the common salt content appropriate for microbial growth, while the salt concentration is considerably higher in the cathode compartment. Due to the salt gradient, osmosis drives water molecules from the anode to the cathode. Theoretically, all ions are rejected by the membrane, except protons, which are driven through it by the water flux because of their very small size. In this case, in theory, the transport number of proton is 1, while any other ion has a transport number of zero (Fig. 6).

In the context of MFCs, this situation is an exceptional case, in which protons are responsible for all current carried through the separator. Consequently, in theory, using an osmosis membrane is an ideal solution to achieve perfect pH balance in the MFC. Unfortunately, in return, the MFC performance is severely limited because current transport in solution is ensured only by protons, the concentration of which is generally below 10^{-6} M (pH 6) to prevent the bioanode from becoming deactivated. Proton concentration at pH around neutrality is too low to ensure high current density. Moreover, the possible benefit of adding a supporting salt to carry the current is also lost with such membranes. In the present state of the art of bioanode development, osmosis MFCs are not an effective solution when the aim is to considerably enhance power production. As mentioned in section 5.1.1, in this context too, designing efficient acidophilic microbial anodes would be a crucial challenge.

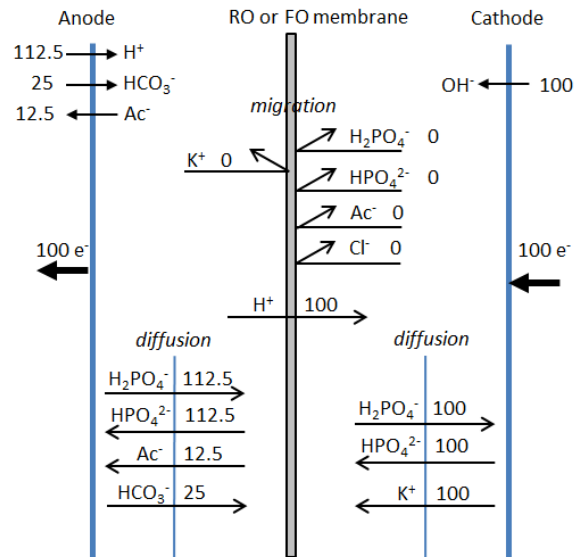


Fig. 6. Balance sheet of the molecular fluxes with a reverse/forward osmosis membrane (RO/FO). The electrolyte is composed of 50 mM phosphate buffer and 10 mM potassium acetate. Addition of KCl does not modify the theoretical balance sheet.

5.4.2. Experimental work

Experimental studies have confirmed that osmosis membranes perform better than AEM or CEM because of proton transfer to the cathode side (Table 7). Moreover, it has been observed that the water flux and the high membrane resistance prevent oxygen diffusion to the anode [101]. The high salt concentration in the cathode compartment is another advantage as it significantly decreases the MFC internal resistance. Qin et al (2015) observed that increasing NaCl concentration from 1 to 35 g L⁻¹ decreased the osmosis membrane resistance from 17.6 to 5.3 Ω, while a CEM resistance decreased from 22.6 to only 9.6 Ω [181].

In conventional RO processes, several fouling mechanisms have been reported. A large variety of contaminants exist, including suspended particulate matter [inorganic or organic] and biogenic materials [129,175,176,179]. Suspended and colloidal particles coagulate together and adsorb, forming a cake-like layer on the membrane surface, while dissolved organics can interact directly with the membrane surface [184,185]. In MFCs also, osmosis membranes have been shown to be sensitive to biofouling on the bioanode side and fouling on both sides [182,186]. In conventional RO bioreactors, biofouling is mitigated by intermittent vigorous air bubbling; this solution might be adapted to MFC by bubbling nitrogen to respect anaerobiosis.

Table 7. Performance of osmosis membrane vs. CEM, AEM and FO membrane.

Nature	MFC performance	Comment	Ref.
Hydration Technology Innovations, LLC, Albany, OR	43 W m ⁻³ vs. 40 and 23 W m ⁻³ with AEM and CEM respectively	Lower pH of the catholyte with the osmosis membrane	[182]
Hydration Technology Innovations, Albany, USA	4.7 W m ⁻³ vs. 3.5 W.m ⁻³ with CEM (Membrane International Inc., Ringwood, NJ)		[101]
Hydration Technology Innovations, LLC, Albany, OR, USA	12.57 W m ⁻³ vs. 9.4 and 10.71 W m ⁻³ for CEM (Nafion 117) and AEM (AMI-7001, Membrane Inc. USA) respectively	Higher anolyte conductivity with osmosis membrane	[102]
Hydration Technology Innovations, LLC, Albany, OR	75.2 A m ⁻³ vs. 42.8 A m ⁻³ for a MFC with CEM (not mentioned)	Higher conductivity of the osmosis membrane due to the high salinity of the cathode compartment	[181]
Hydration Technology Innovations, LLC, USA modified with silver nanoparticles (nAg) deposited on a polydopamine (pDA) coated membrane surface	61.5 mW m ⁻² vs. 55.2 mW m ⁻² for a MFC with the pristine FO membrane	Lower internal resistance of the nAg-pDA coated FO membrane in consequence of significant changes in membrane characteristics	[183]

6. Porous separators

6.1. Classification and basics

Porous separators reject molecules according to their size and shape, and charge in the specific case of nanofiltration membranes. Nanofiltration (NF), ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membranes retain small particles (e.g. ions, aqueous salts, viruses) in order of increasing size. The term macroporous separators, less accurately defined, aggregates various kinds of separators that retain only particles of large size such as bacteria, sands or colloids. Porous separators are less expensive than ion-exchange membranes and some common macroporous materials can even reach very low cost. Macrofiltration and UF membranes are the most commonly studied in the MFC field, whereas no or very few data are available concerning NF membranes (Table 8). As for non-porous membranes, experimental data about oxygen diffusion can differ significantly from one study to the other.

In theory, with the exception of nanofiltration membranes (see section 6.1), porous separators do not exert selectivity in ion transfer. The balance sheets are consequently identical to that found in the absence of a separator (Fig. 2) but the mass transfer rates are reduced. Non-porous separators form a barrier to mass transfers with a strength that decreases from NF membranes to macroporous materials. According to the functions identified in section 4.1, it can be predicted that oxygen transfer to the bioanode and fuel or cation transfer to the cathode (items 1, 2 and 4 in section 4.1) are thwarted

with an efficiency that decreases from NF membranes to macroporous separators. In return, the ease with which ions cross the separator increases from NF membranes to macroporous materials (item 3), so that buffer balance is more easily achieved in this order.

Table 8. Characteristics of porous separators reported in the MFC literature. Both manufacturer's data and parameters calculated from experimental data are given. Manufacturer's data are indicated by an asterisk *.

Membrane	Thickness (mm)	Pore diameter (mm)	Porosity (%)	Internal resistance (Ω)	Oxygen mass transfer k_o (cm s^{-1})	Oxygen diffusion coefficient D_o ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	Acetate mass transfer k_a (cm s^{-1})	Acetate diffusion coefficient D_a ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	Ref.
Ultrafiltration									
UF-0.5K UF-1K UF-3K (DIAFLO ultrafiltration. Amicon. Inc.. MA)	265 * 265 * 265 *			6009 1239 1233	0.19×10^{-4} 0.41×10^{-4} 0.42×10^{-4}	0.51×10^{-6} 1.1×10^{-6} 1.1×10^{-6}	0.89×10^{-8} 16×10^{-8} 27×10^{-8}	0.24×10^{-9} 4.2×10^{-9} 7.2×10^{-9}	[133]
M-10 (Montmorillonite 10%) M-15 M-20 K-20 (Kaolinite 20%)				118 96 78 104	2.96×10^{-5} 1.94×10^{-5} 1.09×10^{-5} 2.05×10^{-5}	8.1×10^{-6} 9.71×10^{-6} 4.35×10^{-6} 8.13×10^{-6}	3.23×10^{-5} 2.60×10^{-5} 2.38×10^{-5} 2.93×10^{-5}	8.06×10^{-6} 6.51×10^{-6} 5.96×10^{-6} 7.31×10^{-6}	[187]
Microfiltration									
Q/IEF J01 Shanghai Xingya Co.. Shanghai	130	0.45		263	5.9×10^{-4}	7.7×10^{-6}			[188]
Supor. Pall Co.. MI. USA (Hydrophilic polyethersulfone PES)	132* 145* 140*	0.1* 0.2* 0.45 *			1.13×10^{-3} 1.27×10^{-3} 2.27×10^{-3}	1.49×10^{-5} 1.84×10^{-5} 3.17×10^{-5}			[70]
Durapore (polyvinylidene fluoride PVDF)	125* 125* 125*	0.1* 0.22* 0.45 *	70 70 70		3.27×10^{-3} 1.87×10^{-3} 11×10^{-3}	4.08×10^{-5} 2.33×10^{-5} 13.8×10^{-5}			[70]
Macrofiltration									
Glass fiber 1.0 Glass fiber 0.4	400 1000			2.26 2.39	5×10^{-5} 7.5×10^{-5}	5×10^{-6} 3×10^{-6}			[100]
J-cloth	300			0.21	290×10^{-5}	86.9×10^{-6}			[100]
PP80 (nonwoven fabric) PP100 (nonwoven fabric) PPS (textile fabric) S-PPS (sulfonated polyphenylene sulfide) Cellulose (cellulose-ester)				480 535 779 519 481	30×10^{-4} 20×10^{-4} 50×10^{-4} 34×10^{-4} 11×10^{-4}	3×10^{-6} 9×10^{-6} 2.6×10^{-6} 18×10^{-6} 1.5×10^{-6}			[138]
PP80 (nonwoven fabric) PP100 (nonwoven fabric) PPS (textile fabric) S-PPS (sulfonated polyphenylene sulfide)	490 540 520 540	30 42 40 44		9.29 9.50 9.51 3.53	3.7×10^{-5} 7.3×10^{-5} 7.5×10^{-5} 7.2×10^{-5}	1.8×10^{-6} 3.7×10^{-6} 3.9×10^{-6} 3.7×10^{-6}			[139]

6.2. Nanofiltration (NF) membrane

With pore diameters between 10 and 100 Å, NF membranes retain small particles of about the size of water molecules, sugars or aqueous salts. They fall into a transition region between RO and UF membranes. Typically, RO and UF membranes have salt rejection of more than 90% and less than 5% respectively, while NF membranes reject between 20 and 80 % [189]. They are categorized by their molecular weight cut-off (MWCO expressed in Daltons (Da)), a loosely defined term that generally means the molecular weight of the globular protein molecule that is 95% rejected by the membrane [190]. MWCO is accepted to range from around 250 to 2000 Da for NF membranes [129].

Retention mechanisms involved in NF membranes are based on both the size and the charge of molecules. Ions are retained by interactions of the ion charge with the membrane, whereas water is transported through the membrane. Multivalent ions have higher rejection than monovalent ions because charge interactions are stronger [191]. NF membranes are generally negatively charged and applications consequently often deal with the elimination of anions, such as removal of sulphate [192], nitrate [193,194] or arsenic from drinking water present in the form of arsenate AsO_4^{3-} [195]. Nevertheless, removal of cations, e.g. cobalt from nuclear liquid waste [196] has also been proposed. NF membranes are known to suffer from fouling especially during wastewater reclamation [179].

To our knowledge, NF membranes have never been tested in MFCs so far. From their very small pore size, it may be predicted that they could efficiently reduce oxygen and fuel crossover. In return, it can be feared that they would create high resistance to ion transfer but probably less than ion-selective membranes, which are widely used in MFCs. In consequence, NF membranes may be interesting candidates deserving to be tested as MFC separators.

6.3. Ultrafiltration (UF) membrane

UF membranes, with pore diameters in the 100-1000 Å range, are mostly used to separate small colloidal particles [190]. Their MWCO varies between 2000 and 500 000 Da [34,129]. Yang and He dedicated a large part of their recent review on integrating UF membranes in bioelectrochemical systems [34].

UF membranes have not been widely investigated in MFCs. Kim et al. (2007) compared various UF membranes (DIAFLO ultrafiltration, Amicon, Inc., MA) with a CEM and an AEM (CMI-7000 and AMI-7001, both from Membrane International Inc., NJ) as MFC separators [133]. The results depended strongly on membrane MWCO. The MFC internal resistance was significantly higher (6009 Ω) with the 0.5 kDa UF membrane than with the others (1239 and 1233 Ω for 1 and 3 kDa respectively). The same trend was confirmed when the anode-cathode distance was reduced from 12 to 4 cm (1814 Ω versus 98 Ω and 91 Ω, respectively). Oxygen mass transfer coefficients of the UF-membranes were smaller than those measured for the other membranes, including Nafion 117, CEM and AEM. The smallest coefficient was achieved by the 0.5 kDa UF membrane ($0.19 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$), which also showed the lowest acetate mass transfer coefficient ($0.89 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$). In contrast, the 1 kDa and 3 kDa UF membranes were the most permeable to acetate ($16 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ and $27 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ respectively). This study presents UF membranes with low MWCO as valid MFC separator candidates.

Nevertheless, the MFCs equipped with Nafion 117 or with the UF membranes delivered similar power densities, ranging from 36 to 38 mW m⁻². The authors concluded that the high internal resistance due to the 12-cm inter-electrode distance was the limiting step, which precluded comparison of membrane

impact. This study nicely illustrates the necessity to accurately characterize the experimental device used to compare membrane performance. Similar results have been reported by comparing a 1 kDa UF membrane (DIAFLO ultrafiltration, Amicon Inc., USA) with a Nafion membrane, which led to similar power densities of 53.5 mW m^{-2} and 55.7 mW m^{-2} , respectively [197]. In contrast, Hou et al. (2011), testing UF membranes with different MWCO (1, 5 and 10 kDa) in a single-compartment MFC, observed the highest maximum power density with the 1 kDa membrane (324 mW m^{-2}) [198]. It should be emphasized here that comparison of membrane performance achieved in MFCs should be taken with great caution. MFCs may be controlled by several limiting steps, including the solution ohmic drop, the bioanode kinetics or the cathode kinetics, or combinations of several of these steps. Comparing membrane performance in an MFC requires the MFC be designed so that the membrane is the rate-limiting step.

Attempts have been made to reduce the membrane resistance by enhancing its hydrophilic character. With this aim, the surface of a UF membrane was coated with polydopamine (PD), which has similar capability to a mussel's adhesive foot protein [199]. MFC power generation was improved by 15% due to an enhanced hydrophilicity on the UF membrane that caused a greater retention of electrolytes at the solution-membrane interface. Furthermore, PD coating on UF membranes can delay biofouling by hindering the attachment of EPSs and bacterial cells, which block the membrane pores.

Ceramic separators have also been reported in the recent MFC literature [33,185,200]. They are considered to be porous separators and can be classified as UF or MF membranes. Ghadge and Ghangrekar developed a ceramic separator made from red soil blended with cation exchanger, montmorillonite and kaolinite [187]. Addition of 20% montmorillonite in clay yielded better conductivity of the separator and hence higher energy recovery. Winfield et al., testing two types of ceramic, showed that earthenware provided better performances than terracotta (2.83 W m^{-3} vs. 3.66 W m^{-3}) [201] with quite a long operation time of 6 weeks. In another study, earthenware was compared to a CEM. The earthenware-MFC provided current for 8 months and generated power densities comparable to those of the CEM-MFC, up to 4.5 W m^{-3} [200].

6.4. Microfiltration (MF) membrane

MF membranes, with pore diameters ranging from 1000 to 10^4 \AA , reject particles such as solids, colloidal particles and bacteria, while even proteins pass through [180]. MF membranes are commonly used for wastewater treatment and a few studies have tested them for MFCs.

Biffinger et al. (2007) tested polymer filters made of regenerated cellulose (Fisherbrand, 12 000-14 000 Da, 20 μm wall thickness), cellulose nitrate (Millipore, 0.2 μm pore size, 125 μm thickness), nylon (Whatman, 0.2 μm pore size, 20 μm thickness) and polycarbonate (Millipore, GTTP, 0.2 μm pore size, 20 μm thickness), which were considered as nanoporous, although these materials are principally used to create MF membranes [202]. These separators were compared to Nafion 117 in a miniature MFC. MFCs produced comparable power densities ranging from 16 W m^{-3} to 6 W m^{-3} for cellulose nitrate, of the same order of magnitude as those obtained with Nafion (11 W m^{-3}). They also exhibited comparable durability, up to 500 h, to Nafion-117 membranes. Interestingly, no pH gradient between the two compartments was observed with the polycarbonate membrane.

Cellulose acetate MF membrane (Q/IEF J01 Shanghai Xingya Co., Shanghai) have been compared with Nafion 117 in a two-compartment MFC [188]. As predicted, CE was smaller with the MF membrane (38.5 vs. 74.7% with Nafion 117) due to the higher oxygen mass transfer coefficient (5.9×10^{-4} vs.

$1.4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ for MF and Nafion 117, respectively). Lower CE can also be explained by fuel diffusion to the cathode compartment. The pH gradient was reduced: pH values were 6.9 and 8 in the anode and cathode compartments respectively with the MF membrane, vs. 6.4 and 9.5 with Nafion 117. Nevertheless, similar power densities were obtained (0.831 W m^{-2} and 0.872 W m^{-2} , respectively). It was concluded that MF membranes could parallel PEM in power density while decreasing the separator cost [153]. Here again, the equality of the power produced may also indicate that the membrane was not a rate-limiting step in the MFC. For instance, MF membranes compared to a PEM in an air cathode, single-compartment MFC have led to different conclusions [203]. The lower internal resistance obtained with the MF membrane (248Ω vs. 672Ω with PEM) resulted in higher power: 214 mW m^{-2} with the MF membrane against 103 mW m^{-2} with PEM. Once again, the cell configuration may have had a major impact on the conclusions that could be drawn about membrane suitability.

Recently, MF membranes (hydrophilic polyethersulfone PES, Supor® from Pall Co., MI, USA, and poly(vinylidene fluoride) PVDF, Durapore® from Millipore Co., MA, USA) have been tested in an air-cathode single-compartment MFC, paying particular attention to the fouling mechanisms of the air-cathode [70]. Oxygen mass transfer coefficients of the MF membranes were confirmed to be higher than that of Nafion 117 (Table 8).

6.5. Macrofiltration

Macroporous separators reject only species of very large size, such as bacteria and yeasts, or even retain only macro-particles such as granules. They have been widely tested in MFCs, especially because of their low cost and easy availability. From a theoretical point of view, their macro-porosity should benefit the pH balance between the anode and cathode compartments but should be detrimental to oxygen and substrate crossover.

The range of macroporous materials that can be used is limited only by the imagination of researchers. Technologically advanced material such as Zirfon has been tested in a two-compartment MFC [153]. Zirfon is a macroporous organomineral material containing 85 wt% of hydrophilic ZrO_2 powder and 15 wt% polysulfone. The lower resistance than with Nafion was confirmed experimentally ($2727 \Omega \text{ cm}$ vs. $17\,000 \Omega \text{ cm}$) but so was a higher permeability to oxygen ($1.9 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ vs. $2.8 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, respectively), which globally led to lower MFC performances than Nafion.

On the other hand, material as simple and cheap as J-Cloth has also been investigated several times [100,126,204]. The oxygen flux through this material is high ($290 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) but the main advantage lies in its capability to support the development of an intermediate biofilm, which has been observed as a factor that increases power, by consuming oxygen before it can reach the anode. This aerobic biofilm may be thought of as a preliminary proof of the concept of the "Microbial separator" proposed in section 3.2 Glass fibre has also demonstrated good capacities as a porous separator [100,204] [205,206]. It led to higher CE than J-Cloth, probably due to its lower oxygen mass transfer coefficient ($5.0 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) [100].

In the long term, J-Cloth is handicapped by its biodegradability. Nevertheless, the biodegradability of the separator is not always a disadvantage. An MFC equipped with latex rubber as separator started to produce current after 3 weeks and then showed continuous improvement over time. After 6 months, it reached higher power and current than a similar MFC equipped with an AEM. After 11 months, performance declined with both AEM and PEM but continued to increase with the latex separator [207]. Biodegradation of the material resulted in pores forming through the separator, which

improved the MFC performance. Building on this success, the same group has recently investigated a biodegradable bag as a macroporous membrane separator [208]. The MFC began to produce power after 2 weeks and displayed continuous improvement. After seven months, the performance decreased and damage was visible, so the bag material was no longer able to provide sufficient separation. From a general point of view, biodegradability of whole MFC is starting to be viewed as an important advantage.

Different nonwoven polypropylene, polyphenylene sulfide and cellulose-ester fabrics also led to comparable or slightly better MFC performance than Nafion 117 and CEM (CMI-7000, Memb. Inc., USA) because of their smaller ohmic resistance [138]. The higher oxygen mass transfer compared to Nafion and CEM led to lower CEs. Another study comparing textile fabrics of polyphenylene sulfide, sulfonated polyphenylene sulfide and the nonwoven fabrics of polypropylene to Nafion 117 and CEM (CMI-7000) revealed a greater difference in terms of power density produced (up to 190 mW m^{-2} with macroporous separators vs. 24 mW m^{-2} with Nafion 117) and surprisingly similar or lower oxygen mass transfer coefficients than that of Nafion (Table 8) [139].

7. Concluding remarks

In the current state of the art, most MFCs use low conductivity electrolytes at around neutral pH. This situation may change if efficient halotolerant, acidophilic or alkaliphilic microbial anodes were designed, but these objectives remain research challenges. Work in these directions should be encouraged. Because of the nutrients, salts and trace elements required for microbial growth, MFCs seem condemned to work with chemically complex electrolytes, which may raise various causes of electrode deactivation. Local acidification of the bioanode and local alkalization of the cathode are also important pathways to electrode deactivation. In this context, ion transport through the electrolyte is the central crossroad, which controls the MFC performance and long-term behaviour.

This review gives an easy-to-use theoretical tool to predict the behaviour of an MFC on the basis of the ionic contents of the electrolyte. The theory should motivate the redirection of certain research routes on MFC separators and boost some others. For instance, it is shown that, except in osmotic MFCs, proton transport has no role in current carrying in the pH range of the electrolytes used so far. This has already been claimed by a several research groups but too many studies still focus on proton transport and try to improve PEM to enhance MFC power production.

The awkward problem of pH balance inside the cell is another essential issue in MFC development. Proton migration from the anode to the cathode has no significant impact and migration of the buffering anionic species helps to mitigate the bioanode acidification only moderately. This situation is very different from that in chemical hydrogen fuel cells, which have often been used as model to understand MFC mechanisms. Controlling the pH gradient is a crucial requirement, though a tricky task, to optimize MFC performance. The theoretical framework presented here should now allow dedicated theoretical approaches, e.g. to optimize buffer composition, including multispecies buffers.

Separator-less MFCs could be of considerable interest as far as loss of a part of the fuel may be accepted as the price to be paid for a device that is simple to implement. This constraint should be perfectly acceptable in the context of waste treatment for example. In this context, the concept of “microbial separator” may be a promising way to control fuel and oxygen transport inside the MFC.

Using a suitable separator may be an effective way to drive ion transport towards a specific pattern but it may also be detrimental. The advantages/disadvantages of the various kinds of membranes and separators are compared in the light of theory and the conclusions are confronted with the experimental data reported in the literature. In the context of ion-exchange membranes, AEMs would possibly be better candidate MFC separators than CEM if the objective is to increase power at the price of lower Coulombic efficiency. Nevertheless, in our opinion, ion exchange membranes should mainly be implemented when the MFC has a target other than power generation, such as desalination, separation, sensing, etc. If the only goal is power supply, porous separators, less costly, propose a continuum of transfer characteristics that should be appropriate for most MFCs.

Concerning the essential issue of oxygen transfer, large discrepancies are observed among the experimental data; this item deserves deeper and dedicated investigations. The analysis of many experimental studies points out the need to perfectly characterize the experimental set-up in order to draw sound conclusions on membrane suitability. The fact that different membranes lead an MFC to provide similar power does not always prove the equivalence of the membranes tested; it may also indicate that a step other than ion transfer through the membrane is rate-limiting. Specific experimental devices should now be designed for comparing membranes in MFCs, ensuring that ion transfer through the membrane is the rate-limiting step. Conventional studies performed in the domain of membrane processes should be a suitable source of inspiration.

Acknowledgements

This work benefited from the support of the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the project Bioelec (ANR-13-BIME-006).

References

1. Kim BH, Ikeda T, Park HS, Kim HJ, Hyun MS, Kano K, et al. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnol Tech.* 1999 Jul;13(7):475–8.
2. Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science.* 2002 Jan 18;295(5554):483–5.
3. Tender LM, Reimers CE, Stecher HA, Holmes DE, Bond DR, Lowy DA, et al. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat Biotechnol.* 2002 Aug;20(8):821–5.
4. Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang W. Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ Sci Technol.* 2001 Jan 1;35(1):192–5.
5. Bergel A, Feron D, Mollica A. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem Commun.* 2005 Sep;7(9):900–4.
6. Pant D, Van Bogaert G, Diels L, Vanbroekhoven K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour Technol.* 2010 Mar;101(6):1533–43.
7. Pandey P, Shinde VN, Deopurkar RL, Kale SP, Patil SA, Pant D. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Appl Energy.* 2016 Apr 15;168:706–23.
8. Lovley DR, Nevin KP. A shift in the current: New applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Jun;22(3):441–8.
9. Tremblay P-L, Zhang T. Electrifying microbes for the production of chemicals. *Front Microbiol.* 2015 Mar 11;6:UNSP 201.

10. Schroeder U, Harnisch F, Angenent LT. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ Sci.* 2015;8(2):513–9.
11. Sleutel THJA, Ter Heijne A, Buisman CJN, Hamelers HVM. Bioelectrochemical Systems: An Outlook for Practical Applications. *Chemsuschem.* 2012 Jun;5(6):1012–9.
12. Wang H, Luo H, Fallgren PH, Jin S, Ren ZJ. Bioelectrochemical system platform for sustainable environmental remediation and energy generation. *Biotechnol Adv.* 2015 Jun;33(3–4):317–34.
13. Wang H, Ren ZJ. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol Adv.* 2013 Dec;31(8):1796–807.
14. Logan BE, Rabaey K. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science.* 2012 Aug 10;337(6095):686–90.
15. Li W-W, Yu H-Q, He Z. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy Environ Sci.* 2014 Mar;7(3):911–24.
16. Zhang Y, Angelidaki I. Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges. *Water Res.* 2014 Jun 1;56:11–25.
17. Escapa A, Mateos R, Martinez EJ, Blanes J. Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond. *Renew Sustain Energy Rev.* 2016 Mar;55:942–56.
18. Lovley DR, Nevin KP. Electrobiocommodities: powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr Opin Biotechnol.* 2013 Jun;24(3):385–90.
19. Harnisch F, Schroeder U. From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems. *Chem Soc Rev.* 2010;39(11):4433–48.
20. Davis JB, Yarbrough HFJ. Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell. *Science.* 1962 Aug;137(3530):615–6.
21. Erable B, Feron D, Bergel A. Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review. *Chemsuschem.* 2012 Jun;5(6):975–87.
22. Rimboud M, Pocaznoi D, Erable B, Bergel A. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys Chem Chem Phys.* 2014 Aug 21;16(31):16349–66.
23. Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol.* 2009 May;7(5):375–81.
24. Schaetzle O, Barriere F, Baronian K. Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy Environ Sci.* 2008;1(6):607–20.
25. Rousseau R, Dominguez-Benetton X, Delia M-L, Bergel A. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem Commun.* 2013 Aug;33:1–4.
26. Karthikeyan R, Selvam A, Cheng KY, Wong JW-C. Influence of ionic conductivity in bioelectricity production from saline domestic sewage sludge in microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 2016 Jan;200:845–52.
27. Martinucci E, Pizza F, Perrino D, Colombo A, Trasatti SPM, Barnabei AL, et al. Energy balance and microbial fuel cells experimentation at wastewater treatment plant Milano-Nosedo. *Int J Hydrog Energy.* 2015 Nov 9;40(42):14683–9.
28. Jannelli N, Nastro RA, Cigolotti V, Minutillo M, Falucci G. Low pH, high salinity: Too much for microbial fuel cells? *Appl Energy.* 2016;
29. Dhar BR, Lee H-S. Membranes for bioelectrochemical systems: challenges and research advances. *Environ Technol.* 2013 Jul 1;34(13–14):1751–64.
30. Daud SM, Kim BH, Ghasemi M, Daud WRW. Separators used in microbial electrochemical technologies: Current status and future prospects. *Bioresour Technol.* 2015 Nov;195:170–9.

31. Li W-W, Sheng G-P, Liu X-W, Yu H-Q. Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 2011 Jan;102(1):244–52.
32. Leong JX, Daud WRW, Ghasemi M, Ben Liew K, Ismail M. Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2013 Dec;28:575–87.
33. Winfield J, Gajda I, Greenman J, Ieropoulos I. A review into the use of ceramics in microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 2016;
34. Yuan H, He Z. Integrating membrane filtration into bioelectrochemical systems as next generation energy-efficient wastewater treatment technologies for water reclamation: A review. *Bioresour Technol.* 2015 Nov;195:202–9.
35. Sevda S, Yuan H, He Z, Abu-Reesh IM. Microbial desalination cells as a versatile technology: Functions, optimization and prospective. *Desalination.* 2015 Sep 1;371:9–17.
36. Xu L, Zhao Y, Doherty L, Hu Y, Hao X. The integrated processes for wastewater treatment based on the principle of microbial fuel cells: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2016 Jan 2;46(1):60–91.
37. Varcoe JR, Atanassov P, Dekel DR, Herring AM, Hickner MA, Kohl PA, et al. Anion-exchange membranes in electrochemical energy systems. *Energy Environ Sci.* 2014 Oct;7(10):3135–91.
38. Harnisch F, Warmbier R, Schneider R, Schroeder U. Modeling the ion transfer and polarization of ion exchange membranes in bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemistry.* 2009 Jun;75(2):136–41.
39. Popat SC, Ki D, Young MN, Rittmann BE, Torres CI. Buffer pK(a) and Transport Govern the Concentration Overpotential in Electrochemical Oxygen Reduction at Neutral pH. *Chemelectrochem.* 2014 Nov 11;1(11):1909–15.
40. Harnisch F, Schroeder U. Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in Microbial Bioelectrochemical Systems. *Chemsuschem.* 2009;2(10):921–6.
41. Popat SC, Torres CI. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour Technol.* 2016;
42. Rousseau R, Santaella C, Achouak W, Godon J-J, Bonnafous A, Bergel A, et al. The electrochemical kinetics of high-salinity tolerant bioanodes is correlated with the structure and microbial composition of the biofilm. *ChemElectroChem.* 2014;Accepted manuscript.
43. Tender LM, Gray SA, Groveman E, Lowy DA, Kauffman P, Melhado J, et al. The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J Power Sources.* 2008 May 1;179(2):571–5.
44. An J, Nam J, Kim B, Lee H-S, Kim BH, Chang IS. Performance variation according to anode-embedded orientation in a sediment microbial fuel cell employing a chessboard-like hundred-piece anode. *Bioresour Technol.* 2015 Aug;190:175–81.
45. Christgen B, Scott K, Dolfing J, Head IM, Curtis TP. An Evaluation of the Performance and Economics of Membranes and Separators in Single Chamber Microbial Fuel Cells Treating Domestic Wastewater. *Plos One.* 2015 Aug 25;10(8):e0136108.
46. Heidrich ES, Edwards SR, Dolfing J, Cotterill SE, Curtis TP. Performance of a pilot scale microbial electrolysis cell fed on domestic wastewater at ambient temperatures for a 12 month period. *Bioresour Technol.* 2014 Dec;173:87–95.
47. Dopson M, Ni G, Sleutels THJA. Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems. *Fems Microbiol Rev.* 2016 Mar;40(2):164–81.
48. Pocaznoi D, Erable B, Etcheverry L, Delia M-L, Bergel A. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(38):13332–43.

49. Blanchet E, Pécastaings S, Erable B, Roques C, Bergel A. Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresour Technol.* 2014 Dec;173(0):224–30.
50. Ketep SF, Bergel A, Bertrand M, Achouak W, Fourest E. Lowering the applied potential during successive scratching/re-inoculation improves the performance of microbial anodes for microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 2013;127:448–55.
51. Zhang E, Zhai W, Luo Y, Scott K, Wang X, Diao G. Acclimatization of microbial consortia to alkaline conditions and enhanced electricity generation. *Bioresour Technol.* 2016;211:736–42.
52. Gil GC, Chang IS, Kim BH, Kim M, Jang JK, Park HS, et al. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron.* 2003 Apr;18(4):327–34.
53. Lacroix R, Da Silva S, Gaig MV, Rousseau R, Delia M-L, Bergel A. Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *Phys Chem Chem Phys.* 2014;16(41):22892–902.
54. Qu Y, Feng Y, Wang X, Logan BE. Use of a Coculture To Enable Current Production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.* 2012 May;78(9):3484–7.
55. Liu X-W, Li W-W, Yu H-Q. Cathodic catalysts in bioelectrochemical systems for energy recovery from wastewater. *Chem Soc Rev.* 2014 Nov 21;43(22):7718–45.
56. Ben Liew K, Daud WRW, Ghasemi M, Leong JX, Lim WS, Ismail M. Non-Pt catalyst as oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: A review. *Int J Hydrog Energy.* 2014 Mar 26;39(10):4870–83.
57. Wang Z, Cao C, Zheng Y, Chen S, Zhao F. Abiotic Oxygen Reduction Reaction Catalysts Used in Microbial Fuel Cells. *Chemelectrochem.* 2014 Nov 11;1(11):1813–21.
58. Noori MT, Jain SC, Ghangrekar MM, Mukherjee CK. Biofouling inhibition and enhancing performance of microbial fuel cell using silver nano-particles as fungicide and cathode catalyst. *Bioresour Technol.* 2016;
59. Santoro C, Artyushkova K, Babanova S, Atanassov P, Ieropoulos I, Grattieri M, et al. Parameters characterization and optimization of activated carbon (AC) cathodes for microbial fuel cell application. *Bioresour Technol.* 2014 Jul;163:54–63.
60. Kannan MV, Kumar GG. Current status, key challenges and its solutions in the design and development of graphene based ORR catalysts for the microbial fuel cell applications. *Biosens Bioelectron.* 2016 Mar 15;77:1208–20.
61. Logan BE, Wallack MJ, Kim K-Y, He W, Feng Y, Saikaly PE. Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities. *Environ Sci Technol Lett.* 2015 Aug;2(8):206–14.
62. Kim BH, Lim SS, Daud WRW, Gadd GM, Chang IS. The biocathode of microbial electrochemical systems and microbially-influenced corrosion. *Bioresour Technol.* 2015 Aug;190:395–401.
63. Schaetzle O, Barriere F, Schroeder U. An improved microbial fuel cell with laccase as the oxygen reduction catalyst. *Energy Environ Sci.* 2009;2(1):96–9.
64. Erable B, Etcheverry L, Bergel A. Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment. *Electrochem Commun.* 2009 Mar;11(3):619–22.
65. Popat SC, Ki D, Rittmann BE, Torres CI. Importance of OH⁻ Transport from Cathodes in Microbial Fuel Cells. *Chemsuschem.* 2012 Jun;5(6):1071–9.
66. Rau GH. Electrochemical Splitting of Calcium Carbonate to Increase Solution Alkalinity: Implications for Mitigation of Carbon Dioxide and Ocean Acidity. *Environ Sci Technol.* 2008 Dec 1;42(23):8935–40.
67. Tlili MM, Benamor M, Gabrielli C, Perrot H, Tribollet B. Influence of the interfacial pH on electrochemical CaCO₃ precipitation. *J Electrochem Soc.* 2003 Nov;150(11):C765–71.

68. NAIR M, MISRA B. ELECTROLYTIC DEPOSITION FOR SCALE CONTROL IN SEA-WATER DISTILLATION. *Desalination*. 1978;27(1):59–64.
69. NAIR M, MISRA B. ELECTROLYTIC SCALE FORMATION IN SEA-WATER DISTILLATION SYSTEMS. *Desalination*. 1978;25(3):263–8.
70. Ma J, Wang Z, Suor D, Liu S, Li J, Wu Z. Temporal variations of cathode performance in air-cathode single-chamber microbial fuel cells with different separators. *J Power Sources*. 2014 Dec 25;272:24–33.
71. Janicek A, Fan Y, Liu H. Performance and stability of different cathode base materials for use in microbial fuel cells. *J Power Sources*. 2015 Apr 15;280:159–65.
72. Santini M, Guilizzoni M, Lorenzi M, Atanassov P, Marsili E, Fest-Santini S, et al. Three-dimensional X-ray microcomputed tomography of carbonates and biofilm on operated cathode in single chamber microbial fuel cell. *Biointerphases*. 2015 Sep;10(3):31009.
73. Liu H, Cheng S, Huang L, Logan BE. Scale-Lip of membrane-free single-chamber microbial fuel cells. *J Power Sources*. 2008 Apr 15;179(1):274–9.
74. Harnisch F, Wirth S, Schroeder U. Effects of substrate and metabolite crossover on the cathodic oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: Platinum vs. iron(II) phthalocyanine based electrodes. *Electrochem Commun*. 2009 Nov;11(11):2253–6.
75. Santoro C, Babanova S, Erable B, Schuler A, Atanassov P. Bilirubin oxidase based enzymatic air-breathing cathode: Operation under pristine and contaminated conditions. *Bioelectrochemistry*. 2016 Apr;108:1–7.
76. Liu H, Logan BE. Electricity Generation Using An air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ Sci Technol*. 2004 Jul 15;38(14):4040–6.
77. Liu W, Cheng S, Sun D, Huang H, Chen J, Cen K. Inhibition of microbial growth on air cathodes of single chamber microbial fuel cells by incorporating enrofloxacin into the catalyst layer. *Biosens Bioelectron*. 2015 Oct 15;72:44–50.
78. Yuan Y, Zhou S, Tang J. In Situ Investigation of Cathode and Local Biofilm Microenvironments Reveals Important Roles of OH⁻ and Oxygen Transport in Microbial Fuel Cells. *Environ Sci Technol*. 2013 May 7;47(9):4911–7.
79. Tartakovsky B, Guiot SR. A comparison of air and hydrogen peroxide oxygenated microbial fuel cell reactors. *Biotechnol Prog*. 2006 Feb;22(1):241–6.
80. Cristiani P, Carvalho ML, Guerrini E, Daghio M, Santoro C, Li B. Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry*. 2013 Aug;92:6–13.
81. Rismani-Yazdi H, Carver SM, Christy AD, Tuovinen IH. Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. *J Power Sources*. 2008 Jun 1;180(2):683–94.
82. Scofield ME, Liu H, Wong SS. A concise guide to sustainable PEMFCs: recent advances in improving both oxygen reduction catalysts and proton exchange membranes. *Chem Soc Rev*. 2015;44(16):5836–60.
83. Lide DR. *Handbook of Chemistry and Physics*, Internet version [Internet]. CRC Press; 2005. Available from: <http://www.hbcnetbase.com>
84. Mano N, Mao F, Heller A. Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant. *J Am Chem Soc*. 2003 May 28;125(21):6588–94.
85. Willner I, Yan Y-M, Willner B, Tel-Vered R. Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells-A Review. *Fuel Cells*. 2009 Feb;9(1):7–24.
86. Liu Y, Dong S. A biofuel cell harvesting energy from glucose-air and fruit juice-air. *Biosens Bioelectron*. 2007 Nov 30;23(4):593–7.
87. Cosnier S, Le Goff A, Holzinger M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. *Electrochem Commun*. 2014 Jan;38:19–23.

88. Barriere F, Kavanagh P, Leech D. A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta*. 2006 Jul 15;51(24):5187–92.
89. Li W-W, Yu H-Q. Stimulating sediment bioremediation with benthic microbial fuel cells. *Biotechnol Adv*. 2015 Feb;33(1):1–12.
90. Ewing T, Ha PT, Babauta JT, Tang NT, Heo D, Beyenal H. Scale-up of sediment microbial fuel cells. *J Power Sources*. 2014 Dec 25;272:311–9.
91. Erable B, Lacroix R, Etcheverry L, Feron D, Delia ML, Bergel A. Marine floating microbial fuel cell involving aerobic biofilm on stainless steel cathodes. *Bioresour Technol*. 2013 Aug;142:510–6.
92. Jang JK, Pham TH, Chang IS, Kang KH, Moon H, Cho KS, et al. Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell. *Process Biochem*. 2004 Apr 30;39(8):1007–12.
93. Aldrovandi A, Marsili E, Stante L, Paganin P, Tabacchioni S, Giordano A. Sustainable power production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell. *Bioresour Technol*. 2009 Jul;100(13):3252–60.
94. Zhuwei D, Qinghai L, Meng T, Shaohua L, Haoran L. Electricity Generation Using Membrane-less Microbial Fuel Cell during Wastewater Treatment. *Chin J Chem Eng*. 2008 Oct;16(5):772–7.
95. Zhan Y-L, Zhang P-P, Yan G, Wang J, Guo S. Progress in microbial fuel cell and its application. *Mod Chem Ind*. 2007;27(1):13–7.
96. Liu H, Cheng SA, Logan BE. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environ Sci Technol*. 2005 Jul 15;39(14):5488–93.
97. Cheng S, Liu H, Logan BE. Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environ Sci Technol*. 2006 Apr 1;40(7):2426–32.
98. Guerrini E, Grattieri M, Trasatti SP, Bestetti M, Cristiani P. Performance explorations of single chamber microbial fuel cells by using various microelectrodes applied to biocathodes. *Int J Hydrog Energy*. 2014 Dec 12;39(36):21837–46.
99. Yang S, Jia B, Liu H. Effects of the Pt loading side and cathode-biofilm on the performance of a membrane-less and single-chamber microbial fuel cell. *Bioresour Technol*. 2009 Feb;100(3):1197–202.
100. Zhang X, Cheng S, Wang X, Huang X, Logan BE. Separator Characteristics for Increasing Performance of Microbial Fuel Cells. *Environ Sci Technol*. 2009 Nov 1;43(21):8456–61.
101. Zhang F, Brastad KS, He Z. Integrating Forward Osmosis into Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment, Water Extraction and Bioelectricity Generation. *Environ Sci Technol*. 2011 Aug 1;45(15):6690–6.
102. Zhu X-Z, Zhang F, Li W-W, Liu H-Q, Wang Y-K, Huang M-S. Forward osmosis membrane favors an improved proton flux and electricity generation in microbial fuel cells. *Desalination*. 2015 Sep 15;372:26–31.
103. Rozendal RA, Hamelers HVM, Buisman CJN. Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ Sci Technol*. 2006 Sep 1;40(17):5206–11.
104. Zhao F, Harnisch F, Schroeder U, Scholz F, Bogdanoff P, Herrmann I. Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2006 Sep 1;40(17):5193–9.
105. Gohil JM, Karamanev DG. Novel approach for the preparation of ionic liquid/ imidazoledicarboxylic acid modified poly(vinyl alcohol) polyelectrolyte membranes. *J Membr Sci*. 2016;513:33–9.
106. Leong JX, Daud WRW, Ghasemi M, Ahmad A, Ismail M, Ben Liew K. Composite membrane containing graphene oxide in sulfonated polyether ether ketone in microbial fuel cell applications. *Int J Hydrog Energy*. 2015 Sep 21;40(35):11604–14.
107. Lee Y-Y, Kim TG, Cho K. Effects of proton exchange membrane on the performance and microbial community composition of air-cathode microbial fuel cells. *J Biotechnol*. 2015 Oct 10;211:130–7.

108. Hernandez-Flores G, Poggi-Varaldo HM, Solorza-Feria O, Romero-Castanon T, Rios-Leal E, Galindez-Mayer J, et al. Batch operation of a microbial fuel cell equipped with alternative proton exchange membrane. *Int J Hydrog Energy*. 2015 Dec 28;40(48):17323–31.
109. Hernandez-Fernandez FJ, Perez de los Rios A, Mateo-Ramirez F, Godinez C, Lozano-Blanco LJ, Moreno JI, et al. New application of supported ionic liquids membranes as proton exchange membranes in microbial fuel cell for waste water treatment. *Chem Eng J*. 2015 Nov 1;279:115–9.
110. Torres CI, Marcus AK, Rittmann BE. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Aug 1;100(5):872–81.
111. Kim BH, Chang IS, Gadd GM. Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Sep;76(3):485–94.
112. Ye Y, Zhu X, Logan BE. Effect of buffer charge on performance of air-cathodes used in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* [Internet]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346861630370X>
113. Le Bonté S, Pons M-N, Potier O, Rocklin P. Relation Between Conductivity and Ion Content in Urban Wastewater. *J Water Sci*. 2008;21(4):429–38.
114. Cao X, Huang X, Liang P, Xiao K, Zhou Y, Zhang X, et al. A New Method for Water Desalination Using Microbial Desalination Cells. *Environ Sci Technol*. 2009 Sep 15;43(18):7148–52.
115. Kim Y, Logan BE. Series Assembly of Microbial Desalination Cells Containing Stacked Electrodialysis Cells for Partial or Complete Seawater Desalination. *Environ Sci Technol*. 2011 Jul 1;45(13):5840–5.
116. Shehab NA, Amy GL, Logan BE, Saikaly PE. Enhanced water desalination efficiency in an air-cathode stacked microbial electrodeionization cell (SMEDIC). *J Membr Sci*. 2014 Nov 1;469:364–70.
117. Nam J-Y, Jwa E, Kim D, Park S-C, Jeong N. Selective removal of multivalent ions from seawater by bioelectrochemical system. *Desalination*. 2015 Mar 2;359:37–40.
118. Cusick RD, Kim Y, Logan BE. Energy Capture from Thermolytic Solutions in Microbial Reverse-Electrodialysis Cells. *Science*. 2012 Mar 23;335(6075):1474–7.
119. Liu J, Geise GM, Luo X, Hou H, Zhang F, Feng Y, et al. Patterned ion exchange membranes for improved power production in microbial reverse-electrodialysis cells. *J Power Sources*. 2014 Dec 20;271:437–43.
120. Clauwaert P, Rabaey K, Aelterman P, De Schampelaire L, Ham TH, Boeckx P, et al. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2007 May 1;41(9):3354–60.
121. Viridis B, Rabaey K, Yuan Z, Keller J. Microbial fuel cells for simultaneous carbon and nitrogen removal. *Water Res*. 2008 Jun;42(12):3013–24.
122. Kuntke P, Smiech KM, Bruning H, Zeeman G, Saakes M, Sleutels THJA, et al. Ammonium recovery and energy production from urine by a microbial fuel cell. *Water Res*. 2012 May 15;46(8):2627–36.
123. Kelly PT, He Z. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review. *Bioresour Technol*. 2014 Feb;153:351–60.
124. Modin O, Fukushi K, Rabaey K, Rozendal RA, Yamamoto K. Redistribution of wastewater alkalinity with a microbial fuel cell to support nitrification of reject water. *Water Res*. 2011 Apr;45(8):2691–9.
125. Krieg T, Sydow A, Schroeder U, Schrader J, Holtmann D. Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends Biotechnol*. 2014 Dec;32(12):645–55.
126. Fan Y, Hu H, Liu H. Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration. *J Power Sources*. 2007 Sep 27;171(2):348–54.
127. Fan Y, Han S-K, Liu H. Improved performance of CEA microbial fuel cells with increased reactor size. *Energy Environ Sci*. 2012 Aug;5(8):8273–80.

128. Abourached C, Lesnik KL, Liu H. Enhanced power generation and energy conversion of sewage sludge by CEA-microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 2014 Aug;166:229–34.
129. Greenlee LF, Lawler DF, Freeman BD, Marrot B, Moulin P. Reverse osmosis desalination: Water sources, technology, and today's challenges. *Water Res.* 2009 May;43(9):2317–48.
130. Remigy J-C, Desclaux S. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Tech Ing.* 2007;
131. Xu TW. Ion exchange membranes: State of their development and perspective. *J Membr Sci.* 2005 Oct 15;263(1–2):1–29.
132. Harnisch F, Schroder U, Scholz F. The suitability of monopolar and bipolar ion exchange membranes as separators for biological fuel cells. *Environ Sci Technol.* 2008 Mar 1;42(5):1740–6.
133. Kim JR, Cheng S, Oh S-E, Logan BE. Power generation using different cation, anion, and ultrafiltration membranes in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol.* 2007 Feb 1;41(3):1004–9.
134. Chae KJ, Choi M, Ajayi FF, Park W, Chang IS, Kim IS. Mass transport through a proton exchange membrane (Nafion) in microbial fuel cells. *Energy Fuels.* 2008 Feb;22(1):169–76.
135. Khilari S, Pandit S, Ghangrekar MM, Pradhan D, Das D. Graphene Oxide-Impregnated PVA-STA Composite Polymer Electrolyte Membrane Separator for Power Generation in a Single-Chambered Microbial Fuel Cell. *Ind Eng Chem Res.* 2013 Aug 21;52(33):11597–606.
136. Venkatesan PN, Dharmalingam S. Effect of cation transport of SPEEK - Rutile TiO₂ electrolyte on microbial fuel cell performance. *J Membr Sci.* 2015 Oct 15;492:518–27.
137. Tao H-C, Sun X-N, Xiong Y. A novel hybrid anion exchange membrane for high performance microbial fuel cells. *Rsc Adv.* 2015;5(6):4659–63.
138. Kondaveeti S, Lee J, Kakarla R, Kim HS, Min B. Low-cost separators for enhanced power production and field application of microbial fuel cells (MFCs). *Electrochimica Acta.* 2014 Jun 20;132:434–40.
139. Moon JM, Kondaveeti S, Min B. Evaluation of Low-Cost Separators for Increased Power Generation in Single Chamber Microbial Fuel Cells with Membrane Electrode Assembly. *Fuel Cells.* 2015 Feb;15(1):230–8.
140. Sivasankaran A, Sangeetha D. Influence of sulfonated SiO₂ in sulfonated polyether ether ketone nanocomposite membrane in microbial fuel cell. *Fuel.* 2015 Nov 1;159:689–96.
141. Mahendiravarman E, Sangeetha D. Increased microbial fuel cell performance using quaternized poly ether ether ketone anionic membrane electrolyte for electricity generation. *Int J Hydrog Energy.* 2013 Feb 19;38(5):2471–9.
142. Elangovan M, Dharmalingam S. Preparation and performance evaluation of poly (ether-imide) based anion exchange polymer membrane electrolyte for microbial fuel cell. *Int J Hydrog Energy [Internet].* 2016; Available from: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.185](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.185)
143. Ji E, Moon H, Piao J, Ha PT, An J, Kim D, et al. Interface resistances of anion exchange membranes in microbial fuel cells with low ionic strength. *Biosens Bioelectron.* 2011 Mar 15;26(7):3266–71.
144. Strathmann H, Grabowski A, Eigenberger G. Ion-Exchange Membranes in the Chemical Process Industry. *Ind Eng Chem Res.* 2013 Aug 7;52(31):10364–79.
145. Malki M, De lacey AL, Rodrfiguez N, Amils R, Fernandez VM. Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jul;74(14):4472–6.
146. Sulonen MLK, Kokko ME, Lakaniemi A-M, Puhakka JA. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *J Hazard Mater.* 2015 Mar 2;284:182–9.
147. Rahimnejad M, Bakeri G, Ghasemi M, Zirepour A. A review on the role of proton exchange membrane on the performance of microbial fuel cell. *Polym Adv Technol.* 2014 Dec;25(12):1426–32.

148. Han L, Galier S, Roux-de Balman H. Ion hydration number and electro-osmosis during electrodialysis of mixed salt solution. *Desalination*. 2015 Oct 1;373:38–46.
149. Gajda I, Greenman J, Melhuish C, Santoro C, Li B, Cristiani P, et al. Electro-osmotic-based catholyte production by Microbial Fuel Cells for carbon capture. *Water Res* [Internet]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415301652>
150. Mauritz KA, Moore RB. State of understanding of Nafion. *Chem Rev*. 2004 Oct;104(10):4535–85.
151. Rahimnejad M, Jafary T, Haghparast F, Najafpour GD, Ghoreyshi AA. Nafion as a nanoproton conductor in microbial fuel cells. *Turk J Eng Env Sci*. 2010;34:289–92.
152. Ghasemi M, Halakoo E, Sedighi M, Alam J, Sadeqzadeh M. Performance comparison of three common proton exchange membranes for sustainable bioenergy production in microbial fuel cell. In: Selige G, Yusof NM, editors. *12th Global Conference on Sustainable Manufacturing - Emerging Potentials*. 2015. p. 162–6.
153. Pant D, Van Bogaert G, De Smet M, Diels L, Vanbroekhoven K. Use of novel permeable membrane and air cathodes in acetate microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*. 2010 Nov 1;55(26):7710–6.
154. Hernandez-Flores G, Poggi-Varaldo HM, Solorza-Feria O, Ponce-Noyola MT, Romero-Castanon T, Rinderknecht-Seijas N, et al. Characteristics of a single chamber microbial fuel cell equipped with a low cost membrane. *Int J Hydrog Energy*. 2015 Dec 28;40(48):17380–7.
155. Xu J, Sheng G-P, Luo H-W, Li W-W, Wang L-F, Yu H-Q. Fouling of proton exchange membrane (PEM) deteriorates the performance of microbial fuel cell. *Water Res*. 2012 Apr 15;46(6):1817–24.
156. Ghasemi M, Daud WRW, Ismail M, Rahimnejad M, Ismail AF, Leong JX, et al. Effect of pre-treatment and biofouling of proton exchange membrane on microbial fuel cell performance. *Int J Hydrog Energy*. 2013 May 1;38(13):5480–4.
157. Choi M-J, Chae K-J, Ajayi FF, Kim K-Y, Yu H-W, Kim C, et al. Effects of biofouling on ion transport through cation exchange membranes and microbial fuel cell performance. *Bioresour Technol*. 2011 Jan;102(1):298–303.
158. Mokhtarian N, Ghasemi M, Daud WRW, Ismail M, Najafpour G, Alam J. Improvement of Microbial Fuel Cell Performance by Using Nafion Polyaniline Composite Membranes as a Separator. *J Fuel Cell Sci Technol*. 2013 Aug;10(4):41008.
159. Kamaraj S-K, Molla Romano S, Compan Moreno V, Poggi-Varaldo HM, Solorza-Feria O. Use of Novel Reinforced Cation Exchange Membranes for Microbial Fuel Cells. *Electrochimica Acta*. 2015 Sep 10;176:555–66.
160. Ghasemi M, Daud WRW, Ismail AF, Jafari Y, Ismail M, Mayahi A, et al. Simultaneous wastewater treatment and electricity generation by microbial fuel cell: Performance comparison and cost investigation of using Nafion 117 and SPEEK as separators. *Desalination*. 2013 Sep 16;325:1–6.
161. Chae K-J, Kim K-Y, Choi M-J, Yang E, Kim IS, Ren X, et al. Sulfonated polyether ether ketone (SPEEK)-based composite proton exchange membrane reinforced with nanofibers for microbial electrolysis cells. *Chem Eng J*. 2014 Oct 15;254:393–8.
162. Ghasemi M, Shahgaldi S, Ismail M, Yaakob Z, Daud WRW. New generation of carbon nanocomposite proton exchange membranes in microbial fuel cell systems. *Chem Eng J*. 2012 Mar 1;184:82–9.
163. Sivasankaran A, Sangeetha D, Ahn Y-H. Nanocomposite membranes based on sulfonated polystyrene ethylene butylene polystyrene (SSEBS) and sulfonated SiO₂ for microbial fuel cell application. *Chem Eng J*. 2016 Apr 1;289:442–51.
164. Elangovan M, Dharmalingam S. A facile modification of a polysulphone based anti biofouling anion exchange membrane for microbial fuel cell application. *Rsc Adv*. 2016;6(25):20571–81.
165. Pandit S, Sengupta A, Kale S, Das D. Performance of electron acceptors in catholyte of a two-chambered microbial fuel cell using anion exchange membrane. *Bioresour Technol*. 2011 Feb;102(3):2736–44.
166. Pandit S, Ghosh S, Ghangrekar MM, Das D. Performance of an anion exchange membrane in association with cathodic parameters in a dual chamber microbial fuel cell. *Int J Hydrog Energy*. 2012 Jun;37(11):9383–92.

167. Piao J, An J, Ha PT, Kim T, Jang JK, Moon H, et al. Power Density Enhancement of Anion-Exchange Membrane-Installed Microbial Fuel Cell Under Bicarbonate-Buffered Cathode Condition. *J Microbiol Biotechnol*. 2013 Jan;23(1):36–9.
168. Zuo Y, Cheng S, Logan BE. Ion exchange membrane cathodes for scalable microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2008 Sep 15;42(18):6967–72.
169. Mo Y, Liang P, Huang X, Wang H, Cao X. Enhancing the stability of power generation of single-chamber microbial fuel cells using an anion exchange membrane. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009 Dec;84(12):1767–72.
170. Zhang X, Cheng S, Huang X, Logan BE. Improved performance of single-chamber microbial fuel cells through control of membrane deformation. *Biosens Bioelectron*. 2010 Mar 15;25(7):1825–8.
171. Ter Heijne A, Hamelers HVM, De Wilde V, Rozendal RA, Buisman CJN. A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2006 Sep 1;40(17):5200–5.
172. Ter Heijne A, Hamelers HVM, Buisman CJN. Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous iron oxidation of the catholyte. *Environ Sci Technol*. 2007 Jun 1;41(11):4130–4.
173. Chen M, Zhang F, Zhang Y, Zeng RJ. Alkali production from bipolar membrane electrodialysis powered by microbial fuel cell and application for biogas upgrading. *Appl Energy*. 2013 Mar;103:428–34.
174. Fradler KR, Michie F, Dinsdale RM, Guwy AJ, Premier GC. Augmenting Microbial Fuel Cell power by coupling with Supported Liquid Membrane permeation for zinc recovery. *Water Res*. 2014 May 15;55:115–25.
175. Kim E-S, Liu Y, El-Din MG. The effects of pretreatment on nanofiltration and reverse osmosis membrane filtration for desalination of oil sands process-affected water. *Sep Purif Technol*. 2011 Oct 10;81(3):418–28.
176. Tang F, Hu H-Y, Sun L-J, Wu Q-Y, Jiang Y-M, Guan Y-T, et al. Fouling of reverse osmosis membrane for municipal wastewater reclamation: Autopsy results from a full-scale plant. *Desalination*. 2014 Sep 15;349:73–9.
177. Jia Z, Wang B, Song S, Fan Y. Blue energy: Current technologies for sustainable power generation from water salinity gradient. *Renew Sustain Energy Rev*. 2014 Mar;31:91–100.
178. Naghiloo A, Abbaspour M, Mohammadi-Ivatloo B, Bakhtari K. Modeling and design of a 25 MW osmotic power plant (PRO) on Bahmanshir River of Iran. *Renew Energy*. 2015 Jun;78:51–9.
179. Xu P, Bellona C, Drewes JE. Fouling of nanofiltration and reverse osmosis membranes during municipal wastewater reclamation: Membrane autopsy results from pilot-scale investigations. *J Membr Sci*. 2010 May 1;353(1–2):111–21.
180. Fathima NN, Aravindhan R, Lawrence D, Yugandhar U, Moorthy TSR, Nair BU. SPEEK polymeric membranes for fuel cell application and their characterization: A review. *J Sci Ind Res*. 2007 Mar;66(3):209–19.
181. Qin M, Ping Q, Lu Y, Abu-Reesh IM, He Z. Understanding electricity generation in osmotic microbial fuel cells through integrated experimental investigation and mathematical modeling. *Bioresour Technol*. 2015 Nov;195:194–201.
182. Werner CM, Logan BE, Saikaly PE, Amy GL. Wastewater treatment, energy recovery and desalination using a forward osmosis membrane in an air-cathode microbial osmotic fuel cell. *J Membr Sci*. 2013 Feb 1;428:116–22.
183. Yang E, Chae K-J, Alayande AB, Kim K-Y, Kim IS. Concurrent performance improvement and biofouling mitigation in osmotic microbial fuel cells using a silver nanoparticle-polydopamine coated forward osmosis membrane. *J Membr Sci [Internet]*. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2016.04.028>
184. Hoek EMV, Elimelech M. Cake-enhanced concentration polarization: A new fouling mechanism for salt-rejecting membranes. *Environ Sci Technol*. 2003 Dec 15;37(24):5581–8.
185. Tran T, Bolto B, Gray S, Hoang M, Ostarcevic E. An autopsy study of a fouled reverse osmosis membrane element used in a brackish water treatment plant. *Water Res*. 2007 Sep;41(17):3915–23.

186. Ge Z, Ping Q, Xiao L, He Z. Reducing effluent discharge and recovering bioenergy in an osmotic microbial fuel cell treating domestic wastewater. *Desalination*. 2013 Mar 1;312:52–9.
187. Ghadge AN, Ghangrekar MM. Development of low cost ceramic separator using mineral cation exchanger to enhance performance of microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*. 2015 Jun 1;166:320–8.
188. Tang X, Guo K, Li H, Du Z, Tian J. Microfiltration membrane performance in two-chamber microbial fuel cells. *Biochem Eng J*. 2010 Nov 15;52(2–3):194–8.
189. Baker RW. *Membrane Technology and Applications*. In: Third Edition. 2012. p. 223.
190. Baker RW. *Membrane Technology and Applications*. In: Third Edition. Wiley; 2012. p. 255.
191. Van der Bruggen B, Koninckx A, Vandecasteele C. Separation of monovalent and divalent ions from aqueous solution by electrodialysis and nanofiltration. *Water Res*. 2004 Mar;38(5):1347–53.
192. Darbi A, Viraraghavan T, Jin YC, Braul L, Corkal D. Sulfate removal from water. *Water Qual Res J Can*. 2003;38(1):169–82.
193. Paugam L, Taha S, Cabon J, Dorange G. Elimination of nitrate ions in drinking waters by nanofiltration. *Desalination*. 2003 Feb 10;152(1–3):271–4.
194. Garcia F, Ciceron D, Saboni A, Alexandrova S. Nitrate ions elimination from drinking water by nanofiltration: Membrane choice. *Sep Purif Technol*. 2006 Nov;52(1):196–200.
195. Vrijenhoek EM, Waypa JJ. Arsenic removal from drinking water by a “loose” nanofiltration membrane. *Desalination*. 2000 Nov 20;130(3):265–77.
196. Choo KH, Kwon DJ, Lee KW, Choi SJ. Selective removal of cobalt species using nanofiltration membranes. *Environ Sci Technol*. 2002 Mar 15;36(6):1330–6.
197. Kim K-Y, Chae K-J, Choi M-J, Yang E-T, Hwang MH, Kim IS. High-quality effluent and electricity production from non-CEM based flow-through type microbial fuel cell. *Chem Eng J*. 2013 Feb 15;218:19–23.
198. Hou B, Sun J, Hu Y. Simultaneous Congo red decolorization and electricity generation in air-cathode single-chamber microbial fuel cell with different microfiltration, ultrafiltration and proton exchange membranes. *Bioresour Technol*. 2011 Mar;102(6):4433–8.
199. Kim K-Y, Yang E, Lee M-Y, Chae K-J, Kim C-M, Kim IS. Polydopamine coating effects on ultrafiltration membrane to enhance power density and mitigate biofouling of ultrafiltration microbial fuel cells (UF-MFCs). *Water Res*. 2014 May 1;54:62–8.
200. Winfield J, Chambers LD, Rossiter J, Ieropoulos I. Comparing the short and long term stability of biodegradable, ceramic and cation exchange membranes in microbial fuel cells. *Bioresour Technol*. 2013 Nov;148:480–6.
201. Winfield J, Greenman J, Huson D, Ieropoulos I. Comparing terracotta and earthenware for multiple functionalities in microbial fuel cells. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013 Dec;36(12):1913–21.
202. Biffinger JC, Ray R, Little B, Ringeisen BR. Diversifying biological fuel cell designs by use of nanoporous filters. *Environ Sci Technol*. 2007 Feb 15;41(4):1444–9.
203. Sun J, Hu Y, Bi Z, Cao Y. Improved performance of air-cathode single-chamber microbial fuel cell for wastewater treatment using microfiltration membranes and multiple sludge inoculation. *J Power Sources*. 2009 Feb 15;187(2):471–9.
204. Yousefi V, Mohebbi-Kalhari D, Samimi A, Salari M. Effect of separator electrode assembly (SEA) design and mode of operation on the performance of continuous tubular microbial fuel cells (MFCs). *Int J Hydrog Energy*. 2016 Jan 5;41(1):597–606.
205. Zhang X, Cheng S, Huang X, Logan BE. The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. *Energy Environ Sci*. 2010;3(5):659–64.

206. Zhang X, Liang P, Shi J, Wei J, Huang X. Using a glass fiber separator in a single-chamber air-cathode microbial fuel cell shortens start-up time and improves anode performance at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour Technol.* 2013 Feb;130:529–35.
207. Winfield J, Ieropoulos I, Rossiter J, Greenman J, Patton D. Biodegradation and proton exchange using natural rubber in microbial fuel cells. *Biodegradation.* 2013 Nov;24(6):733–9.
208. Winfield J, Chambers LD, Rossiter J, Stinchcombe A, Walter XA, Greenman J, et al. Fade to Green: A Biodegradable Stack of Microbial Fuel Cells. *Chemsuschem.* 2015;8(16):2705–12.

CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes -

Approche expérimentale

1. Inoculum et milieu.....	85
1.1. Inoculum	85
1.2. Milieu synthétique.....	85
2. Dispositifs expérimentaux.....	86
2.1. Electrodes.....	86
2.1.1. Anode	86
2.1.2. Cathode	87
2.1.3. Electrode de référence.....	87
2.1.4. Contre-électrode	87
2.2. Réacteurs électrochimiques	87
2.2.1. Réacteurs électrochimiques « standards »	87
2.2.2. Réacteurs électrochimiques de pile à combustible microbienne	88
3. Techniques d'analyses	89
3.1. Méthodes électrochimiques	89
3.1.1. Chronoampérométrie.....	90
3.1.2. Voltammétrie cyclique	90
3.1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique	91
3.2. Montages d'étude de piles à combustible microbiennes	91
3.3. Dosage enzymatique de l'acétate	93
3.4. Observation des électrodes.....	93
3.4.1. Microscopie à épifluorescence 3D	93
3.4.2. Microscopie électronique à balayage	94
3.5. Analyse des populations microbiennes par pyroséquençage	95

1. Inoculum et milieu

1.1. Inoculum

La source de microorganismes utilisée pour la formation de biofilms électroactifs est le terreau de jardin *Lombri-compost* de la marque Or-Brun (Tableau 2). Il avait déjà été utilisé dans une thèse précédente réalisée au LGC (Pocaznoi, 2012). L'inoculum « lixiviat de terreau » est préparé en mélangeant 1.5 L de ce terreau avec 2.25 L d'une solution 60 mM de KCl. La conductivité du milieu est de 0.88 S.m⁻¹. Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit et est ensuite filtré à l'aide d'une serpillière en coton à très larges mailles vendue dans le commerce pour éliminer la fraction solide. Sauf indication contraire, une solution d'acétate de sodium de concentration finale 20 mM, prélevée à partir d'une solution mère à 2 M, est ajoutée au lixiviat comme substrat.

Tableau 2. Composition et caractéristique du terreau.

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

1.2. Milieu synthétique

Le milieu synthétique est utilisé dans le but de reproduire des conditions de laboratoire contrôlées, avec des nutriments et vitamines nécessaires au bon développement des microorganismes. Il est composé d'une solution de tampon bicarbonate 50 mM (pH 9) enrichie avec une solution de macronutriments (10 mL.L⁻¹), une solution de micronutriments (1 mL.L⁻¹) et une solution de vitamines (1 mL.L⁻¹) décrites dans le Tableau 3. Le milieu est ensuite complété par une solution à 60 mM de KCl et une solution à 20 mM de NaH₂PO₄ permettant un apport en phosphore nécessaire à la croissance bactérienne. La conductivité du milieu est de 1.25 S.m⁻¹. L'acétate de sodium 20 mM, prélevé à partir d'une solution mère à 2 M, est ensuite ajouté au mélange comme substrat. Le pH du milieu est ajusté à 7 si nécessaire par ajout de quelques gouttes d'une solution HCl à 37 %.

Au cours des expérimentations, les changements de milieux, remplacement du lixiviat de terreau par un milieu synthétique, ou renouvellement d'un milieu synthétique usé par un milieu synthétique frais, est effectué à l'aide d'une pompe péristaltique et sous bullage d'azote sans ouverture du réacteur électrochimique à l'air ambiant, afin de perturber le moins possible les microorganismes anaérobies du biofilm.

Tableau 3. Composition des solutions de macronutriments, micronutriments et vitamines utilisées dans le milieu synthétique.

Solution de macronutriments	
Produit	Concentration (g.L ⁻¹)
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	28
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	10
Chlorure de calcium (CaCl ₂ , H ₂ O)	0.57

Solution de micronutriments	
Produit	Concentration (g.L ⁻¹ ou mL.L ⁻¹ *)
Chlorure de fer (FeCl ₂ , 4H ₂ O)	2
Chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6H ₂ O)	1
Chlorure de manganèse (MnCl ₂ , 6H ₂ O)	0.5
Chlorure de zinc (ZnCl ₂)	0.05
Acide borique (H ₃ BO ₃)	0.05
Chlorure de cuivre (CuCl ₂ , 2H ₂ O)	0.04
Ammonium heptamolibdate (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O)	0.07
Chlorure de nickel (NiCl ₂ , 6H ₂ O)	1
Sodium selenite (Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O)	0.16
Acide chlorhydrique 37% (HCl)	2*

Solution de vitamines	
Produit	Concentration (g.L ⁻¹)
Pyridoxine HCl (vitamine B6 chlorhydrate)	1
Acide nicotinique (vitamine B3)	0.5
Riboflavine (vitamine B2)	0.25
Thiamine HCl (vitamine B1 chlorhydrate)	0.25
Biotine (vitamine B8)	0.2
Acide folique (vitamine B9)	0.2
Cobalamine (vitamine B12)	0.01

2. Dispositifs expérimentaux

2.1. Electrodes

2.1.1. Anode

Le support utilisé pour former l'anode microbienne est du tissu de carbone (PaxiTech, Grenoble) de 0.05 cm d'épaisseur. La configuration la plus élémentaire est celle d'une anode plane rectangulaire, mais d'autres, plus complexes, sont conçues dans ces travaux de thèse dans le but d'augmenter la surface active de l'électrode. Des anodes « tridimensionnelles » sont fabriquées manuellement en cousant le tissu de carbone avec du fil à coudre de manière à créer une structure plissée (Figure 3). Un fil de platine, piqué dans le tissu le long de l'électrode, est utilisé pour assurer la connexion électrique. Certaines expériences ont nécessité un collecteur de courant sous forme de grille d'acier inoxydable (partie 3, Chapitre 5).



Figure 3. Exemples d'anodes tridimensionnelles utilisées dans les travaux de thèse.

2.1.2. Cathode

La cathode à air est fournie par le partenaire PaxiTech (Grenoble). Il s'agit d'une électrode de forme circulaire constituée d'une couche active, mélange du catalyseur platine avec un liant hydrophobe (PTFE), et d'une couche de diffusion en feutre de carbone. Dans le projet Bioelec, la fabrication des cathodes est automatisée, et la production en série est réalisée grâce à une machine de pulvérisation (SonoTek). Ce procédé permet une diminution des coûts de fabrication et une meilleure répétabilité. Les compositions standards de la couche active sont 0.5 mg.cm^{-2} en platine et 10% de PTFE. Le collecteur de courant consiste en une plaque en acier inoxydable usinée avec des trous de diamètre 2 à 6 mm pour assurer l'arrivée de l'air.

2.1.3. Electrode de référence

Des électrodes commerciales (ECS, Radiometer) au calomel saturé avec une solution de KCl ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{\text{sat}}$) sont utilisées comme électrodes de référence (+0,244 V/ESH). Le potentiel de chaque électrode de référence est contrôlé avant chaque expérience par rapport à une électrode ECS neuve.

2.1.4. Contre-électrode

Les contre-électrodes (ou électrodes auxiliaires) sont des grilles de platine (Heraeus SAS, Allemagne), au préalable nettoyées à la flamme d'un bec bunsen pour éliminer les dépôts en surface.

2.2. Réacteurs électrochimiques

2.2.1. Réacteurs électrochimiques « standards »

Le réacteur « standard simple compartiment » (Figure 4.A) consiste en une bouteille en verre de type Schott de volume 700 mL, munie d'un couvercle à 4 piquages de type GL18. Trois des piquages permettent l'insertion des électrodes pour un montage électrochimique à 3 électrodes avec une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence, toutes implantées dans le même électrolyte. Le quatrième reste libre en cas de prélèvement de solution pour un dosage d'acétate, de bullage d'azote, d'ajustement du niveau de l'électrolyte en cas d'évaporation ou de mesure de pH. Certaines expériences en réacteur « standard simple compartiment » sont menées avec un dispositif annexe du potentiostat nommé Nstat, permettant le contrôle d'au maximum quatre électrodes de travail pour une même contre-électrode. La température des réacteurs « standards simple compartiment » est réglée par un bain thermostaté ou une étuve à 40°C.

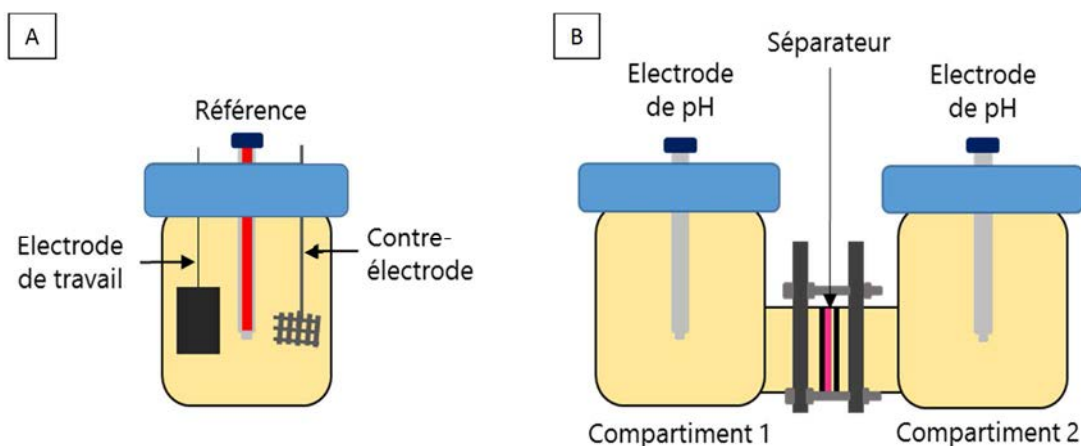


Figure 4. Schéma des réacteurs standards (A) « simple compartiment » et (B) « double compartiment ».

Le réacteur « standard double compartiment » (Figure 4.B) est composé de deux bouteilles de type Schott de 700 mL chacune, usinées pour permettre leur assemblage. Les deux flacons sont joints l'un à l'autre via un système de serrage par vis et sont physiquement séparés par un séparateur de 7 cm². Ce montage est utilisé pour le calcul des coefficients de diffusion des ions OH⁻ à travers différents types de séparateurs en conditions abiotiques (partie 3 du Chapitre 5). Chaque compartiment est rempli avec 700 mL d'une solution de NaOH à pH 8 agitée à l'aide d'un agitateur magnétique. Le pH du compartiment n°1 est ajusté à 11 avec une solution de NaOH à 1 M. Une électrode de pH est introduite dans chaque compartiment pour un suivi en continu au cours du temps. Le coefficient de transfert de masse (k_{OH^-} , m.s⁻¹) est calculé selon la formule suivante :

$$k_{HO^-} = -\frac{V}{A \times t} \times \ln\left(\frac{C_1^0 - C_2}{C_1^0}\right) \quad (2.1)$$

avec V (m³) le volume du compartiment, A (m²) la section du séparateur, C_1^0 et C_2 (mol.m⁻³) la concentration initiale en ions OH⁻ dans le compartiment 1 et la concentration dans le compartiment 2 au temps t (s), respectivement.

2.2.2. Réacteurs électrochimiques de pile à combustible microbienne

Dans ces travaux de thèse, différents réacteurs de piles à combustible microbiennes (PCMs) ont été conçus et réalisés. Les photographies des différentes configurations de pile sont présentées dans la Figure 5. Les réacteurs ne sont pas décrits en détail dans ce chapitre. Leur description exhaustive est accessible dans le manuscrit au niveau des parties correspondantes indiquées dans le Tableau 4. L'objectif premier est la mise en œuvre et l'optimisation d'une PCM, mais certains prototypes sont également utilisés dans le cadre de l'analyse de la cathode à air (partie 1 du chapitre 4). Le réacteur « PCM avec cathode à air amovible », en verre, a été fabriqué par l'entreprise Avitec. L'ensemble des autres prototypes, en plexiglass transparent, ont été élaborés au sein de l'atelier du LGC sous la supervision d'Alain Müller, Vincent Loisel et Frédéric Da Costa. Toutes les expériences réalisées avec les réacteurs présentés dans cette partie ont été menées dans une étuve à une température de 40°C.

Tableau 4. Les différents types de réacteurs de pile à combustible microbienne élaborés dans ces travaux de thèse.

Réacteur	Volume	Référence dans le manuscrit
« PCM avec cathode à air amovible »	1.8 L	Analyse de la cathode à air : Chapitre 4, partie 1, p.116 Pile : Chapitre 5, partie 1, p.182
« Multiples Air Cathodes » ou « MAC »	170 mL	Pile : Chapitre 5, partie 2.1, p.195
« Cube »	400 mL	Pile : Chapitre 5, partie 2.2, p.200
« Assemblage Séparateur-Electrodes » ou « ASE »	400 mL	Analyse de la cathode à air : Chapitre 4, partie 1, p.116 Pile : Chapitre 5, partie 3, p.206 Pile : Chapitre 6, partie 2, p.257
« PCMs dans un électrolyte commun »	1.8 L	Pile : Chapitre 6, partie 1 , p.234

« PCM avec cathode à air amovible »



« Multiple Air Cathodes » ou « MAC »



« Cube »



« Assemblage Séparateur-Electrodes »
ou « ASE »



« PCMs dans un électrolyte commun »

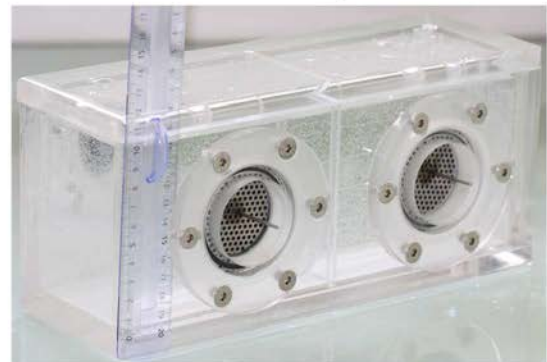


Figure 5 : Photographies des différents réacteurs de Piles à Combustible Microbiennes utilisés au cours de la thèse.

3. Techniques d'analyses

3.1. Méthodes électrochimiques

Trois méthodes d'analyse électrochimiques sont utilisées au cours de cette thèse : la chronoampérométrie, la voltammétrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique. L'ensemble des mesures est réalisé avec un multi-potentiostat (VMP, Bio-Logic SA, France) et l'acquisition des données est pilotée grâce au logiciel Ec-Lab (version 10.2).

3.1.1. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie (CA) consiste à imposer un potentiel fixe à l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence et à suivre l'évolution du courant délivré au cours du temps. Le courant électrique mesuré peut être exprimé en intensité (mA) ou en densité de courant ($A.m^{-2}$) par rapport à la surface géométrique (projetée ou totale) de l'électrode. Dans cette thèse, cette technique est utilisée pour l'étape de formation de la bioanode au cours de laquelle l'électrode de travail est toujours polarisée à -0.2 V/ECS.

A partir du chronoampérogramme représentant l'intensité délivrée par la bioanode en fonction du temps, les rendements faradiques sont calculés. Le rendement faradique anodique correspond à la quantité de matière organique dégradée qui est effectivement convertie en électricité. Il s'agit de la charge qui traverse le circuit électrique durant une période donnée divisée par la charge théorique qui aurait été produite si toute la matière organique avait été dégradée par oxydation électrochimique pendant cette période :

$$CE = \frac{\int idt}{\Delta CVn_e F} \quad (2.2)$$

avec ΔC ($mol.L^{-1}$) la concentration d'acétate consommée entre deux ajouts, V (m^3) le volume du réacteur, $F = 96\,485\ C.mol^{-1}$ la constante de Faraday et $n_e = 8$ le nombre d'électrons produits par molécule d'acétate. Le numérateur représente l'intégrale du courant entre deux ajouts d'acétate.

3.1.2. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (CV = Cyclic Voltammetry) est une méthode qui consiste à enregistrer le courant délivré par l'électrode de travail en réponse à un balayage linéaire en potentiel. Le potentiel appliqué à l'électrode varie entre deux valeurs fixes, depuis une valeur initiale jusqu'à une valeur limite nommée « potentiel d'inversion ». A partir de cette limite, le sens du balayage en potentiel est inversé. La même fenêtre de potentiel est alors parcourue mais cette fois dans le sens opposé, depuis le potentiel d'inversion pour revenir au potentiel initial. La vitesse de variation du potentiel, appelée vitesse de balayage, est fixée à $1\ mV.s^{-1}$. La plage de potentiels balayée dépend de l'électrode étudiée et du type de réaction se produisant à l'électrode (oxydation ou réduction) et peut varier de -0.5 V/ECS à +0.3 V/ECS. Pour chaque analyse en CV, trois cycles successifs en conditions identiques sont enregistrés. Le premier cycle est en général légèrement différent des deux autres, qui eux se superposent parfaitement. Le second cycle est systématiquement choisi.

Dans le cas de la formation de la bioanode, une CV est réalisée avant le début de la chronoampérométrie à t_0 , lorsqu'aucun biofilm n'a encore colonisé le support et qu'aucun courant n'est délivré par l'électrode. Une autre série de CVs est lancée lorsque le courant atteint son maximum, à savoir en présence de substrat à oxyder. On parle dans ces conditions d'une CV catalytique ou « turn-over ». Enfin, lorsqu'un biofilm est bien établi sur l'électrode mais que tout le substrat a été consommé et que le courant est retombé à une valeur nulle, une CV dite non catalytique ou « non turn-over » permet de visualiser les composés redox du biofilm.

3.1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS = Electrochemical Impedance Spectroscopy) consiste à perturber l'état stationnaire d'un système électrochimique et à observer le retour à l'état stationnaire de chaque processus élémentaire, avec son propre temps de réponse. A contrario des techniques électrochimiques dites « classiques », le potentiostat n'impose pas un signal linéaire mais sinusoïdal à l'électrode de travail autour d'un potentiel ou d'un courant stationnaire fixé.

Dans le cas présent, les spectroscopies d'impédance sont réalisées soit en imposant à l'électrode de travail un potentiel (mode potentiostatique), soit un courant (mode galvanostatique). L'amplitude du signal est fixée à 10 mV et 100 ou 200 μA en mode potentiostatique et galvanostatique, respectivement. La gamme de fréquence à étudier varie de 10 mHz à 100 kHz avec un échantillonnage de 10 points par décade. L'impédance est définie comme un nombre complexe composé d'une partie réelle et d'une partie imaginaire $Z = \text{Re}(Z) + j \text{Im}(Z)$. Les résultats obtenus sont représentés sous la forme d'un diagramme de Nyquist, qui trace la partie imaginaire de l'impédance en fonction de la partie réelle. L'exploitation du diagramme se limite à l'évaluation de la valeur de l'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses $\text{Re}(Z)$ dans les hautes fréquences. Cette valeur est homogène à une résistance et se mesure en Ohms. Elle est représentative des phénomènes de résistivité se produisant entre l'anode et la cathode.

3.2. Montages d'étude de piles à combustible microbiennes

Lorsque la bioanode, formée par chronoampérométrie et caractérisée par voltammétrie cyclique, délivre des densités de courant satisfaisantes entre 15 et 20 A.m^{-2} , une cathode à air est mise en place pour procéder à un fonctionnement en pile. Les performances de la PCM sont évaluées en établissant une courbe de puissance, qui trace la puissance délivrée par la pile (en mW ou W.m^{-2}) en fonction du courant débité (en mA ou A.m^{-2}). Cette courbe est obtenue en faisant débiter la pile à travers des résistances de différentes valeurs, variant de 33 000 Ω à 0 Ω . Elle présente généralement une forme en cloche dont le point maximal correspond au point optimal de la PCM (Figure 6.A). Une électrode de référence insérée dans le montage permet de caractériser l'anode microbienne et la cathode de la PCM en mesurant leurs potentiels respectifs (Figure 6.B). Lorsque les performances de la PCM sont suivies au cours du temps, entre deux mesures de courbe de puissance, la pile débite en continu à travers une résistance de valeur égale à celle ayant permis d'obtenir la puissance maximale.

Le montage expérimental d'étude d'une PCM individuelle (Figure 6.C) consiste à brancher la PCM en série à une boîte de résistances permettant de faire varier la valeur de la résistance de manière très précise sans modifier les branchements. Un voltmètre de grande impédance (Keithley, 2000 multimeter, USA), placé en dérivation de la boîte de résistance, mesure la tension délivrée U_{cellule} par la PCM. Un second voltmètre mesure les potentiels respectifs de la bioanode et de la cathode par rapport à l'électrode de référence.

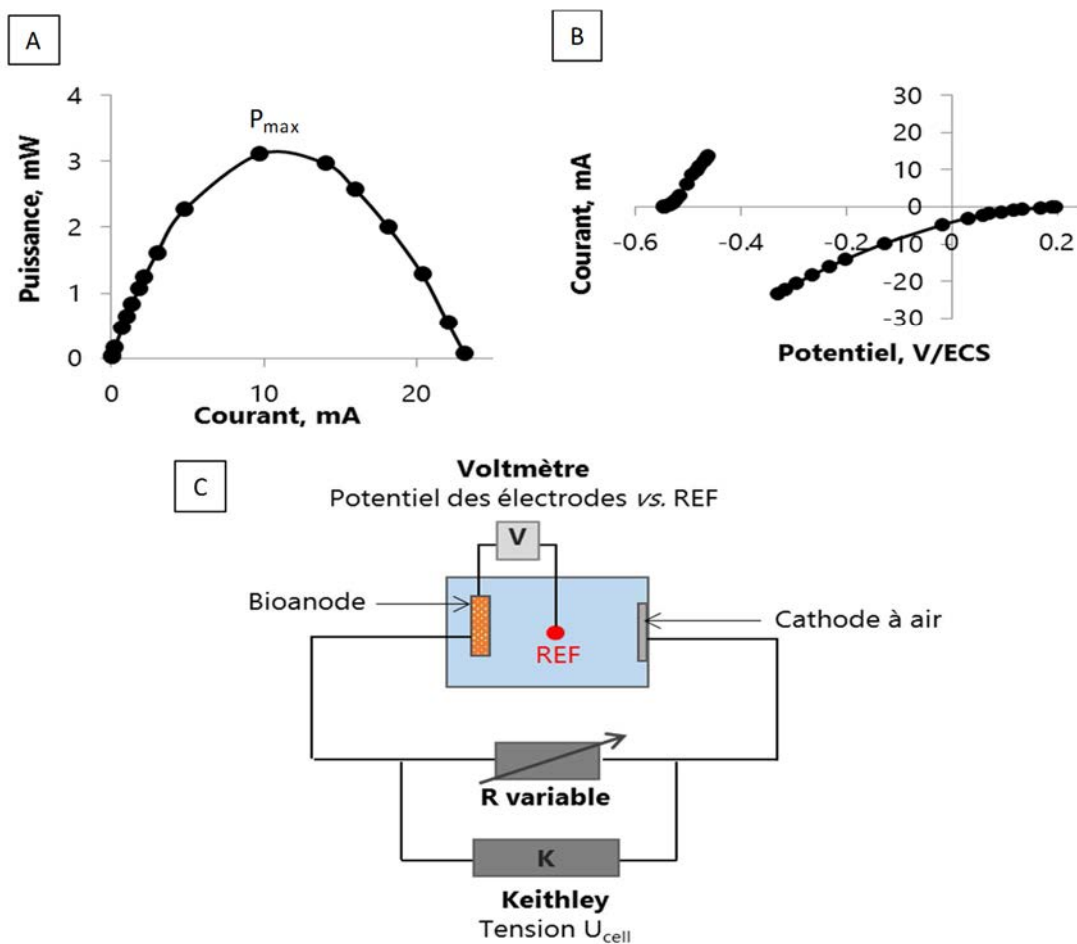


Figure 6. (A) Courbe de puissance classique d'une PCM. (B) Caractérisation des électrodes d'une PCM par rapport à l'électrode de référence (ECS). (C) Schéma du montage expérimental d'étude d'une PCM individuelle.

L'association de plusieurs PCMs en série ou en parallèle permet dans le premier cas d'additionner les tensions (Figure 7.A), et dans le second cas d'additionner les courants (Figure 7.B). Le montage expérimental d'étude est similaire à celui d'une PCM individuelle décrit précédemment.

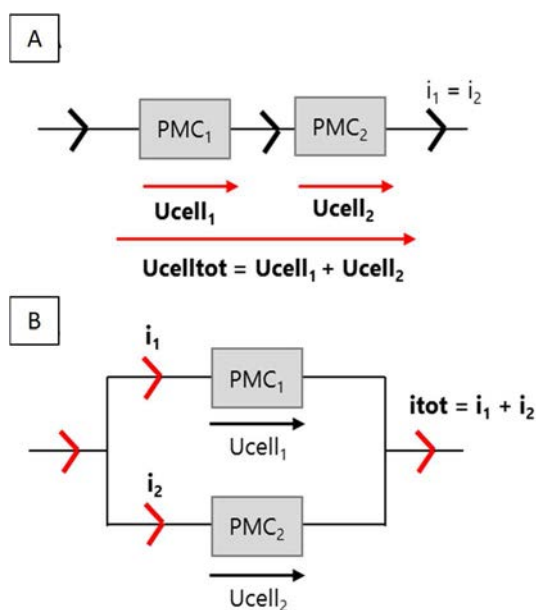


Figure 7. Schéma de branchements électriques de deux PCMs (A) en série et (B) en parallèle.

3.3. Dosage enzymatique de l'acétate

Le dosage de l'acétate est réalisé avec le kit enzymatique K-ACETAK (Megazyme, Libios). Le protocole expérimental comporte trois étapes successives (Figure 8) : la phosphorylation de l'acide acétique en acétylphosphate qui génère de l'ADP, la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate en pyruvate couplée à la production d'ATP et enfin la hydrogénation du pyruvate en acide lactique. Le temps de réaction est de 10 minutes. La méthode consiste en un dosage indirect de la quantité de NADH restante par absorbance à 340 nm (spectromètre JENWAY 7315). La quantité mesurée est inversement proportionnelle à la quantité d'acide acétique dosée. L'étalonnage a été effectué avec des solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes entre 0 et 500 mg.L⁻¹.

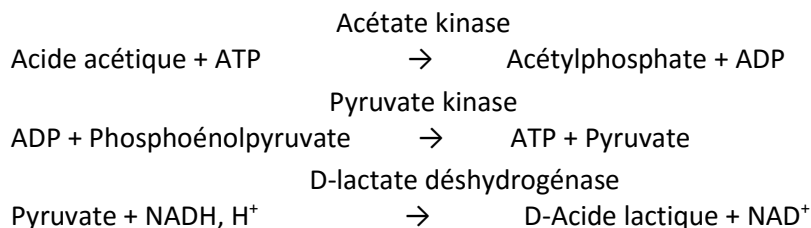


Figure 8. Réactions mises en jeu lors du dosage de l'acide acétique par kit enzymatique.

3.4. Observation des électrodes

3.4.1. Microscopie à épifluorescence 3D

La colonisation globale des électrodes par un biofilm électroactif est caractérisée par microscopie à épifluorescence 3D (Figure 9). Les biofilms sont visualisés avec un microscope Carl Zeiss Axio Imager-M2 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). Les images sont acquises avec une caméra monochrome numérique (Evolution VF) et traitées avec le logiciel Zen. Avant observation au microscope, les électrodes sont traitées à l'acridine orange 0.01% (A6014 Sigma), un fluorochrome spécifique des acides nucléiques. L'électrode est recouverte de la solution aqueuse pendant 10 minutes puis rincée délicatement à deux reprises avec de l'eau physiologique. Les échantillons sont ensuite laissés à température ambiante pendant au minimum 12 heures avant les observations.

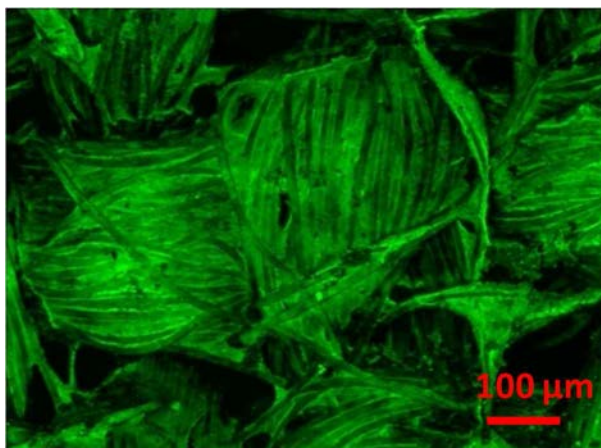


Figure 9. Biofilm sur tissu de carbone par microscopie à épifluorescence 3D.

Le taux de recouvrement de l'électrode par le biofilm peut être calculé à partir des images obtenues par microscopie à épifluorescence. Pour chaque électrode analysée, 3 spots sont choisis aléatoirement. Pour chaque spot, un « stack » de n images superposées est observé. Les images, variant en nombre de 30 à 50 selon l'épaisseur du biofilm, sont espacées l'une de l'autre d'une distance constante de $3.9 \mu\text{m}$ et sont prises le long de l'axe z de l'électrode. Pour chaque image, le volume local recouvert par le biofilm est calculé en multipliant la portion de surface recouverte par le biofilm θ_i par l'épaisseur δ et par l'aire A_{image} de l'image. Le volume total recouvert par le biofilm correspond à la somme des volumes locaux. Enfin, le taux de recouvrement s'obtient en divisant le volume total recouvert par le biofilm par le volume total de n images :

$$\text{Taux de recouvrement} = \frac{\sum_{i=1}^n \theta_i \times \delta \times A_{\text{image}}}{n \times \delta \times A_{\text{image}}} = \frac{\sum_{i=1}^n \theta_i}{n} \quad (2.3)$$

3.4.2. Microscopie électronique à balayage

Afin d'avoir une estimation de la colonisation des bioanodes par le biofilm à l'échelle cellulaire, les électrodes sont observées par microscopie électronique à balayage (Figure 10). Ces observations sont réalisées au Service d'Analyse et Procédé du LGC (appareil Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT) avec l'aide précieuse de Marie-Line De Solan. La microscopie électronique à balayage consiste à envoyer un faisceau d'électrons sur l'échantillon, lesquels vont venir s'intercaler dans les atomes de la structure observée. Par analogie avec la réflexion des photons, les électrons vont émettre des électrons secondaires très sensibles à la topographie. Un détecteur d'électrons secondaires retransmet l'image de l'échantillon.

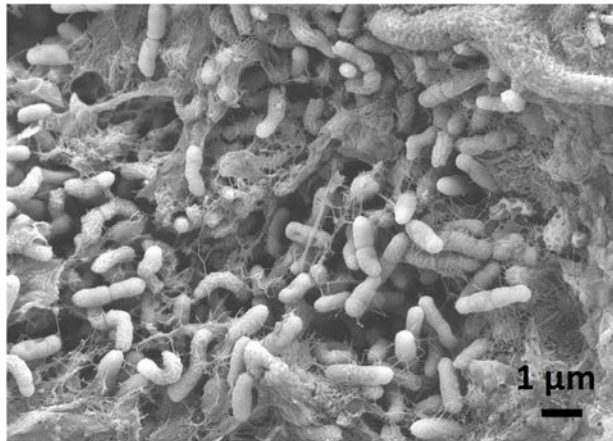


Figure 10. Image MEB d'un biofilm électroactif sur du tissu de carbone au grossissement x7500.

L'observation au MEB implique une mise sous vide de l'échantillon pour ne pas perturber le passage du faisceau lumineux. Une préparation des électrodes est donc au préalable nécessaire afin de les déshydrater. La procédure se décompose en trois étapes : une fixation de l'échantillon, sa déshydratation et enfin une métallisation pour le rendre conducteur.

Fixation : les électrodes sont placées dans un bain contenant 50% d'une solution de glutaraldéhyde à 4% vol., 25% d'une solution de tampon phosphate (0.4 M - pH 8.4) et 25% d'eau distillée. La fixation peut durer de 20 minutes à 2 heures, selon le matériau d'électrode et sa porosité. Pour le tissu de carbone, le temps de fixation est de l'ordre de 1 heure. Une fois la fixation effectuée, les échantillons

sont ensuite délicatement lavés à deux reprises dans une solution contenant 50% d'une solution de saccharose à 0.6 M, 25% de tampon phosphate (0.4 M - pH 8.4) et 25% d'eau distillée.

Déshydratation : l'échantillon est dans un premier temps plongé dans des mélanges eau/acétone dont la proportion en acétone augmente progressivement : 50%/50% (5 minutes), 30%/70% (5 minutes) et 100% d'acétone (30 minutes). Les électrodes sont ensuite plongées dans un mélange acétone/hexaméthylidisilazane (HMDS) à 50%/50% pendant 10 minutes puis dans 100% HMDS jusqu'à évaporation totale du solvant.

Métallisation : l'échantillon est recouvert d'une nanocouche d'or (10/20nm) par pulvérisation cathodique à froid.

3.5. Analyse des populations microbiennes par pyroséquençage

Le pyroséquençage de l'ADN permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides, molécules de bases de l'ADN, et d'identifier par comparaison et selon le niveau d'exigence du séquençage une classe, un ordre, une famille, un genre, une espèce donnée de microorganisme. Le pyroséquençage et les analyses bioinformatiques des échantillons ont été sous-traités au laboratoire américain Research and Testing Laboratory (RTLab) situé à Lubbock (Texas).

En amont, l'extraction d'ADN des microorganismes développés sur les bioanodes ou planctoniques est réalisée dans les locaux du LGC à la faculté de pharmacie (site de Ranguel) avec l'aide précieuse de Sophie Pecastaings et Alexis Simons. Dans le cas biofilms anodiques, les électrodes sont délicatement retirées des réacteurs en fin d'expérience et rincées avec de l'eau physiologique (ou du milieu synthétique sans vitamines ni nutriments). L'électrode est placée dans un tube à essai avec 2 mL d'eau distillée stérile puis le biofilm est détaché par sonication (3 minutes à une puissance de 80 W). 1.5 mL du liquide soniqué sont prélevés avec une pipette et conditionnés dans des tubes à bouchons vissant d'une contenance de 2 mL certifiés exempt d'ADN, d'ADNase et ARNase. Dans le cas des cellules planctoniques, 1.5 mL de milieu de culture sont directement prélevés et conservés dans les tubes à bouchons. L'extraction d'ADN est ensuite 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 par voie postale au laboratoire américain. A la réception des résultats, chaque niveau taxonomique est analysé individuellement fournissant des informations d'abondance relative au sein de l'échantillon. Cela permet d'avoir un aperçu des groupes microbiens dominants au sein de l'échantillon et de comparer les échantillons entre eux. Plus l'ADN extrait est de bonne qualité et plus l'identification est précise (jusqu'à l'espèce).

CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes - Approche numérique

1. Aspects théoriques	99
1.1. Notion de potentiels	99
1.1.1. Potentiel absolu d'électrode	99
1.1.2. Potentiel d'électrode mesuré expérimentalement.....	99
1.1.3. Tension d'une pile à combustible microbienne	100
1.1.4. Calcul des distributions de potentiel et de courant	101
1.2. Distributions de potentiel	102
1.2.1. Distribution primaire	102
1.2.2. Distribution secondaire	102
1.2.3. Distribution tertiaire.....	102
2. Distribution secondaire de potentiel dans une pile à combustible microbienne.....	103
2.1. Hypothèses simplificatrices	103
2.2. Ajustement des cinétiques expérimentales des électrodes.....	104
2.2.1. Correction de la chute ohmique.....	105
2.2.2. Lissage par des équations (bio)électrochimiques	106
2.2.3. Ajustement des paramètres.....	107
2.3. Distributions de courant et de potentiel	107

1. Aspects théoriques

1.1. Notion de potentiels

1.1.1. Potentiel absolu d'électrode

Le potentiel absolu d'électrode, appelé potentiel de Nernst et noté E , est défini comme la différence entre le potentiel électrostatique du matériau d'électrode ϕ_M et le potentiel électrostatique de la solution à son contact ϕ_S :

$$E = \phi_M - \phi_S \quad (3.1)$$

Le potentiel absolu d'électrode n'est pas directement mesurable. Expérimentalement, il n'est possible d'avoir accès qu'à une différence de potentiel entre deux électrodes. Toute mesure inclut donc au minimum deux potentiels de Nernst. Les électrochimistes ont résolu ce problème en choisissant une électrode bien définie pour laquelle ils ont arbitrairement déclaré le potentiel de Nernst égal à zéro. C'est l'électrode standard à hydrogène (ESH), prise comme origine des potentiels. Cette électrode n'étant pas d'utilisation aisée, l'expérimentateur a recours à d'autres électrodes, faciles à mettre en œuvre, qui ont un potentiel de Nernst fixe à condition de respecter quelques conditions peu contraignantes (contact ionique avec la solution, bonne concentration de l'électrolyte interne). Les potentiels de Nernst sont ainsi exprimés par rapport à l'ESH, ou par rapport à une électrode de référence donnée dont on connaît le potentiel par rapport à ESH.

Dans les études présentées, la référence utilisée est l'électrode au calomel saturée (ECS) décrite dans le Chapitre 2, dont le potentiel est égal à 0,243 V/ESH lorsque l'électrolyte interne est une solution saturée en KCl.

1.1.2. Potentiel d'électrode mesuré expérimentalement

Le potentiel d'une électrode mesuré expérimentalement $E_{\text{mesuré/REF}}$ est défini comme la différence entre le potentiel électrostatique du matériau d'électrode ϕ_M et le potentiel électrostatique de l'électrode de référence ϕ_{MREF} :

$$E_{\text{mesuré/REF}} = \phi_M - \phi_{MREF} \quad (3.2)$$

L'équation (3.2) peut se développer de cette façon :

$$E_{\text{mesuré/REF}} = (\phi_M - \phi_S) + (\phi_S - \phi_{SREF}) - (\phi_{MREF} - \phi_{SREF}) \quad (3.3)$$

avec ϕ_S le potentiel électrostatique de la solution au contact de l'électrode et ϕ_{SREF} le potentiel électrostatique de la solution au contact du fritté de l'électrode de référence.

Le terme $(\phi_S - \phi_{SREF})$ représente la chute ohmique entre l'électrode étudiée et l'électrode de référence. On reconnaît les termes $(\phi_M - \phi_S)$ et $(\phi_{MREF} - \phi_{SREF})$ qui correspondent respectivement aux potentiels de Nernst de l'électrode étudiée et de l'électrode de référence.

L'équation (3.3) s'écrit alors :

$$E_{\text{mesuré/REF}} = E + \text{Chute ohmique} - E_{REF} \quad (3.4)$$

Si les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode de référence, le terme E_{REF} est égal à zéro. En revanche, si les potentiels étaient exprimés par rapport à l'électrode standard à hydrogène ESH, la correction $E_{REF} = 0.243$ V serait nécessaire.

Par conséquent, l'équation (3.3) devient :

$$E_{\text{mesuré}/REF} = \phi_M - \phi_{SREF} \quad (3.5)$$

Le potentiel de Nernst mesuré expérimentalement est la différence entre le potentiel électrostatique du matériau de l'électrode étudiée ϕ_M et le potentiel électrostatique de la solution au contact du fritté de l'électrode de référence ϕ_{SREF} . Cette digression aura son importance par la suite car, pour comparer le potentiel de Nernst d'une électrode mesuré expérimentalement avec le potentiel calculé par le modèle, il faudra veiller à utiliser l'équation (3.5) dans le calcul numérique.

1.1.3. Tension d'une pile à combustible microbienne

La tension de cellule (U_{cellule} , V) délivrée par une pile à combustible microbienne (PCM) correspond à la différence entre le potentiel électrostatique du matériau de la cathode ϕ_{MC} et le potentiel électrostatique du matériau d'anode ϕ_{MA} :

$$U_{\text{cellule}} = \phi_{MC} - \phi_{MA} \quad (3.6)$$

Si l'on décompose cette équation (3.6), on obtient :

$$U_{\text{cellule}} = (\phi_{MC} - \phi_{SC}) + (\phi_{SC} - \phi_{SA}) - (\phi_{MA} - \phi_{SA}) \quad (3.7)$$

Le terme $(\phi_{SC} - \phi_{SA})$ correspond à la chute ohmique liée à la résistance au transport ionique entre l'anode et la cathode. On retrouve les expressions des potentiels de Nernst de l'anode ($E_A = \phi_{MA} - \phi_{SA}$) et de la cathode ($E_C = \phi_{MC} - \phi_{SC}$).

Ainsi l'équation (3.7) s'écrit :

$$U_{\text{cellule}} = E_C - E_A + \text{Chute ohmique} \quad (3.8)$$

L'écart du potentiel d'une électrode par rapport à sa situation d'équilibre est appelée la surtension η ($i \neq 0$) :

$$\eta = E - E_{eq} \quad (3.9)$$

avec E_{eq} le potentiel à l'équilibre. La surtension est positive pour une anode et négative pour une cathode.

En combinant les équations (3.8) et (3.9), on obtient :

$$U_{\text{cellule}} = E_{eqC} - E_{eqA} + \eta_C - \eta_A + \text{Chute ohmique} \quad (3.10)$$

Le terme ($E_{eqC} - E_{eqA}$) correspond à la tension théorique d'équilibre de la PCM donnée par la thermodynamique, notée U_0 . Les termes de surtension η_C et η_A pour la cathode et l'anode respectivement, incluent chacun :

- La surtension d'activation liée à la cinétique de la réaction électrochimique sur l'électrode.
- La surtension de concentration due au gradient de concentration des espèces redox réactives à la surface de l'électrode.

Finalement, l'expression de la tension de cellule aux bornes d'une PCM devient :

$$U_{cellule} = U_0 + \eta_C - \eta_A + \text{Chute ohmique} \quad (3.11)$$

1.1.4. Calcul des distributions de potentiel et de courant

La variation du potentiel électrostatique ϕ dans un milieu dans lequel aucune charge n'est produite ni consommée est gouvernée par l'équation de Laplace :

$$\Delta\phi = 0 \quad (3.12)$$

Cette équation s'applique dans le volume d'un réacteur électrochimique excepté au niveau des électrodes où des charges sont produites ou consommées. Les électrodes apparaissent donc comme des conditions aux limites du domaine d'intégration. La résolution de cette équation permet d'obtenir la distribution de potentiel, d'où l'on extrait la distribution de courant grâce à la loi d'Ohm :

$$i = -\sigma \text{grad } \phi \quad (3.13)$$

avec σ la conductivité du milieu.

Les systèmes électrochimiques étudiés sont constitués de différents composants, incluant les électrodes, les électrolytes, les séparateurs ou membranes, chacun avec sa propre valeur de conductivité. Dans l'ensemble du travail de thèse, les conducteurs électriques sont supposés parfaitement conducteurs et leur conductivité n'a donc pas d'influence sur les calculs. Les domaines d'intégration sont délimités par deux types de frontières : les électrodes d'une part et les parois non conductrices du réacteur d'autre part. La non conductivité d'un élément du système est exprimée par la condition limite de Neumann :

$$\text{grad } \phi \cdot \vec{n} = 0 \quad (3.14)$$

avec \vec{n} le vecteur normal à la paroi du réacteur.

Pour les électrodes, les conditions aux limites donnent la relation imposée par la cinétique entre le courant, normal à l'électrode, et le potentiel de Nernst local. La cinétique de chaque électrode est déduite des mesures expérimentales, comme détaillé dans la section 2.2 ci-dessous.

1.2. Distributions de potentiel

La distribution de potentiel permet de caractériser le transport des ions au sein d'une cellule électrochimique et constitue donc un excellent support pour optimiser sa géométrie et la disposition des électrodes. Cette approche est très importante pour les PCMs, car les électrolytes de faible conductivité qui sont mis en œuvre donnent au transport ionique un caractère limitant. La distribution de potentiel peut être établie selon trois approches dites primaire, secondaire ou tertiaire.

1.2.1. Distribution primaire

La distribution primaire est l'approche la plus simple établie en considérant que les réactions électrochimiques aux électrodes sont à l'équilibre thermodynamique. Les surtensions d'activation et de concentration sont négligées. La différence de potentiel entre l'électrode et l'électrolyte est donc égale au potentiel d'équilibre E_{eq} , ce qui constitue la condition limite à l'interface électrode/électrolyte :

$$E = E_{eq} \quad (3.15)$$

La distribution primaire de courant permet une résolution souvent aisée des équations et donne donc une première approche intéressante mais toutefois limitée. En effet, elle repose sur un antagonisme de base, puisque la distribution de potentiel est calculée avec des électrodes supposées à l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire lorsqu'aucun courant ne devrait traverser la cellule.

1.2.2. Distribution secondaire

La distribution secondaire de potentiel tient compte de la surtension d'activation, c'est-à-dire des cinétiques des électrodes. Cette distribution ne tient en revanche pas compte des transports de matière en solution. En considérant que la densité de courant j , définie par l'équation (3.13), est un vecteur normal à la surface de l'électrode, les conditions limites sont définies comme ceci :

$$j = -\sigma \text{grad } \phi |_{s} = f(E) \vec{n} \quad (3.16)$$

La relation entre la densité de courant et le potentiel peut être établie en utilisant des lois conventionnelles comme par exemple l'équation de Butler-Volmer, des équations spécifiques développées pour décrire les bioanodes, ou toute autre relation déterminée expérimentalement entre la densité de courant et le potentiel. Ce type de distribution de potentiel est adapté aux réacteurs au sein desquels le transport de matière en solution n'est pas un facteur limitant, comme par exemple les réacteurs opérants à de faibles courants. C'est celle que nous utiliserons dans ce travail de thèse.

1.2.3. Distribution tertiaire

La distribution tertiaire constitue l'approche la plus précise mais elle augmente considérablement la complexité de l'étude. Elle inclut la surtension de concentration en plus de la surtension d'activation. Les conditions limites aux électrodes tiennent compte des valeurs locales de concentrations aux interfaces électrodes/solution. Comme les concentrations locales dépendent des densités de courants

locales et inversement, les champs de potentiel et de concentration doivent être résolus en concomitance. Il est nécessaire d'avoir recours à la distribution tertiaire pour les réacteurs au sein desquels les densités de courant sont élevées, et où le transport de matière, n'arrivant plus à compenser la consommation ou la production des espèces aux électrodes, devient un facteur limitant.

2. Distribution secondaire de potentiel dans une pile à combustible microbienne

L'élément central dans une PCM est le biofilm se développant à la surface de l'anode qui joue le rôle d'électro-catalyseur. Comme énoncé dans le chapitre 1, les microorganismes du biofilm anodique ne tolèrent pas de fortes salinités, ce qui constitue un frein majeur au développement de cette technologie. Les performances délivrées par les PCM sont en partie limitées par la faible conductivité de l'électrolyte, de l'ordre de quelques $S.m^{-1}$.

Pour pallier ce problème, il est possible d'agir sur des paramètres architecturaux, tels que la configuration des électrodes ou la configuration de la cellule expérimentale et surtout la distance inter-électrodes. Dans ce contexte l'approche numérique, qui permet de calculer les distributions de potentiel au sein de la pile sous de multiples configurations, est un outil précieux pour progresser rapidement vers l'architecture de pile optimale avec un nombre minimal d'expérimentations longues et coûteuses. L'approche utilisée ici repose sur la résolution des distributions de potentiel secondaire en utilisant comme conditions limites du modèle les cinétiques électrochimiques mesurées expérimentalement.

2.1. Hypothèses simplificatrices

L'approche numérique ne vise en aucun cas à modéliser la cinétique du biofilm électroactif à la surface de l'anode. Les modélisations réalisées dans le cadre de ce travail de thèse ne donnent aucune information sur le développement microbien ou le transfert d'électrons au sein de la matrice du biofilm, mais elles ont pour objectif d'obtenir une vision globale du système. La stratégie décrite ici propose d'inclure toute la complexité du biofilm dans la cinétique mesurée expérimentalement.

Selon l'équation (3.1), le potentiel de Nernst de l'anode est défini comme la différence entre le potentiel électrostatique du matériau d'électrode ϕ_{MA} et le potentiel électrostatique de la solution à son contact ϕ_{SA} . Dans une PCM, le développement du biofilm à la surface de l'électrode conduit à un gradient de potentiel électrostatique supplémentaire (Figure 11).

Dans le cadre des biofilms électroactifs, le potentiel de Nernst est tacitement supposé correspondre à la différence entre le potentiel électrostatique du matériau ϕ_{MA} et le potentiel au niveau de l'interface biofilm/électrolyte $\phi_{S\text{Biofilm}}$. Nous ferons également cette approximation ici, en rejetant l'interface électrode/solution au niveau de l'interface biofilm/solution. Les valeurs expérimentales de potentiel mesurées par rapport à l'électrode de référence correspondent bien à cette approche pour laquelle le biofilm est considéré comme une couche catalytique faisant partie de l'électrode.

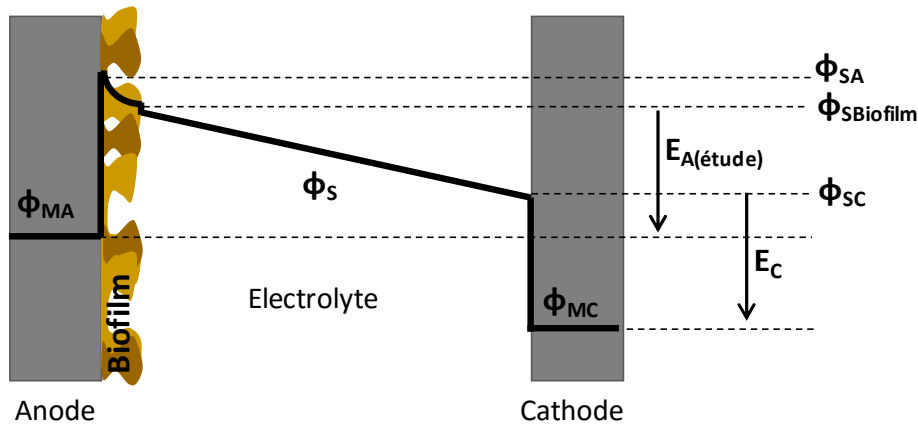


Figure 11. Schéma de la distribution de potentiel dans une PCM. Le potentiel de Nernst à l'interface cathode/électrolyte E_C est donné par la différence entre le potentiel électrostatique du matériau de cathode et le potentiel électrostatique de la solution au contact de l'électrode ($E_C = \phi_{MC} - \phi_{SC}$). Pour la bioanode, le potentiel de Nernst E_A inclut le gradient de potentiel au sein du biofilm en prenant comme frontière l'interface biofilm/électrolyte ($E_A = \phi_{MA} - \phi_{S\text{Biofilm}}$).

La cathode à air est abiotique et pourrait donc paraître plus simple. Il n'en est rien, car sa nécessaire porosité à l'électrolyte implique l'existence de gradients de potentiel internes. Une approche simplifiée sera donc également suivie pour la cathode en utilisant le potentiel de la solution au contact de la surface de la cathode pour calculer le potentiel de Nernst selon l'équation (3.1).

Dans ces travaux de thèse, l'étude de la distribution secondaire de potentiel est choisie pour caractériser les PCM. Cette distribution fait l'hypothèse que le transport de matière en solution n'est pas un facteur limitant, ce qui est justifiable dans le cas d'une PCM. En effet, la cinétique abiotique de la réduction de l'oxygène n'est pas limitée par le réactif qui diffuse au-travers de l'électrode poreuse, mais bien par la cinétique électrochimique en raison de la faible efficacité du catalyseur platine aux valeurs de pH proches de la neutralité. Par ailleurs, il a été évalué dans le cas d'un électrolyseur microbien (Lacroix et coll., 2014) que la concentration en substrat dans l'électrolyte est suffisamment élevée pour que le transport de matière en solution n'affecte pas la cinétique de la bioanode, condition qui peut également s'appliquer dans les PCM.

2.2. Ajustement des cinétiques expérimentales des électrodes

La distribution secondaire de potentiel est calculée en utilisant comme conditions aux limites les cinétiques expérimentales de chaque électrode. D'un point de vue numérique, il s'agit d'introduire dans le modèle n'importe quel type d'équation qui relie la densité de courant j au potentiel d'électrode E/ECS . Il est donc nécessaire de transformer l'ensemble des points expérimentaux donnés par un couple de valeurs (potentiel, j) en une équation utilisable par le modèle numérique.

Pour illustrer les propos, la Figure 12 présente les cinétiques expérimentales d'une bioanode associée à une cathode à air abiotique dans une PCM (marqueurs ronds) ainsi que les courbes obtenues suivant les diverses étapes d'ajustement décrites ci-après.

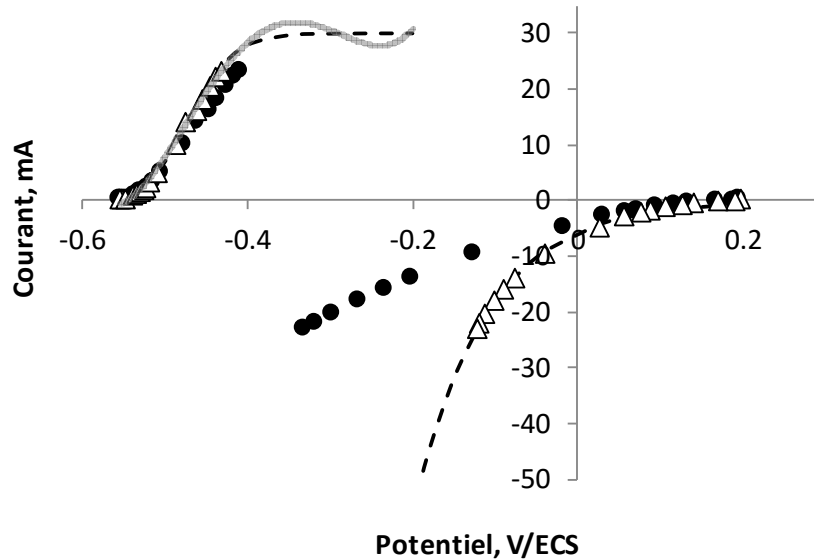


Figure 12. Cinétiques d'une bioanode (50 cm²) associée à une cathode à air (16 cm²). Bioanode : Ronds : points expérimentaux. Triangles : points expérimentaux après correction de la chute ohmique. Ligne continue grise : équation polynômiale de degré 4. Ligne pointillée : équation de Butler-Volmer-Monod avec j_{max} fixé à 30 mA. Cathode : Ronds : points expérimentaux. Triangles : points expérimentaux après correction de la chute ohmique. Ligne pointillée : équation de Butler-Volmer.

2.2.1. Correction de la chute ohmique

La valeur du potentiel d'électrode mesuré expérimentalement englobe un terme de chute ohmique (équation (3.4)). Cette chute ohmique peut être importante d'une part à cause de la faible conductivité de l'électrolyte, d'autre part parce que la disposition de l'électrode de référence n'est pas toujours idéale, c'est-à-dire n'est pas toujours au plus près de l'électrode de travail. Nous avons en effet souvent privilégié le dispositif pour qu'il fonctionne le mieux possible en pile, en n'accordant qu'une priorité secondaire à la place de l'électrode de référence. En outre, les PCMs ne sont équipées que d'une seule électrode de référence, donc nécessairement plus éloignée d'une électrode que de l'autre.

La première étape consiste à corriger la cinétique expérimentale de chaque électrode de la chute ohmique en retranchant à chaque valeur de potentiel E le produit $R_s \cdot i$ (marqueurs triangulaires, Figure 12). Les valeurs des résistances R_s entre la bioanode et la référence et entre la cathode et la référence sont déterminées par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) (méthode décrite dans le Chapitre 2). Les mesures d'impédance ont été systématiquement réalisées pour chaque architecture de réacteur faisant l'objet d'une étude de modélisation (Chapitres 5 et 6). Dans la géométrie du système présenté dans la Figure 12, l'électrode de référence est positionnée plus proche de la bioanode que de la cathode à air. Cette dernière est donc davantage affectée par la chute ohmique, ce qui explique l'effet de la correction nettement plus important pour la cinétique cathodique comparé à la cinétique anodique.

2.2.2. Lissage par des équations (bio)électrochimiques

La seconde étape consiste à lisser les cinétiques expérimentales corrigées de la chute ohmique par des équations afin qu'elles puissent être renseignées dans le modèle numérique. D'un point de vue mathématique, il est tout à fait possible de lisser les courbes par une équation polynomiale.

Toutefois, l'utilisation de polynômes se révèle risquée, car ils sont susceptibles de dévier en dehors de la plage des données expérimentales pour laquelle ils sont déterminés. La Figure 12 permet de visualiser ce phénomène. Le polynôme de degré 4 sélectionné pour lisser la cinétique anodique (ligne continue grise) reproduit parfaitement les valeurs expérimentales mais dévie largement en dehors de cette plage de données. Le modèle pouvant être amené à utiliser l'équation cinétique au-delà de la plage expérimentale, les calculs s'en trouveraient faussés. Idéalement, il faudrait déterminer les cinétiques expérimentales sur une large gamme de valeurs de potentiels mais ceci pose des problèmes techniques. En effet, les cinétiques des électrodes sont pour la plupart déterminées lors du traçage des courbes de puissance, et les plages opératoires ne vont pas au-delà de la mise en court-circuit de la pile. Pour élargir les plages de potentiel, il serait nécessaire d'utiliser un montage à trois électrodes et d'introduire une électrode auxiliaire dans la pile. Seulement, utiliser la bioanode comme électrode auxiliaire pour déterminer la cinétique cathodique par exemple, pourrait la pousser très loin de sa « zone de confort » et la détériorer. C'est la raison pour laquelle les cinétiques ne sont déterminées qu'en utilisant le montage mis en place lors du fonctionnement en pile.

Vu le risque de biais induit par l'utilisation d'équations mathématiques sans fondement physique, il a été choisi de lisser les courbes intensité-potentiel de chaque électrode avec des équations (bio)électrochimiques dont les comportements sont clairement définis.

L'équation de Butler-Volmer est systématiquement utilisée pour caractériser la cinétique de la cathode à air abiotique :

$$j = -j_0 \exp \left[\frac{-\alpha n_e F}{RT} \eta \right] \quad (3.17)$$

avec j_0 (A.m⁻²) la densité de courant d'échange, α le coefficient de transfert, $n_e = 4$ le nombre d'électrons consommés par molécule d'oxygène réduit, $F = 96\,485$ C.mol⁻¹ la constante de Faraday, $R = 8.314$ J.mol⁻¹.K⁻¹ la constante des gaz parfaits, T (K) la température, et η (V) la surtension (équation (3.9)).

La cinétique de l'anode microbienne peut être lissée par deux types d'équations. La plus simple est l'équation de Nernst-Michaelis (Kato Marcus et coll., 2007; Torres et coll., 2008) :

$$j = j_{max} \frac{1}{1 + \exp \left[-\frac{n_e F}{RT} (E - E_{KA}) \right]} \quad (3.18)$$

avec j_{max} (A.m⁻²) la densité de courant maximale atteinte par la bioanode, n_e le nombre d'électrons (8 par molécule d'acétate) et E_{KA} le potentiel atteint pour j correspondant à la moitié de j_{max} .

Cette équation est préférentiellement choisie lorsque le transfert électronique entre l'électrode et le biofilm n'est pas l'étape limitante de la cinétique. Dans le cas contraire, l'équation de Butler-Volmer-Monod est plus appropriée (Hamelers et coll., 2011).

Plus complète, cette équation a été établie en introduisant une cinétique de Butler-Volmer pour le transfert électronique à l'interface électrode/biofilm et des cinétiques enzymatiques au sein du biofilm:

$$j = j_{max} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right)}{K_1 \exp\left(-\frac{(1-\alpha)n_e F}{RT} \eta\right) + K_2 \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right) \quad (3.19)$$

avec K_1 et K_2 des paramètres en relation avec la vitesse métabolique, K_M (mol.L⁻¹) la constante d'affinité du substrat et S (mol.L⁻¹) la concentration en substrat.

C'est cette seconde équation qui est utilisée pour lisser la cinétique anodique sur la Figure 12 (ligne pointillée). En comparaison du polynôme de degré 4 décrit précédemment, on constate que cette équation théorique ne dérive pas et atteint un plateau limite égal à $j_{max} = 30$ mA en dehors des plages de données expérimentales.

2.2.3. Ajustement des paramètres

Pour chaque électrode, les points expérimentaux sont lissés par l'équation cinétique choisie en ajustant les paramètres de l'équation par la méthode des moindres carrés. Il faut noter que les valeurs de ces paramètres sont déterminées en amont de l'étude numérique et ne sont en aucun cas ajustées pendant la phase de modélisation. Le Tableau 5 rassemble les paramètres ajustables pour chaque équation.

Tableau 5. Liste des paramètres ajustables pour les équations caractérisant la cathode et l'anode microbienne.

Cathode Butler-Volmer	Bioanode	
	Nernst-Michaelis	Butler-Volmer-Monod
j_0 (A.m ⁻²) α	j_{max} (A.m ⁻²) E_{KA} (V/ECS)	j_{max} (A.m ⁻²) α K_1 K_2 K_M (mol.L ⁻¹)

2.3. Distributions de courant et de potentiel

L'équation de Laplace et la loi d'Ohm décrites dans la première partie de ce chapitre sont résolues numériquement avec le logiciel « Comsol Multiphysics » (version 5) équipé du module « Electrochimie ».

Dans un premier temps, la géométrie du montage expérimental est introduite dans le logiciel. Les électrodes, l'électrolyte et le séparateur (si présent) sont différenciés des parois du réacteur. La conductivité de chaque élément du système est renseignée dans les paramètres fixes. Il est supposé que les matériaux des électrodes et des collecteurs de courant sont suffisamment conducteurs pour que le potentiel électrostatique des matériaux soit considéré uniforme. Leur conductivité est donc fixée arbitrairement à 1×10^7 S.m⁻¹, valeur suffisamment élevée pour ne pas avoir d'influence. On

suppose également que l'assemblage entre les collecteurs de courant et les électrodes n'introduit aucune résistance.

A chaque interface bioanode/électrolyte et cathode/électrolyte du domaine, les cinétiques respectives, mises en équation selon la procédure décrite dans la partie précédente, sont renseignées dans le modèle comme conditions aux limites. Le maillage du domaine d'intégration, réalisé automatiquement par le logiciel, est composé d'éléments de géométrie triangulaire. Il a été vérifié sur quelques cas que le maillage choisi automatiquement par le logiciel était correct en imposant un maillage plus fin et en vérifiant que les résultats restaient identiques. Toutes les études réalisées dans le cadre de la thèse sont en régime stationnaire.

Dans chaque étude, la valeur du potentiel électrostatique de la cathode ϕ_{MC} est arbitrairement choisie comme la base des calculs et est prise égale à 0. Cette condition, appliquée à l'équation (3.6) qui donne la tension de cellule et les expressions des potentiels de Nernst de la bioanode et la cathode (équation (3.1)), conduit à :

$$U_{\text{cellule}} = -\phi_{MA} \quad (3.20)$$

$$E_A = U_{\text{cellule}} - \phi_{SA} \quad (3.21)$$

$$E_C = -\phi_{SC} \quad (3.22)$$

Le modèle est exécuté en faisant varier la tension de cellule U_{cellule} de 0 à 1.5 V par pas de 0.1 V. Il est possible de faire varier plusieurs paramètres en parallèle (tension de cellule et conductivité de l'électrolyte par exemple) en faisant appel à la fonction « Analyse paramétrique » pour étudier l'effet de combinaisons de paramètres.

Le courant total délivré par le système est ensuite obtenu en intégrant le courant local soit sur la surface de l'anode soit sur la surface de la cathode. Pour calculer la densité de courant délivrée par l'anode, il est important de prendre en compte la surface totale de l'électrode immergée dans l'électrolyte, incluant les faces mais également les bords. Ces derniers ont en effet une contribution non négligeable sur le courant délivré y compris si l'électrode n'est épaisse que de quelques millimètres. En revanche, cette réflexion n'a pas lieu d'être dans le cas de la cathode à air qui n'expose qu'une seule face à l'électrolyte.

Il est possible d'obtenir une valeur de potentiel en un point précis de la géométrie. Cette option est par exemple utile pour connaître le potentiel électrostatique de la solution au niveau d'un point placé dans l'électrolyte assimilé au fritté de l'électrode de référence. L'équation (3.5) ($E_{\text{mesuré}} = \phi_M - \phi_{SREF}$) permet de calculer le potentiel d'une électrode mesuré expérimentalement, et de comparer ainsi les cinétiques obtenues par le modèle aux cinétiques expérimentales non corrigées de la chute ohmique.

Les distributions de potentiel au sein de l'électrolyte sont représentées par un gradient de couleur qui peut être affiché dans toutes les directions de l'espace d'intégration, pour n'importe quelle valeur de paramètre imposée au système (par exemple $U_{\text{cellule}} = 0.4$ V, Figure 13). Les distributions de courant sont tracées sous forme de lignes.

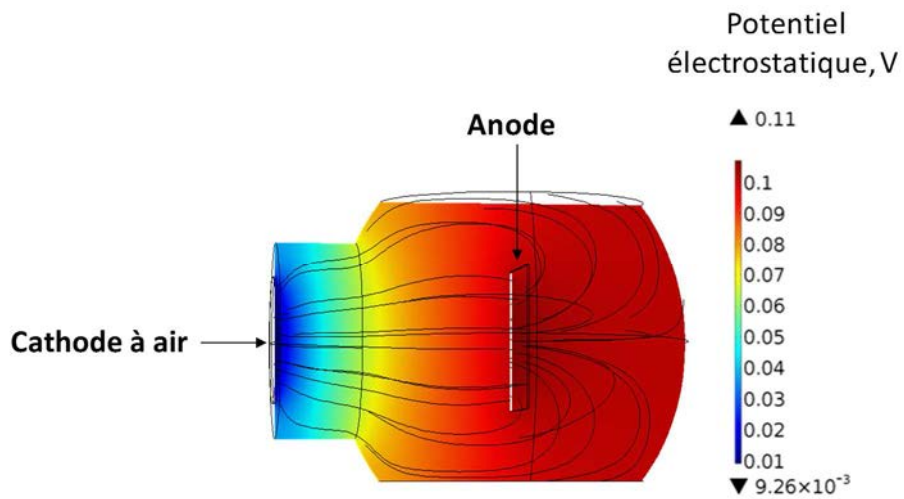


Figure 13. Distributions de potentiel et de courant dans l'électrolyte d'une PCM dans le réacteur « PCM avec cathode à air amovible » (Chapitre 5) à une tension de cellule $U_{\text{cellule}} = 0.4$ V. La légende des couleurs donne les valeurs du potentiel électrostatique et les lignes noires représentent les lignes de courant.

CHAPITRE 4 : Optimisation des électrodes d'une pile à combustible microbienne

1. Cathode à air	113
1.1. Tentatives d'amélioration des performances de la cathode à air	113
1.2. Le biofouling : une limitation importante pour les cathodes à air	117
2. Anode microbienne	118
2.1. Tests préliminaires : Modification de l'inoculum « lixiviat de terreau ».....	118
2.1.1. Acclimater les microorganismes du terreau à des milieux alcalins.....	118
2.1.2. Rendre le lixiviat de terreau « propre » pour retarder le (bio)fouling de la cathode à air	119
2.2. Former une bioanode à haute température pour un fonctionnement à température ambiante (Publication 1).....	121
2.3. Procédure optimale de formation d'une bioanode.....	140
2.3.1. Volet n°1 : Du lixiviat de terreau au milieu synthétique	140
2.3.2. Volet n°2 : De la bioanode primaire à la bioanode secondaire.....	149
2.4. Effet du mode d'alimentation en substrat	158
2.5. Première tentative d'extrapolation des bioanodes (Publication 2).....	159
3. Conclusions du Chapitre 4	178

Comme explicité dans le chapitre 1, la compréhension du fonctionnement d'une pile à combustible microbienne (PCM) dans son intégralité est un point clé pour construire une stratégie d'optimisation de chaque électrode. Le projet Bioelec s'inscrit dans une telle démarche, anticiper le fonctionnement global de la pile pour concevoir une bioanode et une cathode capables de fonctionner ensemble de façon optimale. Le prototype de PCM ne sera pas conçu comme la juxtaposition d'une bioanode et d'une cathode développées indépendamment mais, au contraire, l'analyse du fonctionnement de la PCM dans sa globalité conditionnera la conception de chaque électrode. Cette démarche, encore très peu fréquente dans la bibliographie, représente un réel challenge.

Ce chapitre est organisé en deux parties. La première reporte l'étude de différents paramètres susceptibles d'influencer les performances de la cathode à air. Cette étude est en menée en collaboration étroite avec le partenaire PaxiTech qui conçoit les cathodes, en particulier pour tester les cathodes issues de la mise en place d'une ligne de fabrication automatisée.

La seconde partie déploie une stratégie d'optimisation de la bioanode organisée en cinq rubriques. Tout d'abord l'analyse des contraintes de fonctionnement de la cathode à air a amené à tenter diverses modifications des conditions de fonctionnement de la bioanode. Ensuite, la procédure de formation de la bioanode est optimisée en déterminant un programme de température, en comparant diverses méthodes d'inoculation et de repiquage, et en améliorant le mode d'alimentation en substrat. Enfin, une première tentative d'extrapolation de la bioanode met en lumière des difficultés insoupçonnées liées au changement d'échelle et propres à la nature microbienne de l'anode.

1. Cathode à air

Comme indiqué dans le chapitre 1, la cathode doit travailler au contact d'un milieu dont le pH est proche de la neutralité. C'est, hélas, une contrainte forte pour la cathode dont nous n'avons pas pu nous affranchir en développant des bioanodes capables de fonctionner à des pH bas. Il existe très peu d'exemples d'anodes microbiennes acidophiles dans la bibliographie.

Le catalyseur platine qui est le plus souvent utilisé, sans doute par similitude avec la technologie des piles à combustible conventionnelles à hydrogène, perd une grande partie de son efficacité aux valeurs de pH voisines de 7. De nombreux autres catalyseurs ont été testés dans la bibliographie sans offrir de succès retentissants. La faible efficacité des cathodes à air à des pH proches de la neutralité constitue donc un verrou majeur de la technologie PCM.

1.1. Tentatives d'amélioration des performances de la cathode à air

La cathode à air utilisée dans le projet Bioelec est développée par PaxiTech. Elle est constituée d'une couche active, mélange du catalyseur platine et d'un liant hydrophobe (PTFE), déposée sur un tissu de carbone qui assure la diffusion uniforme de l'oxygène vers le catalyseur. Les compositions standard de la couche active sont 0.5 mg.cm^{-2} en platine et 10% de PTFE.

Dans le but de déterminer les conditions optimales de fonctionnement, l'influence de plusieurs paramètres est étudiée. Les cathodes à air sont testées suivant un protocole toujours identique, avec un montage à 3 électrodes, en exposant une face à l'air et l'autre face à l'électrolyte. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Conditions expérimentales des essais réalisés sur la cathode à air PaxiTech.

Montage expérimental			
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS			
Réacteurs : « PCM avec cathode à air amovible » et « Cube »			
Electrode de travail : Cathode à air PaxiTech, $S_{\text{cathode}} = 15.9 \text{ cm}^2$, Pt 0.5 mg.cm^{-2} , PTFE 10%, sauf indication contraire			
Paramètres expérimentaux			
Electrolyte : KCl 100 mM, sauf indication contraire		Température : ambiante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), sauf indication contraire	
Technique électrochimique			
Voltammétrie cyclique :	1 mV.s^{-1}	3 cycles successifs	OCP $\rightarrow -0.5 \text{ V/ECS}$

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 7 et commenté ligne par ligne ci-dessous. Par souci de simplification, les cathodes sont comparées en relevant la densité de courant produite à -0.2 V/ECS , valeur caractéristique de la plage de fonctionnement des cathodes dans les PCMs. Toutes les cathodes donnent des caractéristiques intensité-potential similaires, comme celles illustrées sur la Figure 14.

Tableau 7. Influence des paramètres sur les performances de la cathode à air PaxiTech. Les valeurs des densités de courant indiquées sont celles relevées pour un potentiel de -0.2 V/ECS .

Paramètres	Valeurs	Résultats	Nombre d'expériences
Intrinsèques			
% en PTFE	20 % 40 % 60 %	Pas d'influence, mais tenue mécanique de la couche active améliorée à % croissant	CVs tripliquées au jour 0 et après 1 semaine
Nature du catalyseur	Pt 0.5 mg.cm^{-2} Fe/Co 0.21 mg.cm^{-2} Pas de catalyseur	-2.4 A.m^{-2} -3 A.m^{-2} -0.5 A.m^{-2}	4 CVs
Extrinsèques			
pH	7 9 11	Pas d'influence	6 CVs par valeur de pH
Temps de contact avec l'électrolyte	0 1 semaine	Pas d'influence	3 réacteurs, 6 CVs par réacteur
Conductivité de l'électrolyte (concentration de KCl)	25 mM 100 mM 300 mM	-2.6 A.m^{-2} -4.6 A.m^{-2} -7.4 A.m^{-2}	3 CVs par valeur de concentration
Température	4°C 20°C 40°C	-5.2 A.m^{-2} -7.5 A.m^{-2} -9.5 A.m^{-2}	6 CVs par valeur de température
Assemblage cathode-collecteur (40°C)	Silicone Joint torique	-6.7 A.m^{-2} -14 A.m^{-2}	> 10 CVs

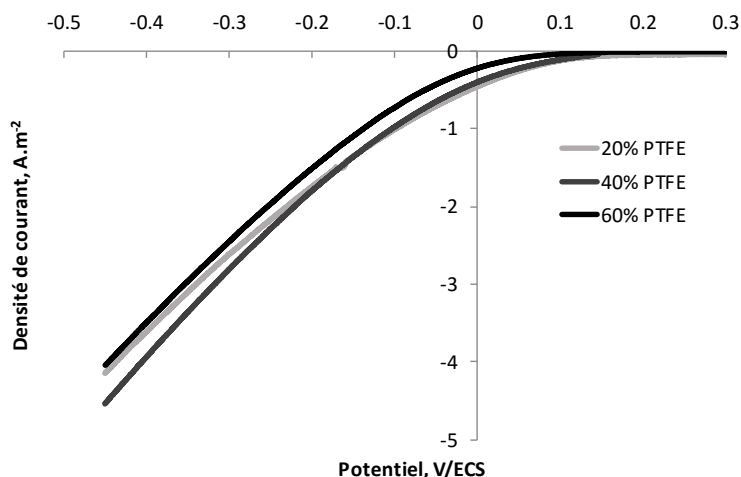


Figure 14. Voltammétries cycliques de cathodes à air avec différentes quantités de PTFE en milieu KCl 100 mM à pH 9 à 20°C dans la configuration « PCM avec cathode à air amovible ».

Le PTFE utilisé dans la couche active est un liant hydrophobe qui assure l'étanchéité de la cathode. Une trop faible quantité n'assurerait pas une étanchéité suffisante et au contraire, une trop grande quantité gênerait l'arrivée de l'eau jusqu'au catalyseur. Étonnamment, les quantités de PTFE de 20, 40 ou 60% n'ont aucun effet sur les performances électrochimiques des cathodes. En revanche, l'augmentation du pourcentage de PTFE permet d'améliorer la tenue mécanique de la couche active. Ce problème est traité au paragraphe suivant 2.2.

Que le catalyseur soit du platine (Pt) ou du fer/cobalt (Fe/Co), les performances des cathodes restent similaires. Le catalyseur a bien un rôle puisque les cathodes de contrôle sans aucun catalyseur ne donnent que de très faibles densités de courant. On peut donc conclure que les concentrations de catalyseur utilisées sont suffisantes pour que ce paramètre ne soit pas limitant. Une étude systématique permettrait sans doute de réduire la quantité de catalyseur sans modifier les performances initiales des cathodes. Toutefois, il est à craindre que les performances décroissent au cours du fonctionnement de la PCM et un excès de catalyseur peut alors assurer une meilleure durée de vie. Optimiser la quantité de catalyseur supposerait de réaliser les études en les couplant au vieillissement des cathodes en opération. A ce stade, il est simplement choisi de continuer avec les concentrations standard de platine et de PTFE.

Des expériences préliminaires réalisées lors du projet antérieur AgriElec avaient montrées que les performances de la cathode à air PaxiTech augmentaient à pH 10. Ces expériences avaient été réalisées dans une pile abiotique mettant en jeu H₂ comme combustible à l'anode avec un électrolyte composé KCl 100 mM. Afin de vérifier ce résultat, les expériences sont répétées ici, mais dans un montage électrochimique à 3 électrodes comme décrit dans le Tableau 6. Dans cette configuration, les résultats antérieurs ne sont pas retrouvés et aucune influence significative du pH n'est observée sur les voltammétries, y compris à pH 11. Dans les expériences antérieures menées avec un montage expérimental de type pile, le potentiel de la cathode n'était pas contrôlé par rapport à une électrode de référence, et les performances de l'ensemble dépendaient à la fois de la cathode et de l'anode. La réaction d'oxydation de l'hydrogène étant favorisée à des pH élevés, on peut craindre que l'amélioration des performances observée antérieurement ne soit pas directement attribuable à l'amélioration des performances de la cathode à air.

L'influence du temps de contact entre la cathode et l'électrolyte est également étudiée. L'hypothèse était que la pénétration progressive de l'électrolyte au sein de la couche catalytique pourrait améliorer la qualité du contact entre oxygène, eau et catalyseur. Toutefois, aucune évolution entre la voltammétrie initiale et la voltammétrie mesurée après une semaine de contact avec l'électrolyte n'est observée. La cathode est donc totalement efficace dès sa mise en contact avec l'électrolyte.

Augmenter la conductivité de l'électrolyte permet d'améliorer significativement les performances de la cathode à air. Cet effet est très prononcé puisque le passage d'une concentration de KCl de 25 mM à 300 mM, soit une conductivité de 0.3 à 3.5 S.m⁻¹, augmente la densité de courant enregistrée à -0.2 V/ECS de 2.6 à 7.4 A.m⁻². Cette évolution décèle une configuration inappropriée du système expérimental car un montage à trois électrodes est destiné à s'affranchir de l'effet de la conductivité. Que ce soit dans le réacteur dit « PCM avec cathode à air amovible » ou « Cube », l'électrode de référence est éloignée de plusieurs centimètres de la cathode. La chute ohmique entre électrode de référence et électrode de travail est donc non négligeable. De plus, la cathode est un disque de 4.5 cm de diamètre. Ce format de cathode, utilisé pour l'ensemble des réacteurs mis en œuvre dans cette thèse, est sans doute trop grand pour assurer une bonne configuration de cellule d'électroanalyse. Toutefois, le paramètre conductivité de la solution est fortement contraint par les conditions de fonctionnement de la bioanode. Il a été montré dans d'une thèse réalisée au laboratoire (D. Pocaznoi, 2012) que les microorganismes présents dans le terreau ne peuvent supporter une concentration de KCl supérieure à 60 mM. Au-delà, la force ionique trop élevée fait chuter le courant délivré par les bioanodes. Dans la suite de ce travail de thèse, il est donc choisi de travailler à la concentration de KCl de 60 mM, c'est-à-dire la concentration maximale admissible par la bioanode.

Augmenter la température de 20 à 40 °C fait croître la densité de courant de réduction de l'oxygène de 27%. En revanche, assurer une telle température pour la PCM ne la rendrait pas autonome, et exigerait sans doute plus d'énergie que la pile ne peut en produire, ce qui n'est pas en accord avec les attentes du cahier des charges rédigé dans le projet Bioelec.

A l'issue de cette analyse expérimentale, des diverses voies d'amélioration des performances de la cathode à air n'est restée comme possibilité que l'optimisation de l'assemblage cathode-collecteur de courant. Le collecteur de courant est une grille en acier inoxydable de même dimension que la cathode. Il était jusqu'à présent collé contre la cathode par le biais d'un joint silicone périphérique, qui assurait également l'étanchéité du système. L'assemblage cathode-collecteur repose sur une couronne en PVC qui se visse sur le réacteur (Figure 15.A). Les tests montrent que ce système ne permet pas un plaquage optimal entre cathode et collecteur. En revanche, presser la cathode et le collecteur mécaniquement grâce à un système de vissage d'une couronne latérale avec un joint torique pour assurer l'étanchéité (Figure 15.B) a permis un contact plus uniforme entre les deux éléments, donc une meilleure connexion électrique, qui se traduit par de meilleures performances sur les voltammétries (Figure 15.C).

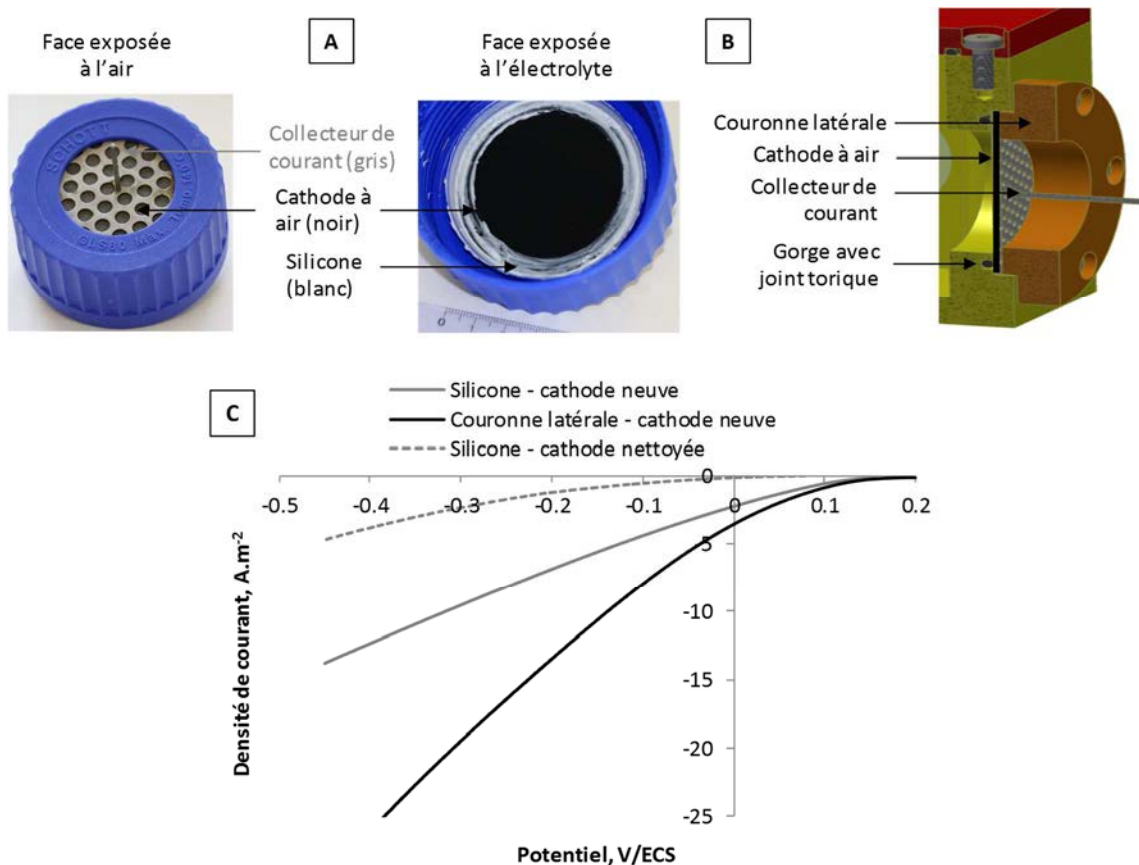


Figure 15. Fixation de la cathode à air contre le collecteur de courant par le biais (A) de silicone, (B) d'une couronne latérale. (C) Voltammétries cycliques d'une cathode à air en milieu synthétique propre à 40°C dans les deux configurations présentées en (A) et (B).

1.2. Le biofouling : une limitation importante pour les cathodes à air

Dans une configuration de PCM sans séparateur entre la bioanode et la cathode à air, la face de la cathode exposée à l'électrolyte est sujette à un fouling et/ou biofouling parfois rapide et souvent important. Ce phénomène, provoqué par le dépôt à la surface de l'électrode de matières organiques et de microorganismes contenus dans l'anolyte, peut engendrer des pertes considérables de performances (comme décrit dans le Chapitre 1 Bibliographie).

Le seul moyen de lutte contre le biofouling envisagé dans le cadre du projet Bioelec a été de tenter de nettoyer la surface de la cathode. Dans des conditions identiques (milieu synthétique, 40°C), une voltammétrie cyclique réalisée après nettoyage à l'eau distillée d'une cathode à air encrassée au contact de lixiviat de terreau (Figure 15.C, ligne grise pointillée) montre clairement la chute des performances par comparaison avec une cathode neuve (Figure 15.C, ligne grise pleine). En fait, on observe que le nettoyage même léger avec un jet d'eau distillée effectué à l'aide d'une pissette suffit pour détacher la couche active de l'électrode qui perd alors une quantité importante de catalyseur.

Dans le cadre du projet Bioelec, le partenaire Paxitech est passé d'une fabrication artisanale des cathodes à air à une fabrication automatisée en ligne. Cette évolution a permis d'assurer une bonne reproductibilité des caractéristiques des cathodes mais au prix d'une altération de leur tenue mécanique. La couche active a tendance à se déliter facilement au contact d'un liquide et elle ne résiste pas à un nettoyage, même léger. PaxiTech a réalisé de nombreux tests afin d'accroître l'adhésion de la

couche active au support. Ces expériences ont permis au catalyseur de ne plus se déliter aussi facilement en solution, mais un nettoyage de la surface pour une éventuelle réutilisation de la cathode n'est toutefois pas encore envisageable.

L'encrassement de la cathode exposée à l'électrolyte est un problème crucial qu'il n'est pour l'instant pas possible de corriger en nettoyant la cathode. Il faut donc tenter de concevoir la bioanode dans un électrolyte qui soit le plus « propre » possible, c'est-à-dire contenant le moins possible de matière organique, afin de retarder au maximum l'encrassement de la cathode. C'est un objectif majeur qui a guidé la plupart des travaux exposés dans la suite pour mettre au point le protocole de formation de la bioanode.

2. Anode microbienne

2.1. Tests préliminaires : Modification de l'inoculum « lixiviat de terreau »

2.1.1. Acclimater les microorganismes du terreau à des milieux alcalins

Les tests réalisés lors du projet antérieur Agrielec sur la cathode à air PaxiTech avaient révélé une forte augmentation de leurs performances à pH 10. Ces résultats nous ont incité à tenter une acclimatation des microorganismes du terreau à des pH élevés, dans l'optique de former une bioanode dans des conditions favorables à la cathode à air.

Le pH du lixiviat de terreau, initialement situé entre 7 et 8, est ajusté aux valeurs 10, 11 et 12 par ajouts réguliers de quelques gouttes d'une solution NaOH 2 M. Six réacteurs fermés sont placés dans un incubateur à 40°C sous légère agitation. Une fois le pH stabilisé aux valeurs souhaitées, un montage à 3 électrodes est mis en place (Tableau 8, dispositif décrit au Chapitre 2).

Tableau 8. Conditions expérimentales pour l'acclimatation des microorganismes du terreau à des pH élevés.

Montage expérimental			
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS			
Réacteur : « Standard simple compartiment »			
6 bioanodes formées : 2 par valeur de pH			
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 1 \text{ cm}^2$			
Paramètres expérimentaux			
Inoculum :	Température :	pH :	Substrat :
Lixiviat de terreau	40°C	10, 11 ou 12	Acétate 40 mM
Technique électrochimique			
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$			

Après 10 jours de polarisation, les densités de courant obtenues au cours de la chronoampérométrie ne dépassent pas les 5 A.m⁻² pour les six réacteurs étudiés (courbes non présentées). Pour comparaison, des bioanodes formées dans du lixiviat de terreau dont le pH n'est pas modifié sont capables de délivrer des densités de courant pouvant atteindre jusqu'à 25 A.m⁻². Les bioanodes semblent donc peu enclines à s'adapter à des pH supérieurs à 9.

En parallèle, les résultats obtenus lors de l'analyse de la cathode à air, exposés ci-dessus, n'ont pas confirmé les résultats antérieurs et ne montrent aucune amélioration des performances de la cathode à des pH de 9 à 11 (partie 1.1 de ce chapitre). Vu que l'amélioration de la cathode à pH élevé n'est pas

confirmée et que les tentatives d'acclimatation de la bioanode à des milieux alcalins ont échoué, cette méthode est abandonnée sans regret.

2.1.2. Rendre le lixiviat de terreau « propre » pour retarder le (bio)fouling de la cathode à air

Retarder le (bio)fouling de la cathode est un objectif majeur. Le moyen le plus immédiat consisterait à appauvrir le lixiviat de terreau utilisé pour former les bioanodes. Ce lixiviat est obtenu en filtrant un mélange de terreau et d'une solution de KCl 60 mM à l'aide d'une serpillère. Cette méthode grossière produit un inoculum certes liquide comparé au terreau de jardin initial, mais qui reste toutefois extrêmement riche en matière organique (Figure 16, gauche). L'encrassement de la cathode à air au contact de ce lixiviat de terreau est rapide.



Figure 16. Inocula obtenus par diverses méthodes de filtration. De gauche à droite : terreau filtré à la serpillère, terreau filtré sur filtre plastique, surnageant.

Diverses méthodes de filtration du mélange terreau/eau sont testées afin de rendre l'inoculum de terreau le plus « propre » possible, tout en conservant des performances identiques au lixiviat. La serpillère utilisée traditionnellement au sein de l'équipe depuis plusieurs années est prise pour référence et comparée à :

- La filtration par un filtre plastique (filtre permanent à café vendu dans le commerce, 0.1 mm de diamètre de pores).
- La récupération du surnageant après décantation du mélange terreau/eau/KCl pendant une nuit.
- La récupération du surnageant suivie de la filtration sur papier filtre.

Ces inocula sont testés dans des conditions identiques récapitulées dans le Tableau 9 (dispositif décrit au Chapitre 2). Les bioanodes sont formées pendant 35 à 40 jours sous polarisation avec 2 batchs successifs d'acétate.

Les chronoampérogrammes représentant la densité de courant en fonction du temps sont tracés sur la Figure 17. Les densités de courant maximales atteintes lors de la chronoampérométrie sont relevées dans le Tableau 10.

Tableau 9. Conditions expérimentales des essais réalisés dans le but de rendre l'inoculum lixiviat de terreau « propre ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS		
Réacteur : « Standard simple compartiment »		
8 bioanodes formées : 2 par méthode de filtration		
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 2 \text{ cm}^2$		
Paramètres expérimentaux		
Inocula :	Température : 40°C	Substrat : 2 batchs d'acétate 65 mM
- Terreau filtré à la serpillère		
- Terreau filtré sur filtre plastique		
- Surnageant		
- Surnageant passé sur papier filtre		
Technique électrochimique		
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$		

Pour chaque ajout d'acétate (indiqués par des flèches), le courant croît jusqu'à atteindre un maximum. Lorsque l'acétate devient limitant, le courant retombe vers zéro et une nouvelle dose de substrat est alors ajoutée pour rétablir le courant. Au fur et à mesure des batchs, les densités de courant atteintes sont de plus en plus importantes. Cette progression traduit la formation du biofilm électroactif à la surface de l'électrode. L'allure classique d'un chronoampérogramme obtenu au cours de la formation d'un biofilm dans du lixiviat de terreau correspond à celle des bioanodes Serpillère et Filtre plastique (courbes marron et verte, Figure 17). Les chronoampérogrammes des bioanodes formées dans le Surnageant et le Surnageant passé au papier filtre présentent en revanche des allures singulières, avec un courant qui reste constant après le premier ajout d'acétate pendant une dizaine de jours voire plus.

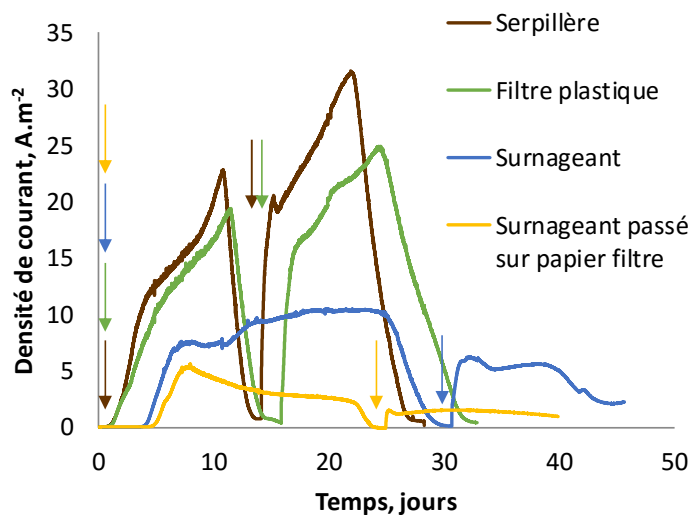


Figure 17. Chronoampérogrammes des bioanodes formées dans différents inocula issus du lixiviat de terreau.

Tableau 10. Performances des bioanodes formées dans différents inocula à partir de terreau.

	Serpillère	Filtre plastique	Surnageant	Surnageant passé sur papier filtre
$I_{max} \text{ (A.m}^{-2}\text{)}$	31.5	30	19.2	0.2
	30	24.7	10.4	5.3
Temps de formation du premier pic	20 h	1 jour	3 jours	4 à 6 jours

Les plus fortes densités de courant ($30.8 \pm 0.8 \text{ A.m}^{-2}$) sont obtenues avec le lixiviat le plus riche, c'est-à-dire celui obtenu par une filtration rustique à la serpillière. Le lixiviat obtenu avec le filtre plastique assure des performances proches du maximum ($27.4 \pm 2.7 \text{ A.m}^{-2}$). Cette méthode de filtration ne permet cependant d'extraire que les résidus de moyenne et grande tailles, et l'inoculum final reste tout aussi riche que le terreau filtré à la serpillière ce qui ne répond pas à la problématique initiale (Figure 16, centre).

Récupérer le surnageant après décantation du mélange terreau/eau permet d'obtenir un inoculum considérablement plus propre (Figure 16, droite), cependant les performances atteintes sont moindres et peu reproductibles. Enfin, le surnageant passé sur papier filtre donne les densités de courant les plus faibles avec seulement $2.8 \pm 2.6 \text{ A.m}^{-2}$. Par ailleurs, plus l'inoculum est appauvri, plus le temps de formation du premier pic d'oxydation est long, jusqu'à 6 jours dans cas du surnageant filtré.

En conclusion, les essais effectués pour rendre le lixiviat de terreau le plus propre possible ne sont pas convaincants et ne permettent pas de former des bioanodes performantes et reproductibles. Ces tentatives infructueuses indiquent qu'il est indispensable de conserver comme inoculum le lixiviat de terreau filtré avec la traditionnelle serpillière.

Ces premiers essais ne permettent pas de progresser vers un milieu plus propre. Une nouvelle stratégie est alors envisagée, divisée en deux étapes. La première étape consiste à former la bioanode comme précédemment dans le lixiviat de terreau, et la seconde étape à remplacer le lixiviat par un milieu de culture synthétique. Ce milieu doit fournir aux microorganismes du biofilm un environnement de croissance optimal, mais il doit être exempt de matières organiques et d'accepteurs d'électrons afin de limiter le développement de microorganismes non-électroactifs. En l'absence de matière organique et d'accepteur d'électrons autre que l'électrode, on espère éliminer le développement de microorganismes planctoniques et ainsi limiter l'encrassement de la cathode.

La procédure consiste dans un premier temps à former une bioanode performante dans le lixiviat de terreau en utilisant un montage à 3 électrodes, c'est-à-dire sans contact avec la cathode à air. Puis, la bioanode est transférée en milieu synthétique avant d'être utilisée en fonctionnement pile en association avec une cathode à air.

2.2. Former une bioanode à haute température pour un fonctionnement à température ambiante (Publication 1)

La formation d'un biofilm électroactif efficace sur une électrode peut demander plusieurs jours voire plusieurs semaines. Ce temps de formation est long pour le doctorant qui souhaite obtenir un ensemble cohérent de données expérimentales dûment reproduites, ou pour l'ingénieur qui met en œuvre un démonstrateur ou, à plus long terme, exploitera une PCM industrielle.

Il est établi que la température joue un rôle fondamental dans le métabolisme et les cinétiques de croissance des microorganismes et est donc un paramètre essentiel dans la formation de la bioanode. De nombreuses études ont porté sur l'influence de la température sur le fonctionnement des PCM. Il a souvent été constaté qu'augmenter la température permettait d'augmenter les puissances délivrées par une PCM (L. H. Li et coll., 2013; H. Liu et coll., 2005; Min et coll., 2008). En revanche, une température trop élevée, supérieure à 50°C , inactive le métabolisme microbien des microorganismes mésophiles et provoque la chute des performances (L. H. Li et coll., 2013; Y. Liu et coll., 2011). Il est

généralement admis que la gamme des températures optimales est de l'ordre de 30 à 45°C (Y. Liu et coll., 2011).

Il serait donc très tentant de former les bioanodes à 40°C et d'opérer la PCM à la même température afin de diminuer le temps de formation de la bioanode et de maximiser la puissance produite par la pile. Académiquement, nous ne nous en priverons pas, car vu le stade encore très amont de la technologie PCM, il est important de tenter de hausser les performances au plus haut niveau possible, au moins au titre de démonstration. Toutefois, de tels démonstrateurs demeurent des outils de laboratoire car l'énergie nécessaire pour maintenir la température du système est supérieure à celle produite par la pile. Le projet Bioelec est un projet délibérément tourné vers la conception d'un démonstrateur « pratique », c'est-à-dire qui puisse fonctionner de façon autonome, sans avoir à être chauffé. La présence d'un industriel parmi les partenaires nous a aidé à garder fermement ce cap.

Un moyen de concilier l'ambition de réduire le temps de formation des bioanodes avec l'objectif imposé d'un démonstrateur autonome serait de former les bioanodes à 40°C, puis de les utiliser à température ambiante dans la PCM. Pour que cette stratégie soit pertinente, il faut s'assurer qu'une bioanode formée à 40°C est ensuite capable de fonctionner convenablement à température ambiante. En effet, on peut craindre qu'une bioanode formée à 40°C développe des systèmes microbiens spécifiques à cette température, et qu'elle soit ensuite moins performante à température ambiante qu'une bioanode formée à température ambiante dès le début.

Les travaux réalisés pour répondre à cette question ont fait l'objet de l'article intitulé « Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature » soumis pour publication dans le journal *Bioresource Technology*.

La stratégie expérimentale est la suivante (Figure 18) :

- Quatre bioanodes sont formées dans du lixiviat de terreau, deux à 25°C et deux à 40°C, afin de caractériser les différences dues à la température.
- Deux bioanodes sont formées à 25°C tout au long de l'expérience, d'abord en lixiviat de terreau puis transférées en milieu synthétique.
- Deux bioanodes sont formées à 40°C en lixiviat de terreau puis en milieu synthétique et, après 10 jours en milieu synthétique, la température est basculée à 25°C.

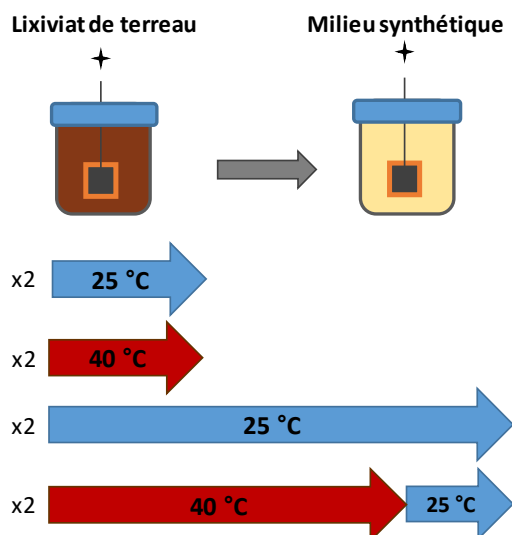


Figure 18. Stratégie expérimentale pour étudier l'influence de la température sur le développement de l'anode microbienne.

Les huit bioanodes sont formées sous polarisation dans un dispositif à 3 électrodes (Tableau 11, dispositif décrit au Chapitre 2). Ce dispositif est choisi afin de caractériser exclusivement la bioanode. En effet, de nombreuses études ont utilisé une PCM comme montage expérimental. Il devient alors complexe de dissocier l'effet de la température sur le fonctionnement de la bioanode, de son effet sur les autres éléments du système. La température joue par exemple un rôle significatif sur la cinétique de la cathode à air (H. Liu et coll., 2005) comme observé dans la partie 1.1 de ce chapitre.

Tableau 11. Conditions expérimentales de l'étude sur l'impact de la température sur le développement de la bioanode.

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS		
Réacteur : « Standard simple compartiment »		
8 bioanodes formées selon la stratégie décrite dans la Figure 18		
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 10 \text{ cm}^2$		
Paramètres expérimentaux		
Inoculum : Lixiviat de terreau	Température : 40°C	Substrat : Acétate batch 20 mM
Milieu propre : Milieu synthétique		
Remplacements des milieux avec pompe péristaltique sous bullage d'azote		
Techniques électrochimiques		
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$	Voltammétrie cyclique : 1 mV.s^{-1} 3 cycles Aller : OCP $\rightarrow +0.2 \text{ V/ECS}$ puis Retour : $+0.2 \rightarrow -0.5 \text{ V/ECS}$	
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence	Microscopie électronique à balayage (MEB)	

Le titre de l'article ne laisse guère de suspens quant à la conclusion essentielle de l'étude. Outre le fait que la stratégie d'augmentation de la température est pertinente, les principaux résultats sont les suivants :

- Une température de 40°C permet de réduire de moitié le temps de formation des bioanodes par rapport à 25°C.
- Les bioanodes formées initialement à 40°C puis basculées à 25°C présentent des performances similaires aux bioanodes formées à 25°C dès le début de l'expérience. Il est donc possible de

former plus rapidement une bioanode à une température élevée pour un fonctionnement optimal à température ambiante.

- La température affecte les systèmes redox impliqués dans le transfert d'électron : les bioanodes développées à 40°C mettent en jeu deux systèmes redox mais, une fois la température basculée à 25°C, elles retrouvent le même et unique système observé sur les bioanodes formées à 25°C.
- Les deux températures 40°C et 25°C entraînent le développement de deux structures de biofilm différentes. Ces structures tendent à évoluer selon un schéma similaire lorsque les bioanodes formées à 40°C sont passées à 25°C.

Dans la suite de ce travail de thèse, sauf mention contraire, les bioanodes sont formées à 40°C. Les densités de courant produites sont ainsi maximisées et les bioanodes produites sont parfaitement utilisables pour concevoir une PCM autonome capable de fonctionner à température ambiante.

Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature

Manon Oliot, Benjamin Erable, Marie-Line De Solan, Alain Bergel

Submitted to *Electrochimica Acta* in June 2017

Abstract

Reducing the time required for the formation of microbial anodes from environmental inocula is a great challenge. The possibility of reaching this objective by increasing the temperature during the bioanode preparation was investigated here. Microbial anodes were formed at 25 °C and 40 °C under controlled potential with successive acetate additions. At 25 °C, around 40 days were required to perform three acetate batches, which led to current density of $9.4 \pm 2 \text{ A.m}^{-2}$, while at 40 °C, 20 days were sufficient to complete three similar batches, leading to $22.9 \pm 4.2 \text{ A.m}^{-2}$. The bioanodes formed at 40 °C revealed three redox systems and those formed at 25 °C only one. The temperature also impacted the biofilm structure, which was less compact at 40 °C. When the bioanodes formed at 40 °C were switched to 25 °C, they produced current densities similar to those of bioanodes formed at 25 °C; they recovered the single redox system that was developed by the bioanodes formed at 25 °C and the difference in biofilm structures was mitigated. It is consequently fully appropriate to accelerate the formation of microbial anodes by increasing the temperatures to 40 °C even if they are finally intended to operate at room temperature

Keywords: Electroactive biofilms; bioanode; microbial fuel cell; microbial electrochemistry; bioelectrochemical system.

1. Introduction

For around two decades, microbial anodes have been opening up fascinating avenues for a huge number of electrochemical processes [1–3]. Microbial fuel cells (MFCs) were the pioneering systems in which microbial anodes were implemented [4–6]. Thanks to the capability of microbial anodes to oxidize a large variety of organic compounds [7,8], MFCs can produce electrical power from zero-cost organic matter and they have often been envisioned in the design of wastewater treatment and bioremediation processes [9,10]. MFCs can also be implemented in the form of self-powered biosensors [11]. Beyond the domain of MFCs, microbial anodes are also at the core of numerous innovative technological concepts. An extremely simple device, called electro-microbial snorkel, has been derived by short-circuiting a microbial anode with a cathode [12]. This device no longer produces electrical power but it maximizes the organic matter consumption rate. Because of its simplicity, low cost and low maintenance requirements, this way of implementing microbial anodes should have a promising future in wastewater treatment [13] and environmental depollution [14–16]. Microbial anodes are also at the core of microbial electrolysis cells, which open up interesting perspectives in various domains such as low-cost hydrogen production [17,18] and metal recovery [19,20].

Unfortunately, the formation of microbial anodes from natural media often takes a long time, up to several weeks. This is a hindrance for researchers, who need to carry out multiple experiments, and

for engineers, who seek to shorten the start-up time of the related processes. Reducing the formation time of microbial anodes is consequently a topic of intense research, for which many different paths have been explored. Studies have generally been carried out with MFCs used as the experimental set-up, with the practical objective of reducing the MFC start-up time. The effect of the anode surface topography (roughness, porosity, etc.) has been checked [21] and surface chemistry has been widely investigated with different kinds of surface modification, including electrochemical treatments [22,23], self-assembled monolayers [24], chemical modification [25,26], surfactant treatments [25,27], and functionalized coatings [26], which pointed out the importance of the hydrophilic/hydrophobic property of the surface [28]. From a biological standpoint, reducing the start-up time of MFCs has been attempted by changing the nature of the inoculum [29] and with various treatments of the inlet, e.g. by chemical amendment [30] or bioaugmentation with an electroactive strain [31]. Technologically, different start-up procedures [32,33] and particularly the choice of the external resistance [34,35] have been proposed.

The purpose of the present study was to try to shorten the time necessary to form microbial anodes from environmental inocula by increasing the temperature during the formation phase. As for any microbial process, temperature is a key parameter affecting the performance of microbial anodes. Increasing the temperature should consequently be a powerful lever to accelerate the formation phase. However, it can be feared that an efficient microbial anode formed at high temperature may not be able to operate satisfactorily at room temperature. Consequently, it is necessary to check whether a microbial anode formed rapidly at high temperature could remain efficient when subsequently operating at lower temperature. The question to be answered in this study was: when the final objective is to implement a microbial anode at room temperature, is it relevant to accelerate its formation by increasing the temperature, or would it be more suitable to take the time to form it at the temperature (room temperature) at which it is intended to be used?

Several studies have aimed to define the impact of temperature on MFC performance. Increasing the temperature has generally been observed to increase MFC power density [36–39]. The increase of current density with temperature has been confirmed over a large range of temperatures, from 4 to 35 °C (23.1 mA.m⁻² was provided at 4 °C against 93.9 mA.m⁻² at 35 °C) [40]. In the 30 to 45 °C range, it has been shown that the current produced by a microbial anode increases with temperature according to an Arrhenius law [41]. It is generally agreed that performance increases, reaching a maximum somewhere between 35 and 45 °C [36,41–43]. A temperature higher than 50 °C has been reported to inactivate the microbial metabolism and consequently to decrease the current produced by MFCs [36,41].

Nevertheless, the opposite effect has also been reported, with better MFC performance obtained at lower temperature because of the smaller amount of methanogens, which are commonly responsible for substrate consumption to the detriment of electrogenic populations [44,45]. For long-term experiments, of around 60 weeks, MFCs run at 10 or 20 °C have been observed to produce more power than those run at 35 °C, because the higher biomass accumulation at 35 °C favours the development of non-electroactive species [46].

Studies have reported that MFCs can tolerate temperature changes, for example temperatures alternating between 18-30 °C and 6-18 °C to simulate day-night cycles [42]. The MFCs produced lower voltage at lower temperature and recovered higher performance when the temperature rose again. In one case, temperature change has been reported to have a positive impact on MFC performance.

Starting up an MFC at low temperatures (4 and 10 °C) led to poor power production but the performance improved when the MFC was first operated at a higher temperature (30 °C) and then switched to the lower temperature [47]. In contrast, another study comparing MFCs developed at 10, 20 and 35 °C showed that only the MFCs acclimated at 20 °C were capable of optimal operation over an 8–35 °C range [48].

Most studies devoted to the effect of temperature have used MFCs as the experimental set-up. In an MFC, the effect of temperature on the microbial anode itself is difficult to dissociate from its effect on other elements of the cell, including the cathode and the separator, which can depend on the cell configuration [41]. In particular, the temperature impacts the cathode kinetics, which, in turn, affects the potential of the anode. It was thus observed that the 9% decrease in the power density produced by an MFC when the temperature decreased from 32 °C to 20 °C was mainly due a lowering of the cathode potential [38]. Another study has pointed out the impact of the presence or absence of a separator on the effect of temperature on the anode. An MFC initially formed at 30 °C maintained high performance when the temperature was shifted to 20 °C if it was equipped with a separator, while the anode formed in the absence of separator performed poorly when the temperature was lowered [49]. The presence or not of the separator was shown to impact the potential of the anode.

The present study aimed to characterize the impact of temperature on the microbial anode itself. Characterizing the behaviour of each of the elements that constitute an electro-microbial reactor, by specific analytical experiments, is a pre-requisite to the launch of an engineering-based strategy for the development of the related technologies [50]. The study was therefore carried out in electroanalytical conditions [51] by using a three-electrode set-up to protect the anode from most interactions due to the other elements of the system, and particularly from variations in the kinetics of the auxiliary electrode. The potential applied to the anode was thus perfectly controlled. Such conditions have rarely been implemented so far to characterize the impact of temperature on the formation phase of microbial anodes.

It was chosen to use an inoculum related to soils, because the wide microbial diversity of soils [52,53] has started to be revealed as a great source of MFC electroactive microbial communities [54–57] with various applications including sensors [58] and soil remediation [59]. The method implemented here, which consisted of using soil leachate as the electrolyte, has already led to efficient microbial anodes on various electrode materials including graphite [22], platinum [60] and stainless steel [61]. We thus hope that the results obtained here on the possibility of accelerating the formation of microbial anodes from a soil sample will be useful for numerous future research endeavours.

3. Results and discussion

3.1. Microbial anode formation in garden compost leachate

Microbial anodes were formed in a leachate of garden compost under controlled potential at -0.20 V/SCE [62,64]. Four reactors were implemented at 40 °C and four others at 25 °C. Microbial anodes formed at 40 °C produced higher current densities than those formed at 25 °C (Fig. 1). At the third oxidation peak, $22.9 \pm 4.2 \text{ A.m}^{-2}$ was achieved at 40 °C while only $9.4 \pm 2 \text{ A.m}^{-2}$ was observed at 25 °C. It should also be noted that the current-time curves presented a more reproducible pattern at 40 °C than at 25 °C.

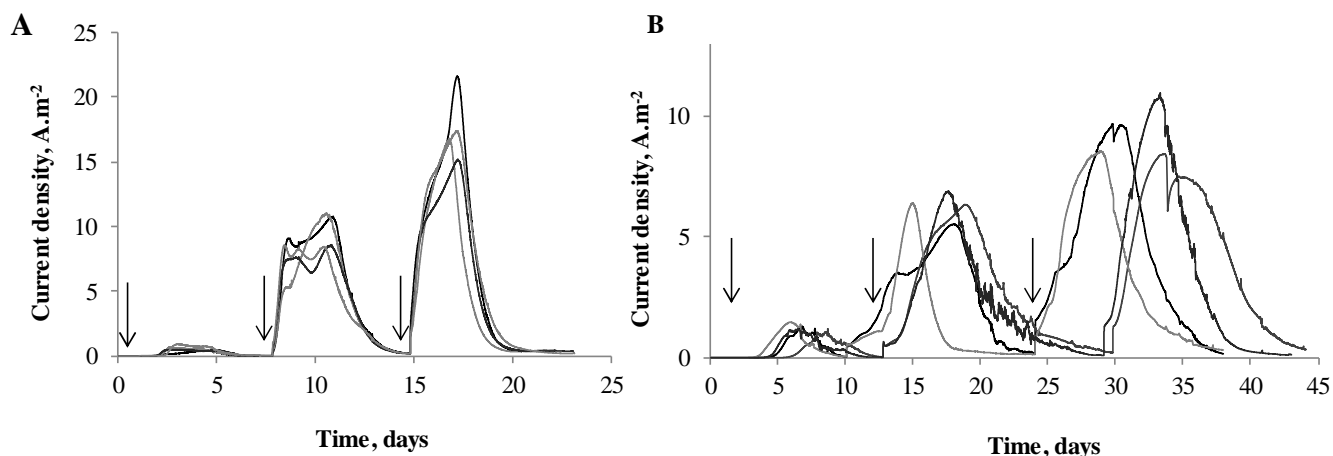


Fig. 1. Formation of microbial anodes under constant polarization at -0.2 V/SCE in garden compost leachate at (A) 40 °C and (B) 25 °C. Three successive additions of acetate 20 mM were performed (indicated by arrows).

As expected, the time required to form the microbial anodes was considerably reduced at the higher temperature. The start-up time was reduced from 4 to 2.5 days and around 20 days were enough to complete the three acetate batches at 40 °C, whereas 40 days were necessary at 25 °C. It is well known that metabolic reaction rates increase with temperature. Several studies performed with MFCs have observed maximum performance at temperatures in the range of 35 to 45 °C [36,41,42]. The considerable effect of temperature on the kinetics of the microbial anode, as shown here, was certainly an important cause of the MFC behaviour reported in the literature. The shorter formation time and higher current density observed here at 40 °C were most likely due to higher metabolic rates at higher temperature. Nevertheless, in such a complex multi-species medium, the higher current density produced at higher temperature could also be due to the selection of different microbial communities [43].

Coulombic efficiencies (CEs) showed the same trend whatever the temperature (Table 1).

Table 1. Coulombic efficiencies obtained in chronoamperometry at -0.2 V/SCE in compost leachate with 4 reactors at 40 °C and 4 reactors at 25 °C.

40 °C					Average	Standard deviation
1st peak	0.85	1.5	1.43	1.91	1.4	0.4
2nd peak	30.9	28.1	26.2	25.6	27.7	2.1
3rd peak	43.6	31.5	35.5	42.3	38.2	5
25 °C						
1st peak	2.8	2.7	3.5	3.4	3.1	0.4
2nd peak	30.2	37	17.1	30.7	32.6	3.1
3rd peak	52.5	52.8	40.7	44.7	47.7	5.2

CEs increased considerably from the first to the third oxidation peak: from $1.42 \pm 0.38\%$ to $38.2 \pm 5\%$ at 40 °C and from $3.1 \pm 0.35\%$ to $47.7 \pm 5.2\%$ at 25 °C. The fact that CE values remained low had two synergetic causes: the small surface area of the electrodes (10 cm²) in comparison with the relatively large solution volume (650 mL) on the one hand, and the richness of the medium on the other hand. As theorized elsewhere [51] an electroanalysis system must implement a working electrode of small surface area in a large volume of solution in order to favour the highest possible current density. Conversely, such a system is detrimental to CE values, particularly when non-electrochemical reactions

compete for the consumption of the substrate, as was the case here. An electroanalytical device properly designed to characterize a microbial anode under the most favourable conditions should result in low Coulombic efficiencies when complex microbial systems are implemented [51], as observed in the present work. The compost leachate may contain various electron acceptors (nitrates, sulphates, etc.) that deflect electroactive bacteria from extracellular electron transfer to the anode. Acetate can also be consumed by non-electroactive bacteria using a soluble electron acceptor and by acetoclastic methanogenic *Archaea* [65]. These *Archaea* transform acetate into methane and CO₂ and they have already been identified in significant proportions in microbial anodes formed in soils [66].

CEs displayed lower values at 40 °C than at 25 °C. For instance, at the third oxidation peak, CEs were $38.2 \pm 5\%$ at 40 °C and $47.7 \pm 5.2\%$ at 25 °C. The lower CEs obtained at 40 °C indicate that this temperature favoured the development of non-electroactive microorganisms, as already observed in MFCs [46], or increased the metabolic rate of the non-electroactive species to a greater extent than that of the electroactive ones.

The anodes coming from two reactors implemented at 40 °C and two implemented at 25 °C were analysed by epifluorescence and SEM (Fig. 2).

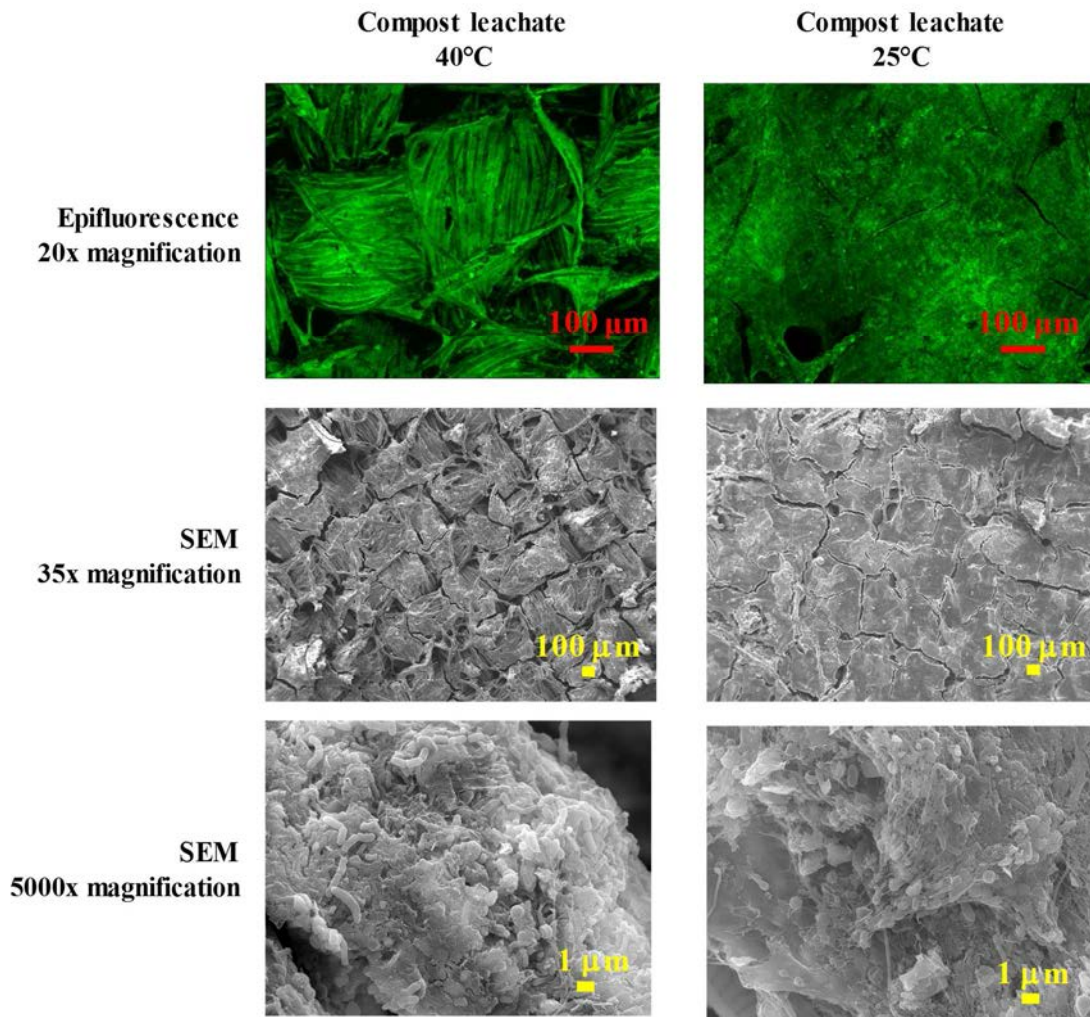


Fig.2. Epifluorescence and scanning electron microscopy imaging of the microbial anodes formed in leachate of garden compost at 40 °C (left) and 25 °C (right). Representative views of 3 spots imaged on two different electrodes for each temperature for both observation techniques.

Epifluorescence images showed that the anodes developed at 25 °C presented a denser colonization than those at 40 °C. The colonization of the carbon cloth was more compact at 25 °C and formed a homogenous biofilm that masked the carbon cloth structure. In contrast, the carbon fibres were still apparent at 40 °C and the biofilm wrapped around the fibres tightly. SEM observations at magnification x35 were consistent with the epifluorescence images. SEM imaging at a higher magnification (x5000) showed that biofilms formed at 25 °C presented microorganisms agglutinated in an abundant matrix of exopolymeric substances (EPS). EPS formed a kind of lace or spider web that made observation of the individual microbial cells difficult. In contrast, cells could be identified easily in the biofilms formed at 40 °C.

3.2. Microbial anode formation in synthetic medium

The compost leachate of the four remaining reactors was replaced by a synthetic medium. The procedure, which consisted of forming microbial anodes in a rich natural medium and then transferring them into a minimal synthetic medium, has already been successfully applied to different natural media [63,67]. This procedure has led to significant enhancement of the anode performance from the natural medium to the synthetic one. The main interest of this procedure is the possibility of preparing the microbial anode firstly in a complex, rich inoculum and then implementing it in a clean electrolyte. For instance, in an MFC equipped with an air-cathode, transferring the microbial anode into a clean electrolyte mitigates biofouling of the cathode [63]. Relocation from natural medium to synthetic minimal medium can also be a way to design robust microbial anodes [67].

The reactors initially implemented at 25 °C with the compost leachate were kept at 25 °C for four additional acetate additions (Fig. 3). The reactors initially run at 40 °C with the compost leachate were kept at this temperature for two acetate additions and then were switched to 25 °C for two acetate additions. Performance was almost stable, or slightly decreased, after the garden compost leachate had been replaced by the synthetic medium at 25 °C but increased for the anodes run at 40 °C. At 40 °C, the current density produced in the garden compost leachate was $22.9 \pm 4.2 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ ($n = 4$) and it increased to $26.6 \pm 1.6 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ ($n = 2$) in the synthetic medium. This performance increase may have been due to the supply of vitamins and/or micro-nutrients contained in the synthetic medium.

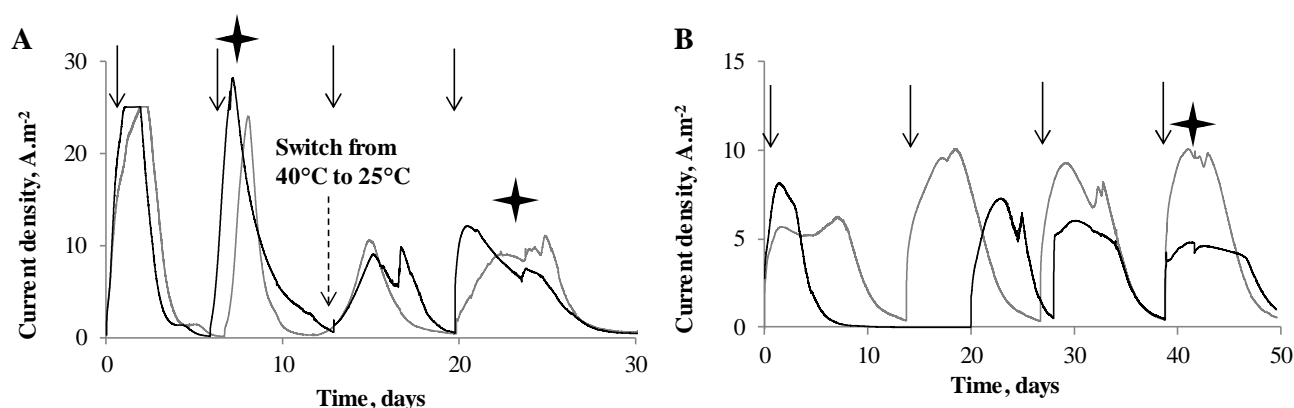


Fig. 3. Microbial anodes formed under constant polarization at -0.2 V/SCE in synthetic medium (A) at 40 °C and then switched to 25 °C, (B) at 25 °C throughout the experiment. Arrows indicate the successive additions of acetate 20 mM. Cyclic voltammetries were recorded at the times indicated by stars.

As commented above, epifluorescent and SEM imaging consistently showed that the biofilms formed at 25 °C were thicker and more compact with more EPS matrix. In contrast, microbial cells were more easily accessible in the biofilms formed at 40 °C. Accordingly, this difference in biofilm structures

supports the idea that the biofilms formed at 40 °C benefited fully from the supply of vitamins and/or micro-nutrients because mass transfer of these compounds to the microbial cells was easy. In contrast, the compact biofilm structure of the bioanodes formed at 25 °C could hamper the transfer of the vitamins and/or micro-nutrients to the electroactive cells, so that these bioanodes could not take full advantage of the supplies from the bulk.

Similarly, mass transfer limitation may affect the pH balance inside the biofilm. It is known that local acidification of the biofilm to pH values slightly lower than neutrality, due to acetate oxidation:



is a major cause of inhibition of microbial anodes [68,69]. Here, no buffering species was added into the garden compost leachate and the pH gradient may consequently have been stiff inside the biofilms. In contrast, the synthetic medium contained 20 mM of phosphate species. The buffering effect of the synthetic medium may have been more efficient for the biofilms formed at 40 °C than for those formed at 25 °C because of the greater thickness and compactness of the latter.

In the synthetic medium, CEs were $47.4 \pm 9.4\%$ and $42.9 \pm 11.9\%$ at 40 °C and 25 °C, respectively. CEs were of the same order of magnitude as those obtained in compost leachate at the third peak, although the synthetic medium did not contain dissolved electron acceptors. It was observed that the initially limpid synthetic medium became brown after a few days, due to planktonic microbial growth. The medium was initially deoxygenated and the reactors were covered by a screw cap. Actually, no drastic precautions were taken to seal the reactors hermetically and it cannot be excluded that traces of oxygen may have penetrated into the reactors and have been used as electron acceptors, but to a very limited extent, which could not support the significant planktonic growth observed after a few days. The most likely explanation of the low CE values was the presence of acetoclastic methanogenic *Archaea* that consumed acetate to produce methane and carbon dioxide [65,66]. Because of the low ratio of the electrode surface area to solution volume, used here to work in suitable electroanalysis conditions [51], the effect of planktonic side-reactions was enhanced.

The anodes initially developed at 40 °C and then switched to 25 °C produced current density of the same order of magnitude, $10.2 \pm 0.4 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$, as those implemented at 25 °C from the beginning of the experiment. This result showed that the bioanodes formed at 40 °C were perfectly suitable for subsequent operation at 25 °C. No loss of performance was observed with respect to the bioanodes formed at 25 °C from the beginning of the experiments, with the same number of batches. It was thus possible to save a lot of time by developing the bioanodes at 40 °C, as the formation time was shortened by around 20 days. Consequently, the strategy of producing bioanodes in optimal conditions at high temperature and then using them in a system that operates at a less favourable temperature is a relevant one.

When the temperature was lowered from 40 to 25 °C, the full decrease of current density was observed from the first acetate batch performed at 25 °C and the second acetate addition displayed similar current values (Fig. 3.A). The fact that the full extent of the current density decrease was observed from the first acetate batch indicated that current decrease was probably due to a slowing of the metabolic rates rather than evolution of the microbial communities. Adaptation of the microbial community by the development of different species would have required more time and would not have resulted in stable current density as soon as the temperature was changed. Even if microbial communities may adapt to temperature, it is most likely that the performance observed here for the

microbial anode, in terms of current density, was due to the impact of temperature on the metabolic rates.

Cyclic voltammetries (CVs) were recorded in turnover conditions, in the zones where the bioanodes produced maximum current, at different times (stars on Fig. 3). All CVs showed a similar general sigmoidal shape, with similar open circuit potentials (Fig. 4.A and 4.B). The maximum current density was higher at 40 °C than at 25 °C, consistently with the current recorded during polarization at -0.2 V/SCE. In spite of the similarity of the general shapes, clear differences depending on temperature can be observed on the CVs. The anodes formed at 40 °C reached the maximum current plateau at around -0.1 V/SCE, while those formed at 25 °C reached the maximum plateau at around -0.25 V/SCE. After the anodes formed at 40 °C had been run for two batches at 25 °C, they displayed CV curves similar to those of anodes formed initially at 25 °C; the maximum current plateau was reached at around -0.20 V/SCE. So this characteristic was directly related to the temperature.

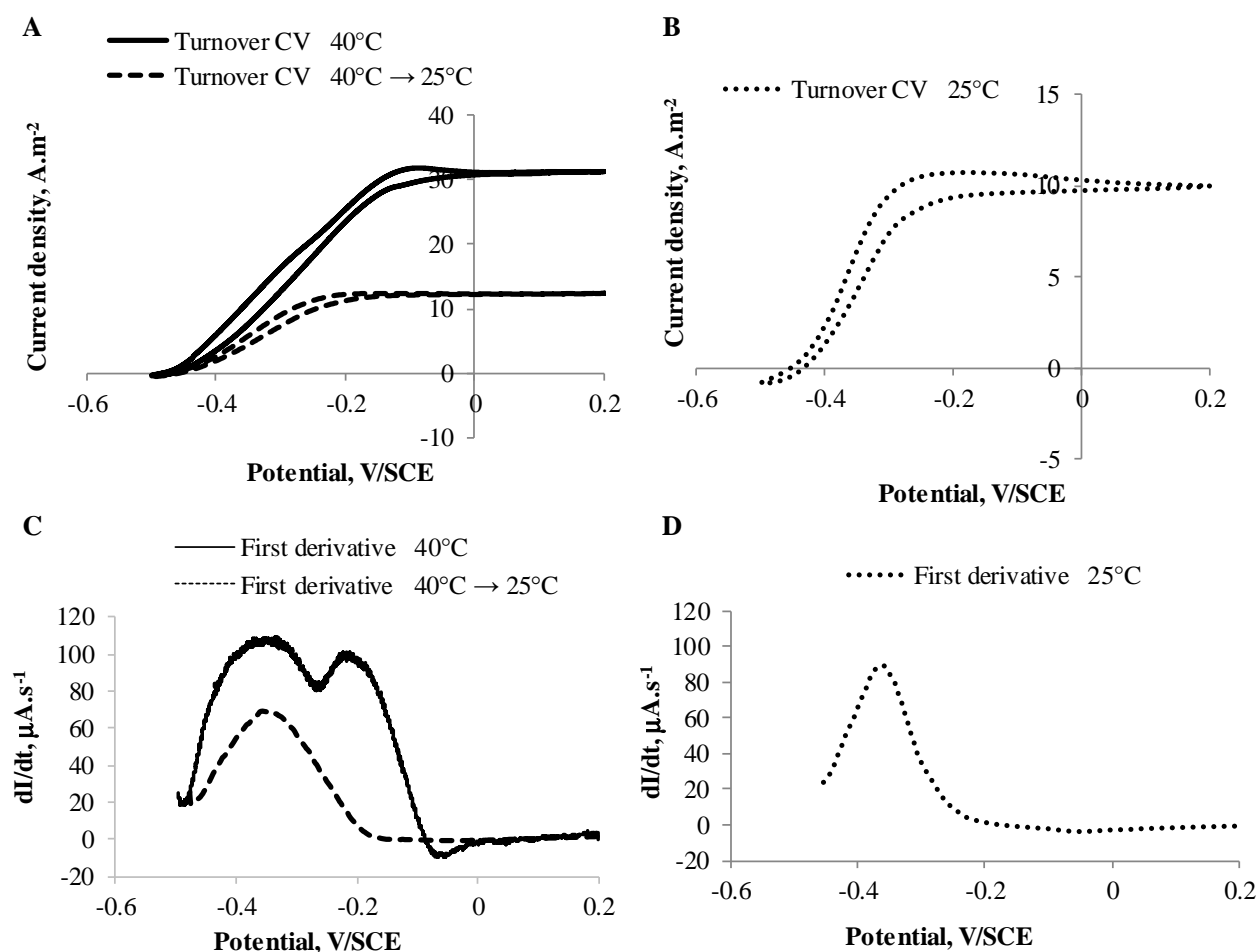


Fig. 4. Cyclic voltammetries in turnover conditions of (A) bioanodes formed at 40 °C and then switched to 25 °C and (B) bioanodes formed at 25 °C from the beginning of the experiment. (C) and (D) First derivatives of the CVs (A) and (B), respectively.

The first derivative of the CV curves showed another difference depending on the temperature (Fig. 4.C and 4.D). The bioanodes formed at 40 °C displayed two clear peaks, centred at around -0.34 and -0.20 V/SCE (solid line, Fig. 4.C), and a shoulder around -0.43 V/SCE which can be interpreted as three redox systems being involved in the electron transfer mechanism [70]. In contrast, the bioanodes formed at 25 °C showed only the peak centred at -0.35 V/SCE (Fig. 4.D). When the bioanodes formed

at 40 °C were implemented at 25 °C for two batches, the redox systems at -0.43 and -0.25 V/SCE disappeared (dashed line, Fig. 4.C) and the first derivative presented a single peak at -0.35 V/SCE, similarly to the bioanodes formed at 25 °C from the beginning of the experiment.

In order to validate the approach, theoretical CV curves were reconstructed by assuming that each redox system followed Nernst-Michaelis-Menten kinetics:

$$j = j_{\max} \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{F}{RT} (E - E_K)\right)} \quad (2)$$

where j is the current density ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$), j_{\max} is the maximum current density reached at the plateau ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$), F is the Faraday constant (96 485 C per mole e), R is the gas constant ($8.3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T is the temperature (K), E is the applied potential (V) and the potential E_K is the potential at which $j = j_{\max}/2$. The theoretical CV at 25 °C given with this equation when it was provided with the experimental values of j_{\max} and E_K fitted the experimental record perfectly (Fig. 5). It was thus confirmed that CV corresponded to a single redox system and that this system ensured Nernst equilibrium of the redox species at the electrode surface. This result confirmed the great interest of soil inocula for forming efficient microbial anodes.

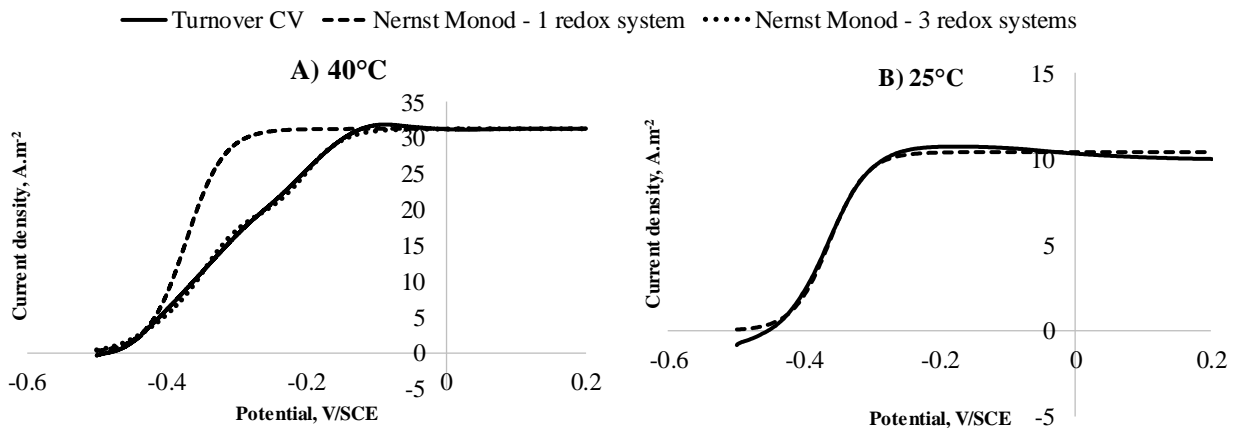


Fig. 5. Experimental and theoretical cyclic voltammeteries of (A) bioanodes formed at 40 °C and (B) bioanodes formed at 25 °C. Continuous lines: experimental curves, similar to Fig.4; dashed lines: theoretical curve obtained with a single Nernst-Monod system; dotted line: theoretical curve obtained with three Nernst-Monod systems.

The same procedure implemented for the bioanode formed at 40 °C produced a theoretical curve that clearly did not match the experimental curve (Fig. 5). In this case, it was necessary to take the three redox systems detected by the CV first derivative into account and to add the current densities given by these three systems:

$$j = j_{\max,i} \sum_{i=1}^3 \frac{j_{\max,i}}{1 + \exp\left(-\frac{F}{RT} (E - E_{K,i})\right)} \quad (3)$$

where $j_{\max,i}$ and $E_{K,i}$ correspond to the i th redox system. The three values of $E_{K,i}$ were extracted from the CV first derivative (-0.43 V, -0.34 V and -0.20 V/SCE) and the three parameters $j_{\max,i}$ were adjusted numerically in order to make the theoretical curve fit the experimental CV. The values of 5, 14.2 and 12 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ led to satisfactory fitting (Fig. 5). This result is of great importance for the basic understanding of the anode kinetics. The experimental CV of the bioanodes formed at 40 °C showed a large difference

with the theoretical Nernst-Michaelis-Menten curve. Nevertheless, it must not be concluded that the interfacial electron transfer was not efficient enough to ensure Nernstian equilibrium at the interface. In contrast, the multi-system model matched the experimental CV perfectly, showing that the kinetics was the sum of three Nernst-Michaelis-Menten kinetics. Actually, the 40 °C kinetics was the sum of three redox systems, each ensuring Nernst equilibrium. The biofilm was composed of three very efficient redox systems.

Practically, if the objective of further work was to improve the anode kinetics, it would not be relevant to try to accelerate the interfacial electron transfer but, rather, to make the biofilm select for the most efficient redox pathway. The key for kinetics improvement is consequently not the interfacial electron transfer rate but the electrochemical redox system that the biofilm is able to implement. Further possible improvement of this kind of anode should concentrate on the nature of the redox systems that the biofilm develops.

These results show that the temperature has a direct impact on the redox systems involved in electron transfer. At 40 °C, two supplementary redox systems appeared, which then disappeared when the anodes were implemented at 25 °C. These additional redox systems explained the difference in the CV curves of the anodes formed at 40 and 25 °C. The theoretical breakdown into three systems indicated that the system centred at around -0.35 V/SCE, which was present independently of the temperature, was responsible for around 14.2 A.m⁻². This current density was higher than the j_{max} provided by the bioanodes formed at 25 °C (9.4 ± 2 A.m⁻²). At 25 °C, the two systems centred at -0.43 and -0.20 V/SCE disappeared and the remaining single system produced less current, certainly because of slowing of the metabolic rate. In terms of electrochemical functionality, shifting the temperature from 40 to 25 °C resulted in putting two redox systems out of operation and slowing down the single redox system detected at 25 °C, so that, when used at 25 °C, the microbial anodes formed at 40 °C presented electrochemical characteristics similar to those of anodes formed at 25 °C.

After four batches in synthetic medium, the microbial anodes were observed by epifluorescence (Fig. 6) and SEM. Epifluorescence imaging showed no significant difference between bioanodes switched from 40 to 25 °C and those formed at 25 °C from the beginning. For both conditions, biofilms were denser than those observed in the leachate of garden compost (Fig. 2) and covered the entire electrode surfaces. Differences were, however, detected with SEM. Bioanodes formed at 25 °C from the beginning presented a really thick biofilm covering the entire surface, whereas carbon fibres were still distinguishable on bioanodes firstly formed at 40 °C and then switched to 25 °C. The less compact structure of the biofilm that was formed at 40 °C was still visible after the bioanode had been switched to 25 °C for two batches but it tended to disappear. The two temperatures led to different biofilm structures, which then evolved towards a similar pattern when the temperature was switched to 25 °C.

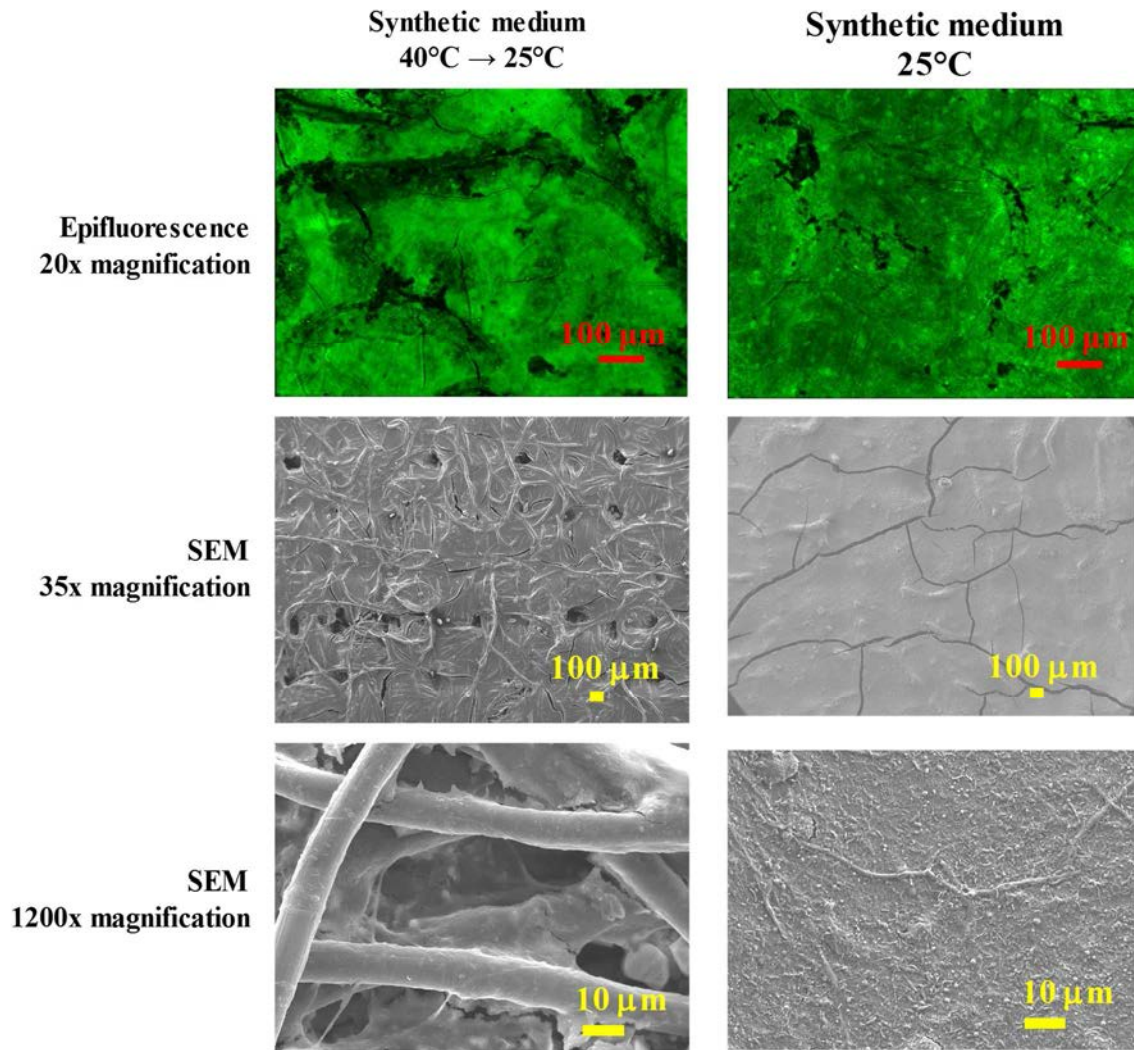


Fig. 6. Epifluorescence and scanning electron microscopy imaging of the microbial anodes formed in synthetic medium and presented in Fig. 3: formed at 40 °C and switched to 25 °C (left) and at 25 °C throughout the experiment (right). Representative views of 3 points imaged on two different electrodes for each temperature for both observation techniques.

The conclusion on this issue may be open to debate because the biofilms formed at 40 and 25 °C were compared at different ages. As expected, forming biofilms at 40 °C was much faster. The three initial batches in compost leachate were achieved in only 20 days, against 40 to 44 days at 25 °C. Then, in synthetic medium, the biofilms formed at 40 °C underwent two additional batch runs at 40 °C before being switched to 25 °C, so their final age was 53 days. In comparison, the final age of the biofilms operated at 25 °C for the whole experiment was 94 days. In this context, great care must be taken when comparing the biofilm structures. Nevertheless, the biofilms aged 53 days formed at 40 °C showed a more open structure (Fig. 6, SEM imaging, left) than the biofilms aged 44 days formed at 25 °C (Fig. 6, SEM imaging, right). The claim that temperature had a real impact on the biofilm structure is consequently sound. If the objective is to accurately characterize the impact of temperature on the biofilm structure, further studies should be performed by comparing biofilms at identical ages, instead of working at identical number of batches as we chose to do here.

4. Conclusion

As expected, the temperature of 40 °C permitted the time required to form microbial anodes to be considerably reduced. Here the formation time was reduced by 50 %, from 40 to 20 days, to run three batches of acetate addition. In addition, the bioanodes formed at 40 °C and then implemented at 25 °C displayed similar performance to that of the bioanodes formed initially at 25 °C. The bioanodes formed at 40 °C showed evidence of three redox systems but, when switched to 25 °C, recovered the same single system that was developed at 25 °C. It is consequently fully relevant to reduce the formation time of microbial anodes by increasing the temperature, even for anodes intended to work at room temperature.

Acknowledgements

This work benefited from the support of the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the project Bioelec (ANR-13-BIME-006).

References

- [1] H. Wang, ZJ. Ren, A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1796–807.
- [2] S. Venkata Mohan, G. Velvizhi, K. Vamshi Krishna, M. Lenin Babu, Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications, *Bioresour. Technol.* 165 (2014) 355–64.
- [3] S. Bajracharya, M. Sharma, G. Mohanakrishna, X. Dominguez Benneton, DPBTB. Strik, PM. Sarma, et al., An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond, *Renew. Energy.* 98 (2016) 153–70.
- [4] DR. Bond, DE. Holmes, LM. Tender, DR. Lovley, Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments, *Science.* 295 (2002) 483–5.
- [5] LM. Tender, CE. Reimers, HA. Stecher, DE. Holmes, DR. Bond, DA. Lowy, et al, Harnessing microbially generated power on the seafloor, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 821–5.
- [6] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, *J. Power Sources* 356 (2017) 225-44.
- [7] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1533–43.
- [8] P. Pandey, VN. Shinde, RL. Deopurkar, SP. Kale , SA. Patil, D. Pant, Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery, *Appl. Energy.* 168 (2016) 706–23.
- [9] BE. Logan, K. Rabaey, Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies, *Science* 337 (2012) 686–90.
- [10] W-W. Li, H-Q. Yu, Z. He, Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 911–24.
- [11] G. Pasternak, J. Greenman, I. Ieropoulos, Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring, *Sens. Actuators B. Chem.* 244 (2017) 815–22.
- [12] B. Erable, L. Etcheverry, A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling* 27 (2011) 319–26.
- [13] Q. Yang, H. Zhao, H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 512–4.

- [14] DR. Lovley, Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 4896–906.
- [15] CC. Viggì, E. Presta, M. Bellagamba, S. Kaciulis, SK. Balijepalli, G. Zanaroli, et al., The “Oil-Spill Snorkel”: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments, *Front Microbiol.* 6 (2015) 881.
- [16] B. Matturro, CC. Viggì, F. Aulenta, S. Rossetti, Cable Bacteria and the Bioelectrochemical Snorkel: The Natural and Engineered Facets Playing a Role in Hydrocarbons Degradation in Marine Sediments, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 952.
- [17] Y. Zhang, I. Angelidaki, Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges, *Water Res.* 56 (2014) 11–25.
- [18] M. Kitching, R. Butler, E. Marsili, Microbial bioelectrosynthesis of hydrogen: Current challenges and scale-up, *Enzyme Microb. Technol.* 96 (2017) 1–13.
- [19] H. Wang, ZI. Ren, Bioelectrochemical metal recovery from wastewater: A review, *Water Res.* 66 (2014) 219–32.
- [20] YV. Nancharaiyah, SV. Mohan, PNL. Lens, Metals removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review, *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 102–14.
- [21] C. Santoro, M. Guilizzoni, JPC. Baena, U. Pasaogullari, A. Casalegno, B. Li, et al., The effects of carbon electrode surface properties on bacteria attachment and start up time of microbial fuel cells, *Carbon.* 67 (2014) 128–39.
- [22] B. Cercado-Quezada, M-L. Délia, A. Bergel, Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 440–3.
- [23] B. Li, J. Zhou, X. Zhou, X. Wang, B. Li, C. Santoro, et al., Surface Modification of Microbial Fuel Cells Anodes: Approaches to Practical Design, *Electrochimica Acta.* 134 (2014) 116–26.
- [24] C. Santoro, S. Babanova, K. Artyushkova, JA. Cornejo, L. Ista, O. Bretschger, et al., Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation, *Bioelectrochemistry*106 (2015) 141–9.
- [25] Y. Zhang, J. Jiang, Q. Zhao, Y-Z. Gao, K. Wang, J. Ding, et al., Accelerating anodic biofilms formation and electron transfer in microbial fuel cells: Role of anionic biosurfactants and mechanism, *Bioelectrochemistry* 117 (2017) 48-56.
- [26] A. Kaur, S. Ibrahim, CJ. Pickett, IS. Michie, RM. Dinsdale, AJ. Guwy, et al., Anode modification to improve the performance of a microbial fuel cell volatile fatty acid biosensor, *Sens. Actuators B-Chem* 201 (2014) 266–73.
- [27] K. Guo K, AH. Soeriyadi, SA. Patil, A. Prevoteau, S. Freguia, JJ. Gooding, et al., Surfactant treatment of carbon felt enhances anodic microbial electrocatalysis in bioelectrochemical systems, *Electrochem. Commun.* 39 (2014) 1–4.
- [28] K. Guo, S. Freguia, PG. Dennis, X. Chen, BC. Donose, J. Keller, et al., Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 7563–70.
- [29] J. Lobato, P. Canizares, F. Jesus Fernandez, MA. Rodrigo, An evaluation of aerobic and anaerobic sludges as start-up material for microbial fuel cell systems, *New Biotechnol.* 29 (2012) 415–20.
- [30] G. Liu, MD. Yates, S. Cheng, DF. Call, D. Sun, BE. Logan, Examination of microbial fuel cell start-up times with domestic wastewater and additional amendments, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7301–6.
- [31] S. Pandit, S. Khilari, S. Roy, MM. Ghangrekar, D. Pradhan, D. Das, Reduction of start-up time through bioaugmentation process in microbial fuel cells using an isolate from dark fermentative spent media fed anode, *Water Sci. Technol.* 72 (2015) 106–15.
- [32] Z. Borjas, J. Manuel Ortiz, A. Aldaz, J. Feliu, A. Esteve-Nunez, Strategies for Reducing the Start-up Operation of Microbial Electrochemical Treatments of Urban Wastewater, *Energies.* 8 (2015) 14064–77.
- [33] HC. Boghani, JR. Kim, RM. Dinsdale, AJ. Guwy, GC. Premier, Control of power sourced from a microbial fuel cell reduces its start-up time and increases bioelectrochemical activity, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 277–85.

- [34] L. Rago, N. Monpart, P. Cortes, JA. Baeza, A. Guisasola, Performance of microbial electrolysis cells with bioanodes grown at different external resistances, *Water Sci. Technol.* 73 (2016) 1129–35.
- [35] L. Zhang, J. Li, X. Zhu, D. Ye, Q. Fu, Q. Liao, Startup Performance and Anodic Biofilm Distribution in Continuous-Flow Microbial Fuel Cells with Serpentine Flow Fields: Effects of External Resistance, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56 (2017) 3767–74.
- [36] LH. Li, YM. Sun, ZH. Yuan, XY. Kong, Y. Li, Effect of temperature change on power generation of microbial fuel cell, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1929–34.
- [37] H. Moon, IS. Chang, BH. Kim, Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 621–7.
- [38] H. Liu, SA. Cheng, BE. Logan, Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5488–93.
- [39] B. Min, OB. Román, I. Angelidaki, Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance, *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1213–8.
- [40] A. Larrosa-Guerrero, K. Scott, IM. Head, F. Mateo, A. Ginesta, F. Jose Hernandez-Fernandez, et al., Low temperature performance of microbial fuel cells, 13th International Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction. 2010. p. 463–8.
- [41] Y. Liu, V. Climent, A. Berna, J. Miguel Feliu, Effect of Temperature on the Catalytic Ability of Electrochemically Active Biofilm as Anode Catalyst in Microbial Fuel Cells, *Electroanalysis* 23 (2011) 387–94.
- [42] Y. Zhang, J. Sun, Y. Hu, Z. Wang, S. Li, Effects of periodically alternating temperatures on performance of single-chamber microbial fuel cells, *Int. J. Hydrog. Energy.* 39 (2014) 8048–54.
- [43] RA. Barbato, KL. Foley, JA. Toro-Zapata, RM. Jones, CM. Reynolds, The power of soil microbes: Sustained power production in terrestrial microbial fuel cells under various temperature regimes, *Appl. Soil Ecol.* 109 (2017) 14–22.
- [44] L. Liu, O. Tsyganova, D-J. Lee, J-S. Chang, A. Wang, N. Ren, Double-chamber microbial fuel cells started up under room and low temperatures, *Int. J. Hydrog. Energy.* 38 (2013) 15574–9.
- [45] GS. Jadhav, MM. Ghangrekar, Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 717–23.
- [46] IS. Michie, JR. Kim, RM. Dinsdale, AJ. Guwy, GC. Premier, Operational temperature regulates anodic biofilm growth and the development of electrogenic activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 419–30.
- [47] S. Cheng, D. Xing, BE. Logan, Electricity generation of single-chamber microbial fuel cells at low temperatures, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1913–7.
- [48] IS. Michie, JR. Kim, RM. Dinsdale, AJ. Guwy, GC. Premier, The influence of psychrophilic and mesophilic start-up temperature on microbial fuel cell system performance, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 1011–9.
- [49] X. Zhang, P. Liang, J. Shi, J. Wei, X. Huang, Using a glass fiber separator in a single-chamber air-cathode microbial fuel cell shortens start-up time and improves anode performance at ambient and mesophilic temperatures, *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 529–35.
- [50] M. Olliot, P. Chong, B. Erable, A. Bergel, Influence of the electrode size on microbial anode performance, *Chem. Eng. J.* (2017) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.044>.
- [51] M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable, A. Bergel, Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives, *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP. 16 (2014) 16349–66.
- [52] V. Torsvik, R. Sorheim, J. Goksoyr, Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review, *J. Ind. Microbiol.* 17 (1996) 170–8.
- [53] B-R. Liu, G-M. Jia, J. Chen, G. Wang, A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils, *Pedosphere.* 16 (2006) 18–24.

- [54] H. Futamata, O. Bretschger, A. Cheung, J. Kan, R. Owen, KH. Neelson, Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortium fed with lactate, *J. Biosci. Bioeng.* 115 (2013) 58–63.
- [55] SJ. Dunaj, JJ. Vallino, ME. Hines, M. Ga, C. Kobyljanec, JN. Rooney-Varga, Relationships between Soil Organic Matter, Nutrients, Bacterial Community Structure, And the Performance of Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 1914–22.
- [56] Y-B. Jiang, W-H. Zhong, C. Han, H. Deng, Characterization of Electricity Generated by Soilin Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1776.
- [57] SRB. Arulmani, V. Jayaraj, SR. Jebakumar, Long-term electricity production from soil electrogenic bacteria and high-content screening of biofilm formation on the electrodes, *J. Soils Sediments*, 16 (2016) 831–41.
- [58] P. Cristiani, A. Franzetti, G. Bestetti, Monitoring of electro-active biofilm in soil. *Electrochimica Acta.* 54 (2008) 41–6.
- [59] A. Dominguez-Garay, K. Boltes, A. Esteve-Nunez, Cleaning-up atrazine-polluted soil by using Microbial Electroremediating Cells, *Chemosphere* 161 (2016) 365–71.
- [60] D. Pocaznoi, B. Erable, M-L. Délia, A. Bergel, Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 5287–96.
- [61] SF. Ketep, A. Bergel, A. Calmet, B. Erable, Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 1633–7.
- [62] B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, et al., Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 276–84.
- [63] M. Oliot, L. Etcheverry, A. Bergel, Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 691–6.
- [64] D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M-L. Delia, A. Bergel, Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 13332–43.
- [65] B. Demirel, P. Scherer, The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7 (2008) 173–90.
- [66] A. Cabezas, B. Pommerenke, N. Boon, MW. Friedrich, *Geobacter*, *Anaeromyxobacter* and *Anaerolineae* populations are enriched on anodes of root exudate-driven microbial fuel cells in rice field soil, *Environ. Microbiol. Rep.* 7 (2015) 489–97.
- [67] X. Dominguez-Benetton, JJ. Godon, R. Rousseau, B. Erable, A. Bergel, ML. Délia, Exploring natural vs. synthetic minimal media to boost current generation with electrochemically-active marine bioanodes, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 2362–9.
- [68] CI. Torres, AK. Marcus, BE. Rittmann, Proton Transport Inside the Biofilm Limits Electrical Current Generation by Anode-Respiring Bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 872–81.
- [69] SC. Popat, CI. Torres, Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 265-73.
- [70] M. Rimboud, E. Desmond-Le Quemener, B. Erable, T. Bouchez, A. Bergel, Multi-system Nernst-Michaelis-Menten model applied to bioanodes formed from sewage sludge, *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 162–9.

2.3. Procédure optimale de formation d'une bioanode







A ce stade de l'étude, nous savons qu'il est nécessaire de suivre une procédure en deux étapes : la bioanode est dans un premier temps formée dans du lixiviat de terreau puis elle est acclimatée à un milieu synthétique dans le but de limiter l'encrassement de la cathode à air. Plusieurs stratégies de mise en œuvre de cette procédure sont testées ici. L'étude s'organise en deux volets : le premier est destiné à trouver la meilleure stratégie pour passer du lixiviat de terreau au milieu synthétique, et le second compare deux façons de repiquer une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire.

2.3.1. Volet n°1 : Du lixiviat de terreau au milieu synthétique

2.3.1.1. Description des procédures

Dans un premier temps, trois méthodes de formation de bioanode sont comparées (Tableau 12).

Tableau 12. Procédures de formation d'une bioanode à partir de l'inoculum lixiviat de terreau. La croix indique la polarisation de l'électrode.

	Lixiviat de terreau	Milieu synthétique	Nombres d'expériences
Polarisation complète			4 réacteurs 4 bioanodes analysées
Polarisation directe après immersion dans du lixiviat			4 réacteurs 4 électrodes analysées : - 2 électrodes en terreau non polarisées - 2 bioanodes polarisées en milieu synthétique
Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat			4 réacteurs 4 électrodes analysées : - 2 électrodes en terreau non polarisées - 2 bioanodes polarisées en milieu synthétique

La « polarisation complète » consiste dans un premier temps à appliquer un potentiel à la bioanode dans le lixiviat de terreau. Lorsque la bioanode fournit des densités de courant stables, le lixiviat est remplacé par un milieu synthétique. La polarisation de la bioanode se poursuit ensuite dans le milieu synthétique. C'est la procédure évoquée au paragraphe 2.1 et utilisée dans le paragraphe précédent pour évaluer l'effet de la température.

Bien que l'augmentation de la température à 40°C permette de réduire considérablement le temps nécessaire à la formation de la bioanode, celui-ci reste tout de même long, de l'ordre de deux à trois semaines. La bioanode étant polarisée en continu, sa formation monopolise une ligne de potentiostat pendant toute la durée de l'expérience. Il a donc été envisagé de réaliser la première étape de colonisation dans le lixiviat de terreau sans polarisation. Une électrode en tissu de carbone est alors

simplement immergée dans le lixiviat pendant 15 jours sans être connectée à un potentiostat. Aucun potentiel n'est imposé à l'électrode qui est donc laissée au potentiel d'abandon. Un ajout d'acétate est réalisé initialement, un second une semaine après. Après colonisation dans le lixiviat, l'électrode est transférée dans le milieu synthétique pour la seconde étape, suivant deux procédures différentes :

- Dans la procédure dite « Polarisation directe après immersion dans du lixiviat », c'est l'électrode issue du lixiviat de terreau qui est elle-même polarisée dans le milieu synthétique ;
- Dans la procédure « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat », l'électrode issue du lixiviat de terreau est utilisée comme inoculum et c'est une anode vierge ajoutée au système qui est polarisée.

Du point de vue de la pratique quotidienne au laboratoire, cette option a l'avantage de libérer les lignes de potentiostat pendant la première étape de formation de la bioanode. Plus largement, elle pourrait devenir une nouvelle procédure de formation de bioanodes particulièrement intéressante pour échantillonner toutes sortes de milieux naturels. Il suffirait de jeter, d'enfourer ou d'immerger dans n'importe quel environnement, fut-il le plus difficilement accessible, une pièce de tissu, puis de l'utiliser en milieu synthétique au laboratoire directement comme électrode (« Polarisation directe ») ou comme inoculum (« Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat »).

Toutes les expériences sont menées en montage à 3 électrodes. Les différentes conditions expérimentales sont décrites dans le Tableau 13 (dispositif décrit au Chapitre 2).

Tableau 13. Conditions expérimentales des procédures de formation d'une bioanode à partir de l'inoculum lixiviat de terreau.

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS Réacteur : « Standard simple compartiment » 12 réacteurs lancés en parallèle Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 9 \text{ cm}^2$		
Paramètres expérimentaux		
Inoculum : Lixiviat de terreau Milieu propre : Milieu synthétique Remplacement des milieux avec pompe péristaltique sous bullage d'azote	Température : 40°C	Substrat : Acétate batch 20 mM
Techniques électrochimiques		
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$	Voltammétrie cyclique : Aller : OCP → +0.2 V/ECS puis Retour : +0.2 → -0.5 V/ECS	1 mV.s ⁻¹ 3 cycles
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence Calcul de taux de recouvrement du biofilm	Microscopie électronique à balayage (MEB)	
Analyse des populations microbiennes		
Pyroséquençage de l'ANR 16S		

2.3.1.2. Chronoampérométrie (CA)

La procédure « Polarisation complète » forme dans un premier temps une bioanode dans du lixiviat de terreau (ligne 1 du Tableau 12). Cet inoculum a déjà démontré ces capacités à former des biofilms performants et reproductibles (Cercado et coll., 2013; Pocaznoi et coll., 2012). Les chronoampérogrammes des quatre bioanodes montrent des résultats extrêmement reproductibles (Figure 19.A). Le premier pic d'oxydation apparaît après 3 jours. Ensuite, l'établissement progressif du

biofilm électroactif entraîne une augmentation du courant à chaque nouvel ajout de substrat, jusqu'à atteindre entre 20 et 25 A.m⁻². Le développement du biofilm à la surface de l'électrode se traduit également au travers de l'augmentation des rendements faradiques entre le premier et le troisième pic d'oxydation, passant de 6.4 ± 2 % à 42.5 ± 1.9 % (n = 4). Ces rendements faradiques n'atteignent pas 100 %. L'inoculum lixivié de terreau étant un milieu très complexe, il est probable qu'il contienne des accepteurs d'électrons solubles directement en compétition avec la bioanode.

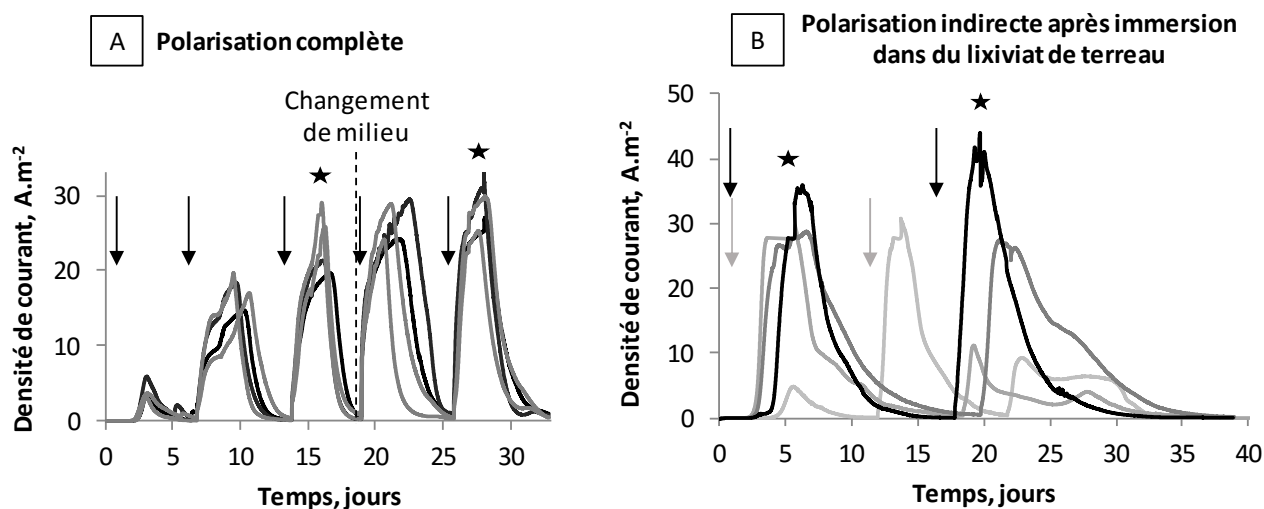


Figure 19. Chronoampérogrammes de bioanodes formées par les procédures (A) « Polarisation complète » dans du lixiviat de terreau puis dans du milieu synthétique, (B) « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat ». Les ajouts d'acétate 20 mM sont représentés par les flèches. Les CVs catalytiques sont réalisées aux temps indiqués par les étoiles.

Le lixiviat de terreau est ensuite remplacé par le milieu synthétique, et la polarisation des bioanodes se poursuit. Les bioanodes ne sont aucunement perturbées par le changement de milieu et la densité de courant croît jusqu'à 27.5 ± 2.5 A.m⁻² (n = 8) pour les quatrièmes et cinquièmes pics cumulés, de la même façon que les rendements faradiques (65.3 ± 15.4 %, n = 8). L'augmentation des densités de courant et des rendements faradiques montrent que le changement du lixiviat de terreau pour le milieu synthétique est favorable aux bioanodes, probablement grâce au réapprovisionnement en vitamines et nutriments nécessaires pour la croissance microbienne. Les rendements faradiques sont plus élevés que dans le lixiviat, mais ils n'atteignent toutefois pas 100 % dans le milieu synthétique alors que celui-ci est en principe exempt d'accepteurs d'électrons solubles. L'acétate pourrait être consommé par des microorganismes planctoniques par voie de respiration aérobie. Il est en effet possible que des traces d'oxygène soient présentes dans le milieu car les réacteurs ne sont pas rigoureusement hermétiques. Environ 20 jours dans le lixiviat de terreau et 10 jours supplémentaires dans le milieu synthétique sont nécessaires pour atteindre les densités de courant maximales suivant cette procédure « Polarisation complète ».

Lorsque l'électrode laissée au potentiel d'abandon dans du lixiviat de terreau pendant quinze jours est ensuite polarisée dans du milieu synthétique (« Polarisation directe après immersion dans du lixiviat », ligne 2 du Tableau 12), les bioanodes délivrent des densités de courant très faibles entre 0.03 et 0.15 A.m⁻² pour les quatre réacteurs étudiés (courbes non présentées).

Lorsque l'électrode laissée au potentiel d'abandon dans le lixiviat est utilisée pour inoculer une électrode vierge polarisée dans du milieu synthétique (« Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat », ligne 3 du Tableau 12), des résultats très intéressants sont obtenus en CA (Figure 19.B).

Des densités de courant de 27 à 35 A.m⁻² sont atteintes dès le premier pic d'oxydation au septième jour pour trois réacteurs. En revanche, un réacteur ne fournit que 6 A.m⁻². Ensuite, les densités de courant au second pic d'oxydation varient entre 10 et 40 A.m⁻². Les rendements faradiques sont de 32.4 ± 17.5 % (n = 4) et 34.7 ± 15.4 % (n = 4) pour le premier et le second pic, respectivement. En dépit des hautes densités de courant atteintes très rapidement par certaines bioanodes, les expériences montrent une dispersion des résultats ainsi que des écart-types des rendements faradiques relativement élevés, confirmant le manque de reproductibilité de cette procédure.

Malgré une première étape similaire dans le lixiviat de terreau, les deux procédures « Polarisation directe - » et « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat » montrent des résultats en CA totalement différents. Pour la première procédure, les densités de courant sont presque nulles alors qu'elles atteignent jusqu'à 35 A.m⁻² pour la seconde. L'hypothèse est la suivante : la colonisation de l'électrode immergée dans le lixiviat de terreau amène à la formation d'un biofilm composé d'une multitude de microorganismes, électroactifs ou non. Lorsque l'électrode est polarisée dans le milieu synthétique, la colonisation préliminaire de la surface aurait concurrencé le développement des bactéries électroactives. En revanche, l'addition d'une électrode propre dans le milieu synthétique aurait fourni une surface libre aux bactéries électroactives qui seraient venues coloniser l'électrode vierge polarisée, libre de toute colonisation préexistante.

2.3.1.3. Voltammétrie cyclique catalytique (CV)

Les voltammétries cycliques (CVs) des bioanodes sont enregistrées à faible vitesse de balayage (1 mV.s⁻¹) aux temps indiqués par les étoiles sur les chronoampérogrammes. Toutes les courbes possèdent une forme générale sigmoïdale proche d'un comportement nernstien. Une analyse plus poussée est réalisée en calculant les dérivées premières de ces CVs. Chaque maximum de la dérivée première correspond à un point d'inflexion sur la CV, qui peut être attribué à un système redox de Nernst (Rimboud et coll., 2014). Les potentiels auxquels des systèmes redox sont identifiés sont indiqués dans le Tableau 14.

Tableau 14. Potentiels des points d'inflexion des voltammétries cycliques catalytiques des bioanodes formées à partir de lixiviat de terreau. n correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écart-types.

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Polarisation complète				
Bioanode après 3 ajouts d'acétate dans du lixiviat (n = 4)	-0.395 ± 0.005	/	-0.318 ± 0.015	-0.198 ± 0.024
Bioanode après 2 ajouts d'acétate dans du milieu synthétique (n = 4)	-0.423 ± 0.008	-0.363 ± 0.008	-0.317 ± 0.012	-0.2 ± 0.007
Polarisation directe après immersion dans du lixiviat de terreau				
Densités de courant trop faibles - pas de CV catalytique				
Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat de terreau				
Bioanode après 2 ajouts d'acétate dans du milieu synthétique (n = 2)	-0.42 ± 0	/	-0.305 ± 0.055	/

Les CVs des bioanodes formées suivant la procédure « Polarisation complète » sont parfaitement reproductibles pour les quatre réacteurs lancés en parallèle. Les CVs obtenues dans le lixiviat de terreau et dans le milieu synthétique se superposent presque (Figure 20.A), ce qui confirme que les bioanodes ne sont pas perturbées par le changement de milieu et conservent leurs performances. Les CVs présentent une forme sigmoïdale avec un pic qui se superpose vers -0.2 V/ECS, déjà observé dans la bibliographie dans le cas de biofilms multi-espèces (Pocaznoi et coll., 2012; Strycharz et coll., 2011). Selon l'étude de Strycharz et coll., ce pic serait dû à une limitation par le transfert d'électron de la cellule vers la matrice du biofilm.

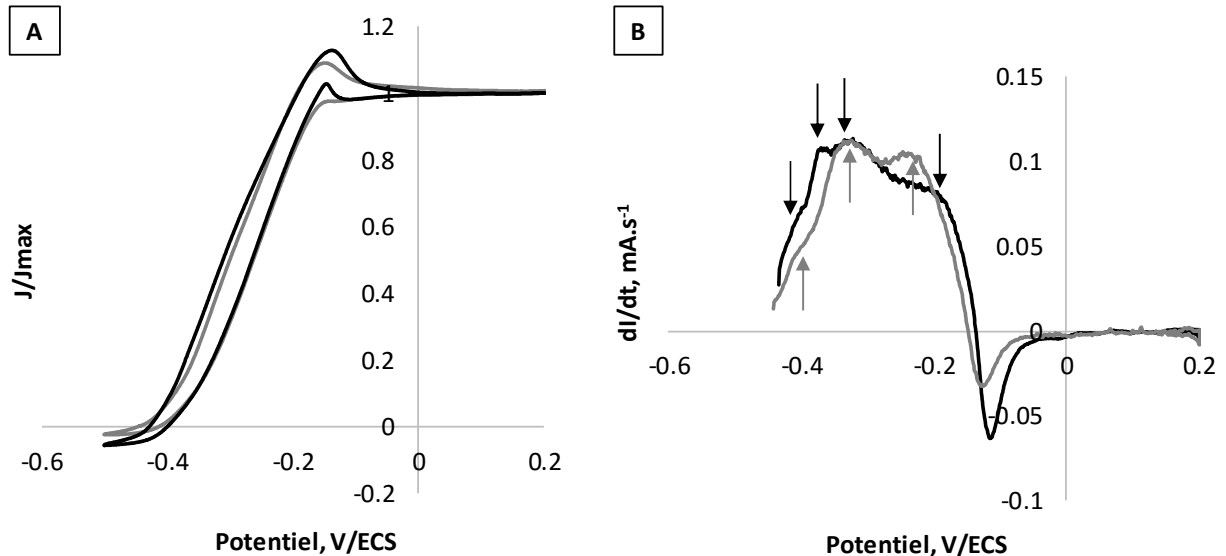


Figure 20. (A) Voltammétries cycliques catalytiques d'une bioanode formée suivant la procédure « Polarisation complète » dans du lixiviat de terreau (courbe grise) et dans du milieu synthétique (courbe noire). (B) Dérivées premières des CVs catalytiques exposées en (A). Les flèches indiquent les maximums correspondant à des points d'inflexion sur les CVs. Ces CVs sont mesurées aux jours 16 et 28 (indiqué par une étoile sur la Figure 19.A).

Les dérivées premières des CVs donnent quatre points d'inflexion pour le milieu synthétique, au lieu de trois pour le lixiviat de terreau (indiqués par des flèches, Figure 20.B). Cette différence est observée pour les quatre réacteurs. Un système redox, qui n'est pas visible dans le lixiviat de terreau, apparaît en milieu synthétique vers -0.36 V/ECS.

La procédure « Polarisation directe après immersion dans le lixiviat » n'ayant pas permis d'obtenir des courants élevés lors de la CA, aucune CV catalytique n'a pu être mesurée. Les CVs non catalytiques n'ont pas fourni davantage d'informations qui auraient permis d'approfondir l'analyse.

Les CVs catalytiques des bioanodes formées selon la procédure « Polarisation indirecte après immersion dans le lixiviat » présentent une allure similaire à celles de la procédure « Polarisation complète », à l'exception du pic superposé vers -0.2 V/ECS qui n'apparaît pas (courbes non présentées). Les dérivées des CVs catalytiques dévoilent la présence de deux points d'inflexion (Tableau 14). Deux systèmes redox sont détectés vers -0.42 V/ECS et -0.3 V/ECS dans le milieu synthétique.

En comparant l'ensemble de ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer les différences observées sur la composition redox des biofilms :

- D'une part, il semble que le milieu réactionnel ait une influence. La présence de certaines vitamines ou nutriments permettraient à certains microorganismes de se développer plus favorablement, ou d'exprimer des systèmes redox différents.
- La présence ou non de polarisation au cours de l'une des étapes de formation des bioanodes pourrait également jouer un rôle, notamment dans la sélection et le développement de bactéries électroactives.
- Toutefois, il serait également possible que des différences soient dues à l'âge des bioanodes. En effet les CVs n'ont pas été enregistrées sur des biofilms du même âge suivant les stratégies suivies. Les biofilms polarisés pendant une période de temps plus longue seraient susceptibles de développer des systèmes redox supplémentaires au cours du temps.

A l'évidence, les biofilms anodiques formés à partir de lixiviat de terreau présentent des caractéristiques biologiques et physico-chimiques tellement complexes que leurs différences de systèmes redox sont probablement le résultat de plusieurs phénomènes couplés.

2.3.1.4. Structure du biofilm

Les bioanodes préparées suivant les procédures « Polarisation directe » et « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat » sont observées par microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 21). Les taux de recouvrement des électrodes par le biofilm, calculés à partir des images obtenues par microscopie à épifluorescence (procédure décrite dans le Chapitre 2), sont renseignés dans le Tableau 15.

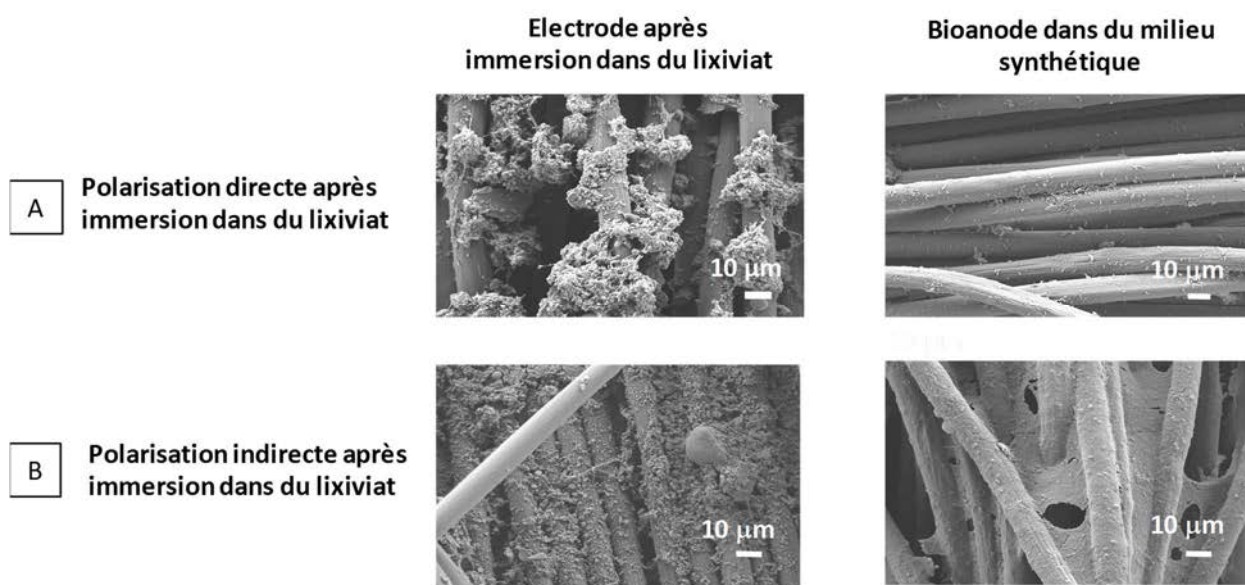


Figure 21. Images MEB (grossissement x1000) des bioanodes obtenues suivant les procédures (A) « Polarisation directe - » et (B) « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat de terreau ».

Tableau 15. Taux de recouvrement par du biofilm des bioanodes formées suivant les procédures « Polarisation directe » et « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat de terreau ». Les taux de recouvrement sont calculés à partir des images obtenues par microscopie à épifluorescence. Pour chaque électrode analysée, 3 spots sont choisis aléatoirement. n correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écart-types.

Polarisation directe après immersion dans du lixiviat	
Electrode après immersion dans du lixiviat (n = 6)	19.8 ± 6.2 %
Bioanode dans du milieu synthétique (n = 6)	11.4 ± 3.7 %
Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat	
Electrode après immersion dans du lixiviat (n = 6)	14.7 ± 3.8 %
Bioanode dans du milieu synthétique (n = 6)	27.2 ± 2.6 %

Intéressons-nous, dans un premier temps, aux électrodes immergées dans le lixiviat et laissées au potentiel d'abandon pendant deux semaines. L'observation MEB montre que toutes ces électrodes présentent un aspect similaire (Figure 21). Elles sont recouvertes d'agrégats de différentes formes et de tailles variables, irrégulièrement répartis sur les fibres du tissu de carbone. Le lixiviat de terreau étant un milieu riche composé de nombreux résidus, il est difficile de conclure quant à la nature de ces agrégats : sont-ils des débris organiques ou sont-ils d'origine microbienne ? Les images obtenues par microscopie à épifluorescence et le calcul des taux de recouvrement confirment qu'il s'agit, au moins pour partie, d'une colonisation microbienne de la surface. Les taux de recouvrement sont de $19.8 \pm 6.2 \%$ (n = 6) pour les électrodes destinées à être utilisées pour la procédure directe et de $14.7 \pm 3.8 \%$ (n = 6) pour les électrodes destinées à être utilisées pour la procédure indirecte. Le biofilm ne s'est pas développé de façon uniforme sur les électrodes. Pour l'ensemble des 4 électrodes immergées dans le lixiviat sans polarisation, en deux lots indépendants, les taux de recouvrement varient de 11% à 25%. Cette dispersion met l'accent sur un aspect négatif commun aux deux procédures « Polarisation directe » et « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat » : la première phase réalisée dans le lixiviat de terreau en l'absence de polarisation ne permet pas d'assurer une bonne reproductibilité des résultats, ce qui se répercute ensuite sur les résultats obtenus en CA.

Polariser directement l'électrode issue du lixiviat de terreau dans le milieu synthétique entraîne une diminution du taux de recouvrement de $19.8 \pm 6.2 \%$ à $11.4 \pm 3.7 \%$ (n = 6). Les images MEB montrent des bioanodes très peu colonisées (Figure 21.A). Les surfaces sont recouvertes de microorganismes dispersés et aucun biofilm uniforme n'est visible. Ces résultats obtenus par MEB et microscopie à épifluorescence corroborent les densités de courant quasi nulles mesurées en CA.

A contrario, utiliser l'électrode immergée dans le lixiviat de terreau pour inoculer une anode vierge polarisée permet d'atteindre des taux de recouvrements de l'ordre de $27.2 \pm 2.6 \%$ (n = 6). Cette fois, les images MEB montrent un biofilm dense et uniforme reliant les fibres du tissu de carbone des bioanodes, et ces observations sont cohérentes avec les hautes densités de courant atteintes en CA (Figure 21.B).

2.3.1.5. Analyse des populations microbiennes

Les communautés microbiennes du lixiviat de terreau utilisé comme inoculum initial sont comparées à celles des bioanodes polarisées dans ce milieu, c'est-à-dire les bioanodes obtenues à l'issue de la première phase de la procédure « Polarisation complète ». Ces bioanodes ont délivré des densités de courant de l'ordre de 20 A.m⁻² en sortie de lixiviat de terreau. Elles n'ont en aucun cas été au contact du milieu synthétique, qui n'est utilisé que pour la seconde étape de la procédure « Polarisation complète ». Les échantillons sont analysés par pyroséquençage de l'ARN 16S (procédure décrite dans le Chapitre 2) (Figure 22).

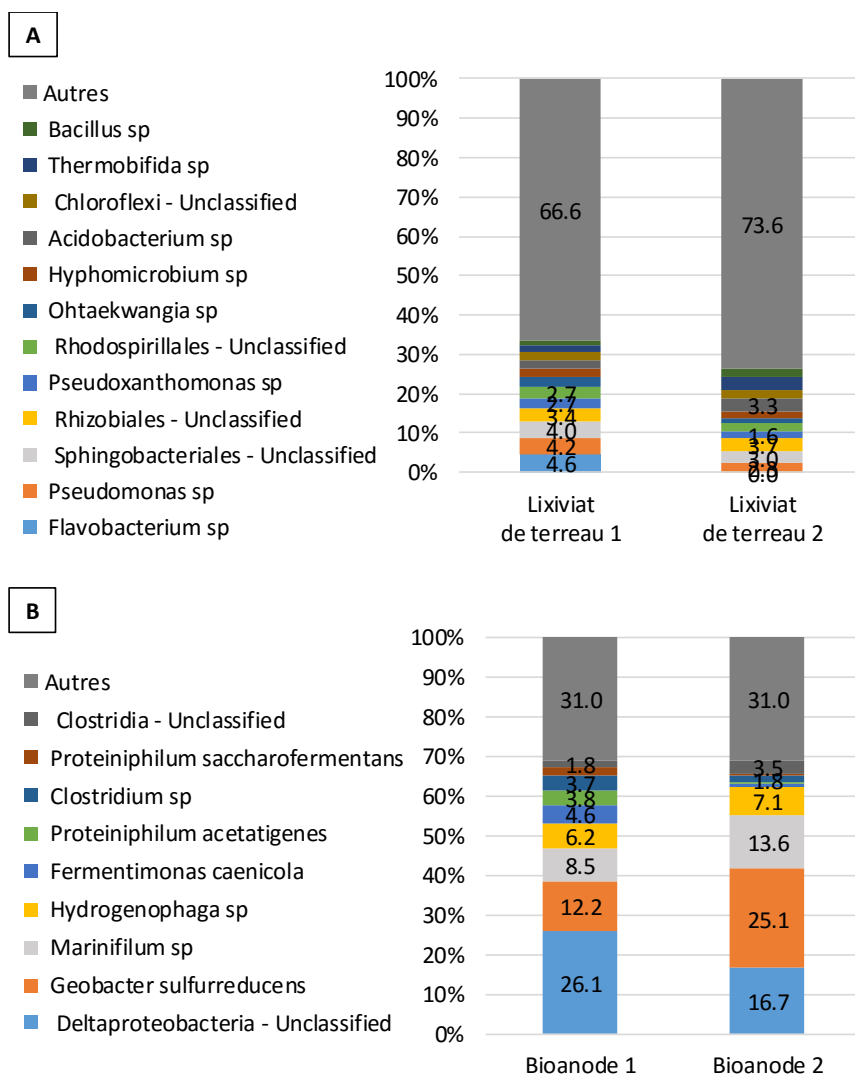


Figure 22. Populations microbiennes en pourcentage des séquences totales identifiées au niveau taxonomique des espèces. (A) Inoculum lixiviat de terreau initial. (B) Bioanodes formées dans du lixiviat de terreau (celles-ci n'ont jamais été au contact du milieu synthétique). Les espèces détectées à un seuil inférieur à 2% sont classifiées « Autres ».

On observe une différence nette entre les communautés microbiennes de l'inoculum (Figure 22.A) et des bioanodes (Figure 22.B). Le lixiviat présente une large variété d'espèces microbiennes. Environ 70 % des espèces qui le composent sont détectées à une proportion inférieure à 2 %. Les communautés microbiennes des bioanodes formées dans le lixiviat sont en revanche significativement plus spécifiques (Figure 22.B). Au moins 60 % de la communauté microbienne est identifiée au niveau de l'espèce. Le point le plus surprenant est qu'aucune des espèces détectées en quantité supérieure à 2%

dans le lixiviat ne se retrouve dans les populations microbiennes des bioanodes. La formation du biofilm induit donc une forte sélection des populations microbiennes.

Les deux bioanodes présentent des résultats très reproductibles. Cinq espèces sont majoritairement détectées en proportion supérieure à 5 %. Ces espèces ne sont même pas détectées dans l'inoculum initial lixiviat de terreau. Certaines ont déjà été identifiées dans des biofilms électroactifs, en particulier *Geobacter sulfurreducens* qui est l'espèce électroactive sans doute la plus souvent rencontrée dans la bibliographie (Bond & Lovley, 2003; Koch & Harnisch, 2016). Une espèce *Hydrogenophaga sp.* a également été détectée dans des communautés microbiennes de biofilms anodiques dans des PCMs nourries avec de l'acétate (Kimura & Okabe, 2013). D'autres espèces, au contraire, telles que *Marinifilum sp.* et *Fermentimonas sp.* n'ont pas encore été, à notre connaissance, identifiées comme dominantes de biofilms électroactifs anodiques. Une proportion élevée d'une Protéobactérie δ est détectée à 26 % et 17 % sur les bioanodes, mais l'espèce n'a pas pu être identifiée.

Evidemment, il aurait été intéressant, et non superflu, de connaître la composition microbienne de bioanodes formées selon la procédure « Polarisation complète » en sortie du milieu synthétique. Ces résultats nous auraient permis de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle le milieu synthétique joue effectivement un rôle sur les communautés microbiennes des biofilms. Ces analyses par pyroséquençage, pourtant à la base de cette étude, n'ont malheureusement pas pu être effectuées au cours de ces travaux de thèse car l'analyse des échantillons envoyés au laboratoire RTLab aux Etats-Unis a donné des résultats aberrants inutilisables.

2.3.1.6. Conclusion

En conclusion de ce volet n°1 consacré au passage du lixiviat de terreau au milieu synthétique, on peut retenir ces points principaux :

- La procédure « Polarisation complète » permet de former les bioanodes les plus performantes produisant des densités de courant jusqu'à 30 A.m⁻² et de la façon la plus reproductible. Elle a donc été retenue comme procédure de référence pour former les bioanodes à partir du lixiviat de terreau.
- La procédure « Polarisation directe après immersion dans du lixiviat » entraîne une absence totale de courant ; la procédure « Polarisation indirecte après immersion dans du lixiviat » peut donner des bioanodes efficaces, mais n'assure pas la reproductibilité des performances.
- Les électrodes laissées au potentiel d'abandon dans le lixiviat ne présentent qu'une colonisation partielle. Par ailleurs, l'absence de polarisation au cours de cette étape ne permet pas d'assurer une reproductibilité des résultats.
- La méthode de « Polarisation complète » induit une forte sélection des populations microbiennes puisqu'aucune des 5 espèces dominantes des bioanodes n'étaient significativement détectables dans la communauté microbienne de l'inoculum.

2.3.2. Volet n°2 : De la bioanode primaire à la bioanode secondaire

2.3.2.1. Description des procédures

Le second volet de l'étude cherche à reproduire, voire à optimiser, une bioanode en la repiquant. Une bioanode déjà formée, dite bioanode « primaire », est utilisée comme inoculum pour former une nouvelle génération de bioanode, dite « secondaire ». Cette méthode proposée par Liu et coll. a montré sa capacité à former un biofilm électroactif secondaire plus rapidement que le biofilm primaire (Y. Liu et coll., 2008). Ici, l'intention est double : valoriser une bioanode déjà formée qui sert d'inoculum pour former plusieurs bioanodes secondaires et gagner du temps sur la formation. Au sein du LGC, cette méthode a déjà donné des résultats probants avec des bioanodes élaborées à partir de boues activées (Blanchet Belkhodja, 2016) mais elle n'a jamais été testée avec le lixiviat de terreau.

Des trois stratégies décrites ci-dessus pour former les bioanodes, c'est celle appelée « Polarisation complète » qui s'avère la plus efficace. C'est donc cette méthode qui est choisie pour former les bioanodes primaires. Lorsque la bioanode primaire donne des densités de courant stables, le milieu synthétique est remplacé par un milieu synthétique frais, et une anode vierge est plongée dans le réacteur. Deux procédures sont alors testées pour former la bioanode secondaire (Tableau 16) :

- Seule la bioanode secondaire est polarisée alors que la bioanode primaire est laissée au potentiel d'abandon.
- Les deux bioanodes primaire et secondaire sont polarisées simultanément.

Toutes les expériences sont menées en montage à 3 électrodes avec les conditions expérimentales décrites dans le Tableau 17 (dispositifs décrits au Chapitre 2).

Tableau 16. Procédures de formation d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire.


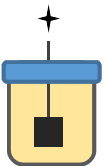


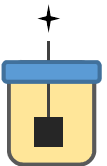

	Formation de la bioanode primaire à partir de lixiviat de terreau		Formation de la bioanode secondaire	Nombres d'expériences
	Lixiviat de terreau	Milieu synthétique	Milieu synthétique frais	
Uniquement bioanode secondaire polarisée				4 réacteurs 4 électrodes analysées : - 2 bioanodes primaires non polarisées - 2 bioanodes secondaires polarisées
Bioanodes primaire et secondaire polarisées				2 réacteurs 4 électrodes analysées : - 2 bioanodes primaires polarisées - 2 bioanodes secondaires polarisées

Tableau 17. Conditions expérimentales des procédures de formation d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire.

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS		
Réacteur : « Standard simple compartiment »		
6 réacteurs mesurés en parallèle		
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 9 \text{ cm}^2$		
Paramètres expérimentaux		
Inoculum : Lixiviat de terreau	Température : 40°C	Substrat : Acétate batch 20 mM
Milieu propre : Milieu synthétique		
Remplacement des milieux avec pompe péristaltique sous bullage d'azote		
Techniques électrochimiques		
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$	Voltammétrie cyclique : 1 mV.s^{-1}	3 cycles
	Aller : OCP → +0.2 V/ECS puis Retour : +0.2 → -0.5 V/ECS	
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence	Microscopie électronique à balayage (MEB)	
Calcul de taux de recouvrement du biofilm		
Analyse des populations microbiennes		
Pyroséquençage de l'ANR 16S		

2.3.2.2. Chronoampérométrie (CA)

Les bioanodes primaires, formées suivant la procédure « Polarisation complète » présentée dans le volet précédent, présentent des chronoampérogrammes similaires à ceux de la Figure 19.A de la partie 2.3.1.2, avec des densités de courant variant entre 15 et 30 A.m^{-2} au second pic d'oxydation dans le milieu synthétique (courbes non présentées dans cette partie). A ce stade, le milieu synthétique est alors remplacé par du milieu frais et une anode vierge est plongée dans le réacteur.

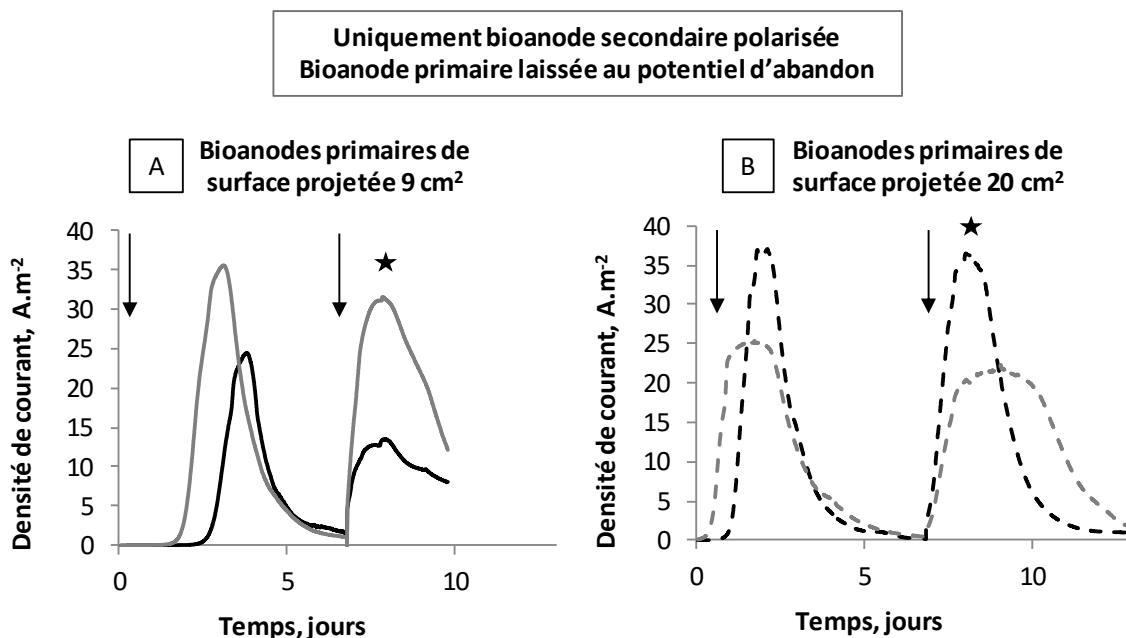


Figure 23. Chronoampérogrammes obtenus pour la formation d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire dans le cas où seule la bioanode secondaire est polarisée alors que la bioanode primaire est laissée au potentiel d'abandon. La bioanode primaire a une surface projetée (A) de 9 cm^2 (lignes pleines) ou (B) de 20 cm^2 (lignes pointillées). La bioanode secondaire a toujours une surface projetée de 9 cm^2 . Les ajouts d'acétate 20 mM sont représentés par les flèches. Les CVs catalytiques des anodes secondaires uniquement sont enregistrées aux temps indiqués par les étoiles.

Lorsque seule la bioanode secondaire est polarisée, alors que la bioanode primaire est laissée au potentiel d'abandon (ligne 1 du Tableau 16), le premier pic d'oxydation de la bioanode secondaire se forme au bout de quelques jours et produit des densités de courant élevées ($27.4 \pm 5.2 \text{ A.m}^{-2}$, $n = 4$) (Figure 23). La taille de la bioanode primaire a une influence sur le temps de formation de la bioanode secondaire. Une bioanode primaire de 9 cm^2 (Figure 23.A) permet au biofilm secondaire de se former en 1.5 à 3 jours, alors que moins de 1 jour est nécessaire avec une bioanode primaire 20 cm^2 pour obtenir le premier pic d'oxydation assurant les mêmes densités de courant (Figure 23.B). Augmenter la surface de la bioanode primaire, et donc la quantité d'inoculum, permet de réduire le temps de formation du biofilm secondaire. Par contre, ce paramètre n'a aucun impact sur les performances délivrées par la bioanode secondaire. Au second pic d'oxydation, les densités de courant diminuent légèrement ($23.2 \pm 7.9 \text{ A.m}^{-2}$, $n = 4$) et varient de 13 A.m^{-2} à 35 A.m^{-2} . Les rendements faradiques sont de $37.2 \pm 9.7 \%$ ($n = 4$) et $39.4 \pm 14.9 \%$ ($n = 4$) pour le premier et le second pic, respectivement.

Des résultats très intéressants sont obtenus par cette procédure. Tout d'abord, la méthode de formation d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire est validée. Des bioanodes secondaires qui délivrent des densités de courant élevées, jusqu'à 35 A.m^{-2} , sont formées en seulement 3 jours. Il faut cependant remarquer le manque de reproductibilité des résultats, marqué par la disparité des chronoampérogrammes et les valeurs relativement élevées des écart-types des rendements faradiques. On peut supposer que le manque de reproductibilité, de la même façon que pour les procédures décrites dans le volet précédent, soit causé par l'absence de polarisation de la bioanode primaire. C'est ce que nous avons vérifié avec la procédure suivante.

Le montage expérimental Nstat (décrit dans le Chapitre 2) permet de polariser simultanément les deux bioanodes primaire et secondaire, et d'enregistrer les performances de chacune de manière indépendante, c'est-à-dire en dissociant la contribution en courant de chaque électrode (Figure 24). Les tests sont tous effectués avec des bioanodes primaires et secondaire de même surface projetée de 9 cm^2 .

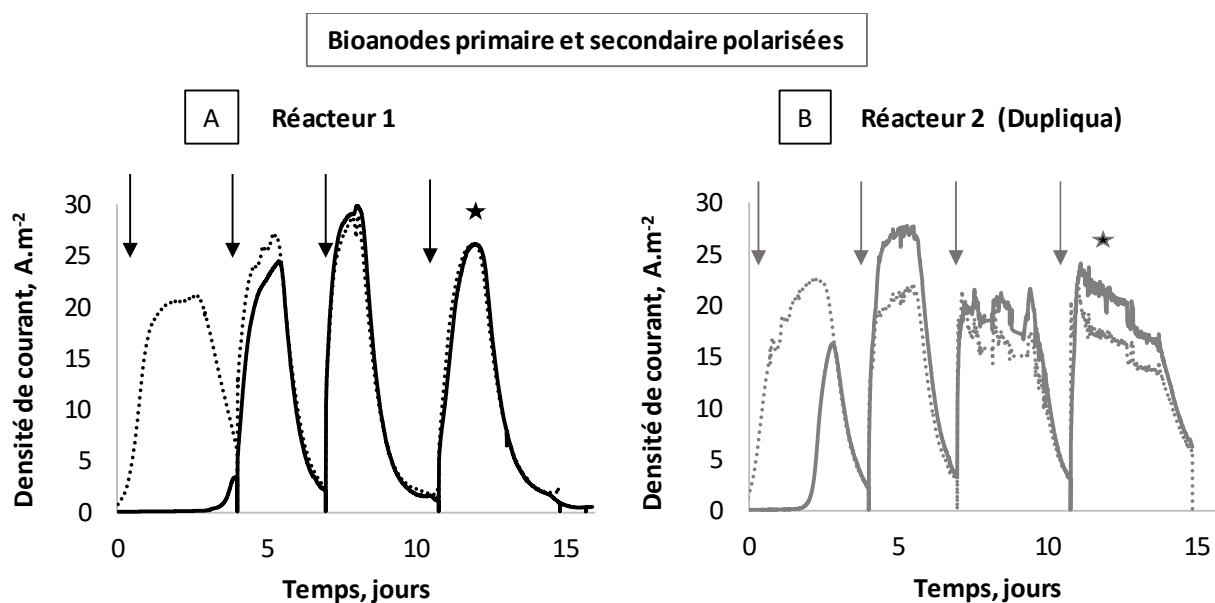


Figure 24. Chronoampérogrammes obtenus pour la formation d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire dans le cas où les deux bioanodes primaire et secondaire sont polarisées. (A) Réacteur 1 et (B) réacteur 2 - dupliqua. Les lignes pointillées correspondent aux bioanodes primaires et les lignes pleines aux bioanodes secondaires. Les deux bioanodes ont la même surface projetée de 9 cm^2 . Les ajouts d'acétate 20 mM sont représentés par les flèches. Les CVs catalytiques sont enregistrées aux temps indiqués par les étoiles.

Les bioanodes primaires (lignes pointillées, Figure 24) délivrent des densités de courant élevées d'environ 20 A.m⁻² quelques heures seulement après le changement de milieu synthétique et l'insertion de l'électrode vierge. Ce résultat indique, une fois de plus, que le changement du milieu synthétique usé pour un milieu frais n'a aucunement perturbé les bioanodes primaires qui conservent leurs performances. La colonisation de la bioanode secondaire s'observe au bout de 2 à 4 jours, de manière évidente pour une bioanode dont le premier pic d'oxydation atteint 15 A.m⁻² (ligne grise pleine, Figure 24.B), et de façon un peu plus timide pour le dupliqua avec seulement 4 A.m⁻² (ligne noire pleine, Figure 24.A). Toutefois, cet écart s'estompe rapidement et le second ajout d'acétate permet d'augmenter considérablement les performances des bioanodes secondaires qui atteignent des densités de courant égales, voire même supérieures, à celles des bioanodes primaires. Les rendements faradiques pour les bioanodes secondaires passent de 7 ± 6 % (n = 2) au premier pic à 41.6 ± 6.7 % (n = 6) sur les trois pics suivants. Ceux calculés pour les bioanodes primaires tout au long de l'expérience sont de 40.2 ± 4 % (n = 8). Les performances des bioanodes primaires et secondaires restent stables les jours suivants. Cette procédure combine des densités de courant élevées avec la reproductibilité des résultats. Comme anticipé à la fin de la section précédente, il est maintenant possible de conclure que la polarisation de la bioanode primaire est nécessaire pour assurer la reproductibilité des résultats.

2.3.2.3. Voltammétrie cyclique catalytique (CV)

Les voltammétries cycliques (CVs) catalytiques des bioanodes polarisées sont tracées à faible vitesse de balayage (1 mV.s⁻¹) aux temps indiqués par les étoiles sur les chronoampérogrammes. Les CVs des bioanodes, qu'elles soient primaires ou secondaires, présentent toutes une allure caractéristique d'un comportement nernstien. Les dérivées premières des CVs catalytiques donnent les potentiels des points d'inflexion qui sont reportés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Potentiels des points d'inflexion des voltammétries cycliques catalytiques des bioanodes secondaires formées à partir de bioanodes primaires. Le signe « / » signifie qu'aucun point d'inflexion n'est détecté au potentiel indiqué.

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅
Uniquement bioanode secondaire polarisée - bioanode primaire laissée au potentiel d'abandon					
Bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire de 9 cm ² (n = 2)	-0.42 ± 0.01	-0.35 ± 0.02	-0.265 ± 0.005	-0.185 ± 0.005	/
Bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire de 20 cm ² (n = 2)	-0.405 ± 0.005	-0.365 ± 0.005	-0.305 ± 0.005	-0.188 ± 0.002	/
Les deux bioanodes primaire et secondaire polarisées					
Bioanode primaire 1	/	/	-0.32	-0.23	-0.03
Bioanode secondaire 1	/	/	-0.32	-0.21	-0.08
Bioanode primaire 2 (dupliqua)	/	-0.36	/	-0.18	/
Bioanode secondaire 2 (dupliqua)	/	-0.37	/	/	/

Lorsqu'uniquement la bioanode secondaire est polarisée, quelle que soit la surface de la bioanode primaire (9 ou 20 cm²), les CVs des bioanodes secondaires sont similaires (courbes non présentées). Sur les quatre bioanodes étudiées, une seule présente le pic superposé décrit dans le volet précédent (Figure 20). Les dérivées premières présentent quatre maximums attribués à quatre systèmes redox (Tableau 18).

Lorsque les deux bioanodes primaire et secondaire sont polarisées, les CVs catalytiques de la bioanode primaire et secondaire correspondante sont semblables. Si le pic superposé est présent sur la CV de la bioanode primaire, alors il l'est également sur celle de la bioanode secondaire (Figure 25.B). Inversement, s'il n'est pas présent pour la bioanode primaire alors il ne l'est pas non plus pour la bioanode secondaire (Figure 25.A). Les pentes des CVs des bioanodes secondaires sont systématiquement légèrement supérieures à celles des bioanodes primaires (lignes pleines, Figure 25) caractéristique d'un transfert d'électrons plus efficace. A un courant donné, une surtension plus importante doit être apportée aux bioanodes primaires pour compenser la lenteur du transfert de charge.

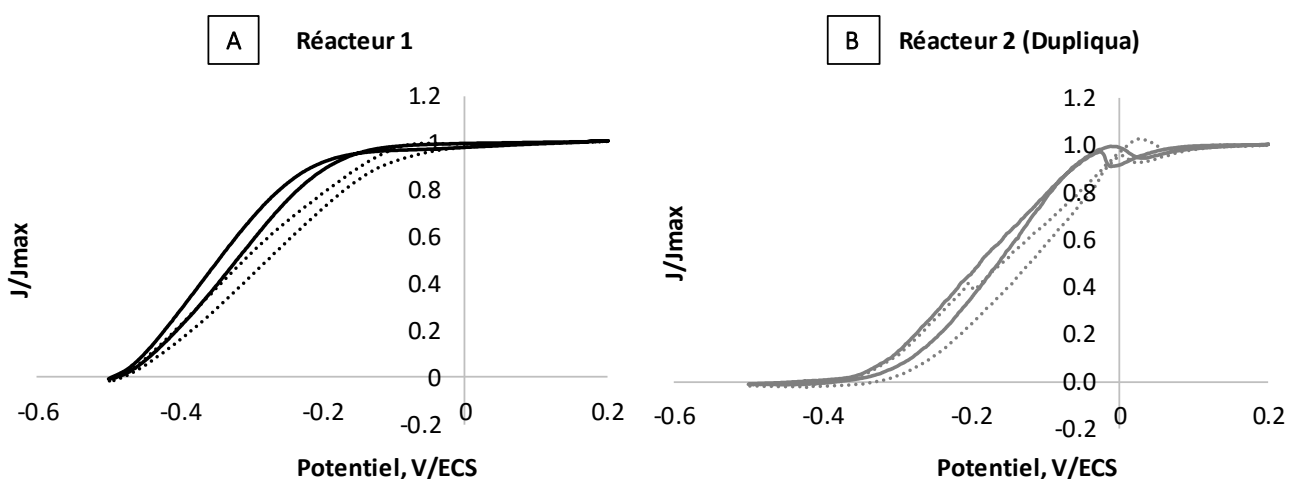


Figure 25. Voltammétries cycliques catalytiques des bioanodes primaires (lignes pointillées) et secondaires (lignes pleines) lorsque les deux bioanodes sont polarisées. Ces CVs sont mesurées au jour 12 (indiqué par une étoile sur la Figure 23.B). (A) Réacteur 1 et (B) Réacteur 2 (dupliqua).

Les potentiels des systèmes redox sont si différents d'un réacteur à l'autre qu'il n'a pas été possible de les regrouper en une seule ligne dans le Tableau 18. Dans le cas du réacteur 1, trois systèmes redox sont détectés à des valeurs de potentiels similaires pour les deux bioanodes primaire et secondaire. En revanche, pour le réacteur 2 (dupliqua), la bioanode primaire présente deux systèmes redox, alors que la bioanode secondaire n'en présente qu'un seul. Aucune conclusion simple ne peut être tirée concernant le nombre de systèmes redox impliqués dans les biofilms. Ce résultat nous paraît d'ailleurs d'autant plus surprenant que les deux bioanodes sont polarisées et donc formées dans des conditions électrochimiques contrôlées. Peut-être faut-il voir là un effet de la richesse microbienne de l'inoculum de départ qui permet de former divers types de bioanodes et, pour terminer sur une note optimiste, que des systèmes redox différents peuvent conduire à des bioanodes également efficaces.

2.3.2.4. Structure du biofilm

Pour les deux procédures, les bioanodes en fin d'expérience sont observées par microscopie électronique à balayage (Figure 26). Que les bioanodes primaires aient été polarisées ou non, celles-ci présentent dans les deux cas un biofilm uniforme et très compact en surface qui masque la presque totalité des fibres de carbone de l'électrode (images de gauche, Figure 26). Un grossissement plus important (x250) permet de visualiser l'homogénéité du biofilm qui relie les fibres entre elles. La formation d'un biofilm uniforme sur toute la surface est cohérente avec l'âge assez important des bioanodes. Ces bioanodes ont été formées sous polarisation pendant une trentaine de jours puis ont servi d'inoculum, toujours sous polarisation, pour former des bioanodes secondaires. Elles ont donc été polarisées pendant environ 6 semaines laissant au biofilm tout le temps nécessaire pour se développer sur toute la surface.

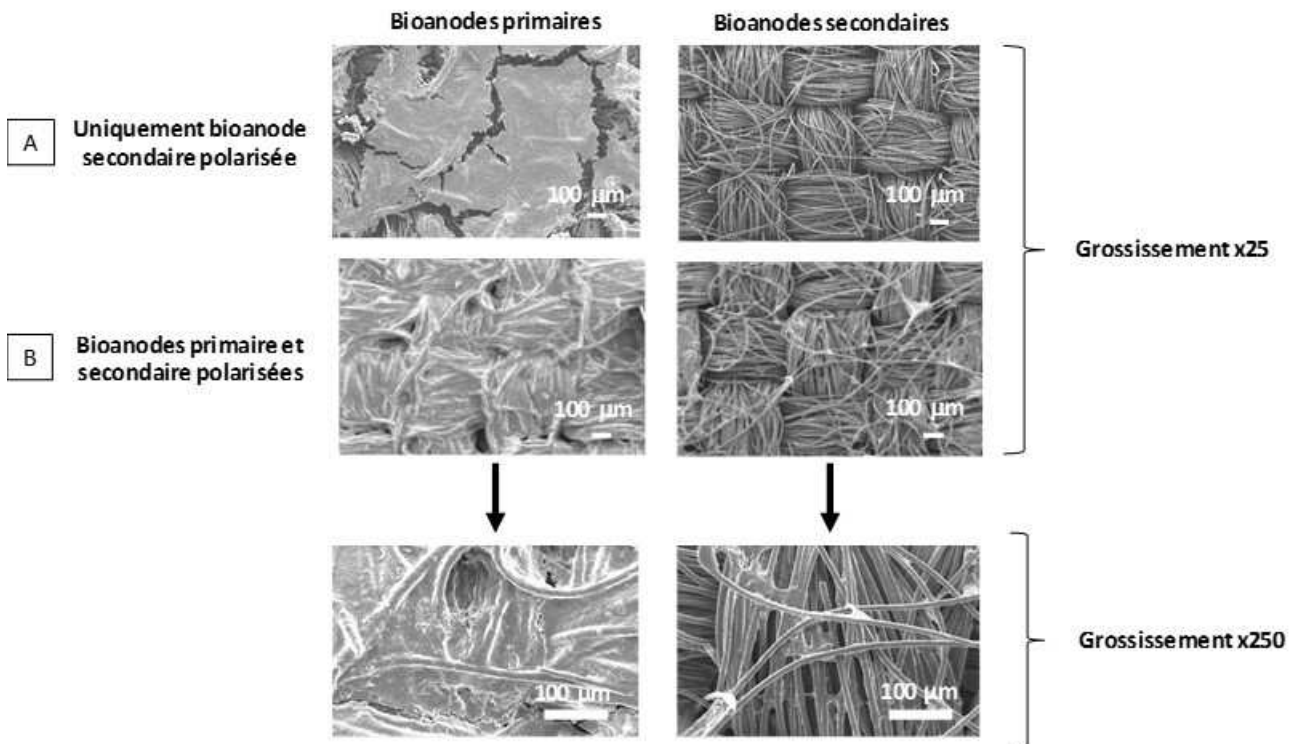


Figure 26. Images MEB des bioanodes primaires (gauche) et secondaires (droite) des procédures (A) uniquement la bioanode secondaire est polarisée et la bioanode primaire est laissée en circuit-ouvert, (B) les deux bioanodes primaire et secondaire sont polarisées.

A contrario, les images MEB au grossissement x25 des bioanodes secondaires pourraient laisser penser qu'aucun biofilm ne s'est développé sur les électrodes, dont les fibres du tissu de carbone restent parfaitement visibles (images de droite, Figure 26). Cependant, le grossissement x250 permet de constater que le biofilm est bien présent et qu'il s'est développé de sorte à gagner chacune des fibres du tissu, assurant ainsi une structure beaucoup plus aérée que celle des bioanodes primaires. Les biofilms secondaires sont relativement « jeunes » comparés aux biofilms primaires puisqu'ils sont observés, en fin d'expérience, après quinze jours seulement de polarisation dans du milieu synthétique.

Il n'est donc pas possible de conclure si la dissemblance de colonisation entre bioanodes primaires et secondaires est due au statut de l'électrode ou simplement à son âge. Pour trancher il faudrait développer des bioanodes secondaires du même âge que les bioanodes primaires. Nous n'avons pas entrepris d'expérimentation dans ce sens afin de ne pas nous écarter de l'axe de ce chapitre consacré

à l'optimisation des procédures de formation des bioanodes plutôt qu'à l'étude des mécanismes de formation.

Ces observations MEB peuvent être corrélées à l'analyse des CVs catalytiques (Figure 25). Les bioanodes secondaires, dont les biofilms présentent une structure aérée, possèdent des capacités catalytiques supérieures à celles des bioanodes primaires, dont le biofilm est beaucoup plus compact. On peut supposer que la structure aérée facilite le transfert de matière au sein de la matrice cellulaire, et permet par exemple un meilleur apport en nutriments et/ou la minimisation de l'acidification locale du biofilm (cf. Chapitre 1), simplement du fait de sa plus faible épaisseur ou grâce à un transfert plus efficace d'espèces à effet tampon.

La procédure consistant à polariser les bioanodes primaire et secondaire ayant donné les résultats les plus reproductibles, les bioanodes sont observées par microscopie à épifluorescence. Les taux de recouvrement par le biofilm qui en sont extraits sont reportés dans le Tableau 19.

Tableau 19. Taux de recouvrement par le biofilm des bioanodes primaires et secondaires lorsque les électrodes primaire et secondaire sont polarisées. Pour chaque échantillon, trois spots choisis aléatoirement sont observés et analysés pour déterminer le taux de recouvrement moyen. n correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écart-types.

	Réacteur 1	Réacteur 2 (dupliqua)
Bioanodes primaires (n = 3)	55.6 ± 1.2 %	63.6 ± 4.1 %
Bioanodes secondaires (n = 3)	12.4 ± 1.4 %	13.3 ± 0.7 %

La détermination des taux de recouvrement corrobore les observations réalisées par MEB. Les bioanodes primaires présentent des taux de recouvrement significativement supérieurs à ceux des bioanodes secondaires (environ 60 % et 13 % pour les bioanodes primaires et secondaires, respectivement). Les faibles valeurs des écart-types obtenues en effectuant les calculs sur trois spots choisis aléatoirement montrent que la polarisation des électrodes assure une bonne uniformité des biofilms (excepté pour la bioanode primaire 2).

2.3.2.5. Analyse des populations microbiennes

Nous avons vu dans la partie 2.3.1.5 que la polarisation induit une forte sélectivité des populations microbiennes qui composent les bioanodes. Pour compléter cette étude, les communautés microbiennes des bioanodes primaires non polarisées et secondaires polarisées sont analysées par pyroséquençage de l'ARN 16S (Figure 27).

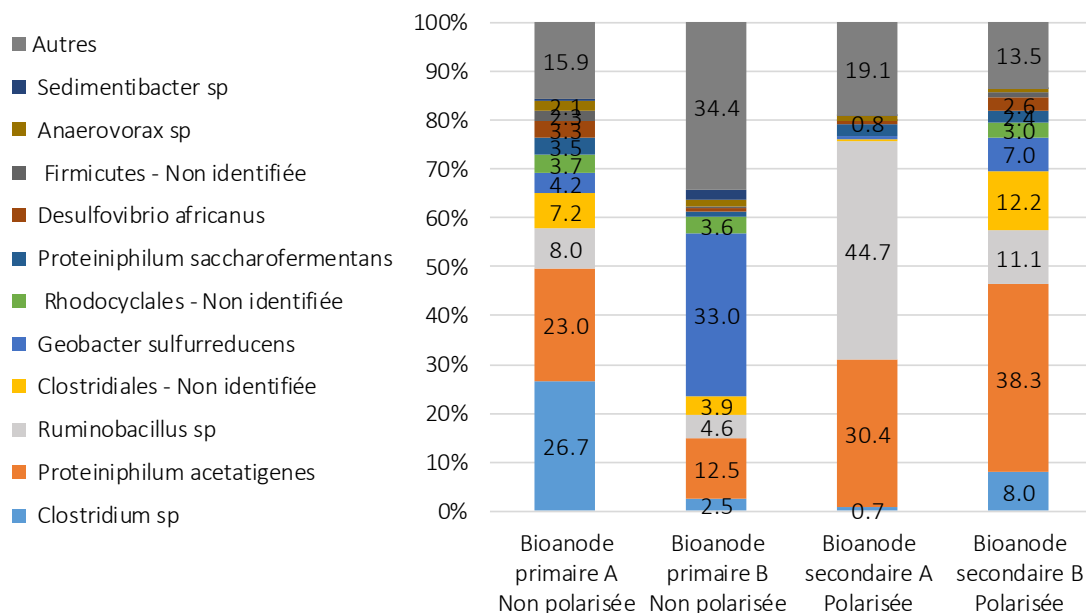


Figure 27. Populations microbiennes en pourcentage des séquences totales identifiées au niveau taxonomique des espèces pour des bioanodes primaires servant d'inoculum non-polarisé et les bioanodes secondaires correspondantes. Les espèces détectées à un seuil inférieur à 2% sont classifiées dans « Autres ».

Sans grande surprise, les résultats du pyroséquençage montrent que les bioanodes, qu'elles soient primaires ou secondaires, présentent une forte sélection microbienne comparées à l'inoculum initial lixiviat de terreau présenté dans le volet précédent (Figure 22.A). Des différences entre les populations microbiennes des bioanodes primaires (non polarisées) et celles des bioanodes secondaires (polarisées) sont observées. Les duplicatas ne sont pas totalement reproductibles mais présentent toutefois des tendances similaires. Cinq espèces sont majoritairement détectées sur les quatre bioanodes analysées.

Le résultat le plus surprenant est la présence significative de l'espèce *Proteiniophilum acetatigenes*. La proportion de *Proteiniophilum acetatigenes* augmente lors du passage des bioanodes primaires aux bioanodes secondaires (24 % et 67 % d'augmentation pour les réacteurs A et B, respectivement). Cette espèce est bien connue dans le domaine du traitement des eaux usées (S. Y. Chen & Dong, 2005; Larsen et coll., 2009) mais beaucoup moins dans le domaine des PCMs. Le genre *Proteiniophilum* a déjà été trouvé dans la communauté microbienne de biocathodes (L. Zhang et coll., 2016) mais jamais dans des bioanodes, en tout cas pas dans des proportions aussi importantes. Par ailleurs, ni cette espèce *Proteiniophilum acetatigenes* ni le genre *Proteiniophilum* ne sont détectés dans le lixiviat de terreau initial (Figure 22.A). En revanche, *Proteiniophilum acetatigenes* est identifié sur une des bioanodes polarisées dans du lixiviat de terreau mais seulement en très faible proportion (4 %) (Figure 22.B). D'une part, il semblerait que le développement de cette espèce soit favorisé par la polarisation puisqu'elle se retrouve en plus grande quantité sur les bioanodes secondaires polarisées. D'autre part, le fait de la retrouver en plus grande proportion sur des bioanodes primaires et secondaires ayant été formées dans du milieu synthétique suggère qu'elle pourrait également être sélectionnée par ce milieu. Ces hypothèses pourraient être tranchées en ayant accès à la composition microbienne de bioanodes en sortie de milieu synthétique, mais ces données ne sont malheureusement pas accessibles, car l'analyse de ces bioanodes n'a conduit qu'à des résultats aberrants dont nous n'avons pas réussi à expliquer l'origine.

L'espèce *Ruminobacillus sp.* n'est pas détectée dans le lixiviat de terreau initial ni sur les bioanodes polarisées dans le lixiviat (Figure 22). Elle se retrouve pourtant sur les quatre bioanodes analysées ici. De plus, sa proportion augmente des bioanodes primaires aux bioanodes secondaires (82 % et 59 %

d'augmentation pour les réacteurs A et B, respectivement). Elle est significativement présente sur la bioanode secondaire B (11 %) et majoritaire sur la bioanode secondaire A (45%). Des hypothèses identiques aux précédentes peuvent être proposées pour *Ruminobacillus sp.*

L'électroactivité de l'espèce *Geobacter sulfurreducens* est abondamment décrite dans la bibliographie. Étonnamment, la présence de cette espèce sur les bioanodes secondaires ne dépasse pas 7 % alors qu'elle est pourtant présente en plus ou moins grande proportion sur les bioanodes primaires (4 % et 33 % pour A et B, respectivement).

L'espèce *Clostridium sp.* est majoritairement présente sur la bioanode primaire A mais relativement peu sur les trois autres bioanodes. Une espèce non identifiée de l'ordre *Clostridiales* disparaît entre bioanode primaire A et bioanode secondaire A, mais augmente en pourcentage entre bioanode primaire B et secondaire B. Aucune conclusion ne peut vraiment être tirée de cette observation. Il peut seulement être relevé que certaines espèces du groupe *Clostridium* ont déjà été repérées dans les populations microbiennes de PCMs (Michaelidou et coll., 2011; Rabaey et coll., 2004), dont certaines espèces possèderaient des capacités électroactives (Park et coll., 2001).

Ces résultats de pyroséquençage sont à rapprocher des analyses effectuées dans la partie 3 du Chapitre 5. Des espèces similaires à celles détectées ici sont identifiées sur des bioanodes pourtant formées à partir d'un échantillon de lixiviat de terreau totalement différent. Ces similarités laissent penser que les résultats obtenus sont caractéristiques de l'inoculum lixiviat de terreau, avec peut-être un effet supplémentaire induit par le milieu synthétique utilisé dans ces études.

2.3.2.6. Conclusion

Les principaux résultats à retenir de ce volet n°2 consacré au repiquage d'une bioanode secondaire à partir d'une bioanode primaire sont les suivants :

- Former une génération de bioanodes secondaires à partir d'une bioanode primaire est plus efficace et plus reproductible lorsque les deux électrodes sont polarisées ; les bioanodes secondaires ont des performances similaires à celles des bioanodes primaires au bout de seulement 5 jours de polarisation.
- Le passage des bioanodes primaires aux bioanodes secondaires s'accompagne d'une sélection accrue de certaines espèces microbiennes. Une augmentation du pourcentage en *Proteiniphilum acetatigenes* et *Ruminobacillus sp.* est observée. Ces espèces ne sont pourtant pas connues pour leur électroactivité et ne sont pas souvent identifiées dans la bibliographie parmi les espèces dominantes des biofilms électroactifs. Plus surprenant, les bioanodes secondaires révèlent une diminution du pourcentage de l'espèce *Geobacter sulfurreducens*, alors que c'est une espèce modèle connue pour de remarquables propriétés électroactives.

2.4. Effet du mode d'alimentation en substrat

L'acétate est le substrat par excellence dans le domaine des PCMs (Pant et coll., 2010; Rimboud et coll., 2014; H. Wang & Ren, 2013). Il est utilisé comme donneur d'électrons par de nombreux microorganismes et convient très bien à ceux présents dans le terreau (Cercado et coll., 2013; Pocaznoi et coll., 2012). Des travaux antérieurs ont établi qu'une concentration supérieure à environ 50 mM d'acétate pouvait inhiber le métabolisme des enzymes catalysant l'oxydation de l'acétate (Pocaznoi et coll., 2012). Une concentration de 20 mM d'acétate est donc choisie pour la majorité des expériences présentées dans ce manuscrit.

Il a été démontré au LGC que des bioanodes formées à partir de sédiments de marais salants atteignent plus rapidement leurs performances maximales lorsque la concentration en acétate est maintenue constante. Ce mode opératoire est donc repris ici avec les bioanodes issues de lixiviat de terreau. Jusqu'à présent, les bioanodes étaient formées avec des batchs successifs d'acétate. Lorsque la densité de courant retombait vers zéro, un nouvel ajout d'acétate était effectué. Cette procédure conventionnelle est comparée ici au mode opératoire dit « acétate maintenu ». Dans ce cas, la concentration d'acétate dans le réacteur est mesurée périodiquement et réajustée à sa valeur maximale de 20 mM.

Quatre bioanodes sont développées dans un dispositif à 3 électrodes dans les conditions expérimentales reportées dans le Tableau 20 (dispositif décrit au Chapitre 2). Deux d'entre elles sont traitées par batch, c'est-à-dire qu'un ajout d'acétate 20 mM est réalisé lorsque le courant d'oxydation est retombé proche de 0 A.m⁻² (Figure 28, lignes pointillées). Pour les deux autres, la concentration en acétate dans le réacteur est maintenue à 20 mM (Figure 28, lignes pleines). A chaque début de diminution de la densité de courant, un échantillon du milieu est prélevé, l'acétate est dosé grâce à un kit enzymatique (décrit dans le Chapitre 2) et sa concentration ajustée à 20 mM par ajout d'une solution à 2 M.

Tableau 20. Conditions expérimentales pour comparer les modes d'ajout de l'acétate.

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS		
Réacteur : « Standard simple compartiment »		
4 bioanodes formées : 2 par mode d'alimentation en substrat		
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 9 \text{ cm}^2$		
Paramètres expérimentaux		
Inoculum : Lixiviat de terreau	Température : 40°C	Substrat : Acétate 20 mM batch ou maintenu
Technique électrochimique		
Chronoampérométrie : E = -0.2 V/ECS		

Les bioanodes formées en conditions d'acétate maintenu produisent des densités de courant significativement plus importantes et en un temps réduit par rapport à celles formées en condition d'acétate batch (Figure 28). Trois jours suffisent en acétate maintenu pour atteindre 10 A.m⁻² alors que les bioanodes du même âge produisent seulement 3 A.m⁻² en acétate batch. Même au-delà de 15 jours de polarisation, les bioanodes formées en acétate batch n'arrivent toujours pas à surpasser les performances des bioanodes en acétate maintenu.

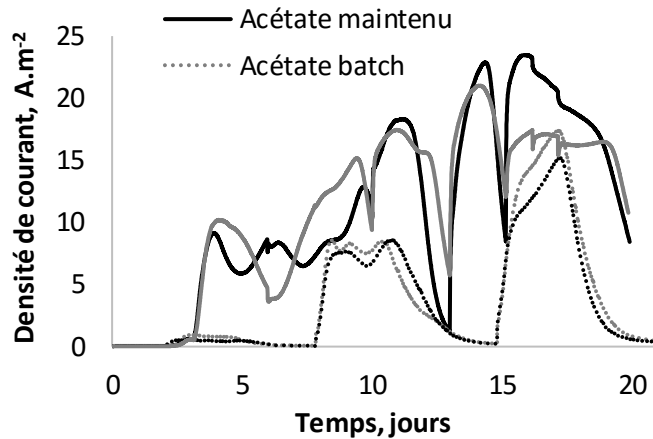


Figure 28. Evolution de la densité de courant anodique pour 4 bioanodes formées en conditions d'acétate maintenu (ligne pleine) et d'acétate batch (ligne pointillée).

Le mode d'alimentation en substrat a un effet considérable sur la qualité des bioanodes et leur temps de formation. Maintenir une concentration constante de substrat assure aux microorganismes un apport continu de matière organique contrairement à la méthode acétate batch qui leur impose des périodes de carence. Les microorganismes sont probablement contraints de ralentir leur métabolisme lors des périodes de carence en substrat, ce qui défavorise leur développement et/ou leur capacité à utiliser l'électrode. En conclusion, la limitation nutritionnelle est une mauvaise option pour développer des bioanodes efficaces.

2.5. Première tentative d'extrapolation des bioanodes (Publication 2)

L'extrapolation à grande échelle des PCMs se heurte à des obstacles majeurs qui font craindre pour le développement de cette technologie. De nombreuses études ont tenté de concevoir des PCMs et des électrolyseurs microbiens de grande taille, mais sans grand succès jusqu'à présent. Une chute considérable des densités de puissance et de courant est généralement observée (Logan, 2010), même pour des volumes de réacteur qui n'excèdent pas quelques centaines de millilitres (Santoro et coll., 2013).

La plupart des études ont porté sur l'extrapolation de piles ou d'électrolyseurs entiers. Dans ces conditions, l'analyse des causes d'insuccès est complexe car, comme évoqué précédemment pour le paramètre température, les performances sont le résultat de la contribution des différents éléments et de leurs nombreuses interactions : cinétiques de la bioanode et de la cathode, transports de masse au-travers de l'électrolyte, réactions microbiennes homogènes... Le travail réalisé dans ce paragraphe choisit de simplifier le système d'étude en focalisant l'effet du changement de taille sur la bioanode grâce à l'utilisation d'un montage analytique à 3 électrodes. De plus, le changement d'échelle reste modeste et les bioanodes sont passées d'une taille de 9 à 50 cm² (surface projetée).

Les résultats de cette étude sont décrits dans un article intitulé « Influence of the electrode size on microbial anode performance » soumis au journal *Chemical Engineering Journal*. L'article associe une approche expérimentale et une modélisation numérique afin de cerner les causes de la diminution des densités de courant observée. Le modèle numérique permet en outre d'ébaucher une première discussion sur les règles d'extrapolation des anodes microbiennes.

Les conditions expérimentales de l'étude sont décrites dans le Tableau 21. Le modèle numérique est basé sur le calcul des distributions secondaires de potentiel dans l'électrolyte en résolvant l'équation de Laplace (décrit dans le Chapitre 3).

Tableau 21. Conditions expérimentales pour les essais d'extrapolation de la bioanode.

Montage expérimental		
Montage électrochimique à 3 électrodes : grille de platine en contre-électrode et référence ECS		
Réacteur : « PCM avec cathode à air amovible »		
4 bioanodes formées : 2 par taille de bioanode		
Electrode de travail : Bioanode, plane, tissu de carbone, $S_{projetée} = 9 \text{ cm}^2$ (3 cm x 3 cm) ou 50 cm^2 (5 cm x 10 cm)		
Paramètres expérimentaux		
Inoculum : Lixiviât de terreau Milieu propre : Milieu synthétique Remplacements des milieux avec pompe péristaltique sous bullage d'azote	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Chronoampérométrie : $E = -0.2 \text{ V/ECS}$	Voltammétrie cyclique : 1 mV.s^{-1} 3 cycles Aller : OCP $\rightarrow +0.2 \text{ V/ECS}$ puis Retour : $+0.2 \rightarrow -0.5 \text{ V/ECS}$	
Spectroscopie d'impédance électrochimique à potentiel imposé pour mesurer la chute ohmique		
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence Calcul taux de recouvrement du biofilm	Microscopie électronique à balayage (MEB)	
Modèle numérique		
Distribution secondaire de potentiel		
Equations utilisées pour lisser les cinétiques expérimentales:		
Bioanode : Nernst-Michaelis	Contre-électrode : Butler-Volmer	
$j = j_{max} \frac{1}{1 + \exp\left[-\frac{n_e F}{RT} (E - E_{KA})\right]}$	$j = -j_0 \exp\left[\frac{-\alpha n_e F}{RT} \eta\right]$	

Les principaux résultats décrits dans l'article sont les suivants :

- Expérimentalement, les bioanodes de 9 cm^2 donnent des voltammétries stationnaires qui traduisent une cinétique de transfert d'électrons de type Nernst, contrairement aux bioanodes de 50 cm^2 qui produisent aux mêmes valeurs de potentiels des densités de courant plus faibles.
- L'approche numérique basée sur la modélisation de la distribution secondaire η du potentiel est menée comme suit :
 - o Les cinétiques de la bioanode (électrode de travail) et de la cathode (contre-électrode) sont déterminées expérimentalement avec les bioanodes de 9 cm^2 de surface en traçant des voltammétries stationnaires (vitesse de balayage de 1 mV.s^{-1}).
 - o Les cinétiques expérimentales sont corrigées de la chute ohmique et lissées à l'aide de l'équation de Nernst-Michaelis pour la bioanode et de Butler-Volmer pour la cathode. Sous cette forme, les cinétiques déterminées avec les bioanodes de 9 cm^2 sont intégrées dans le modèle numérique.
 - o Le modèle est mis en œuvre pour calculer la distribution de potentiel au sein du système conçu avec les bioanodes de 50 cm^2 et en tirer la voltammétrie des bioanodes de 50 cm^2 . L'approche numérique repose donc sur l'hypothèse essentielle que les bioanodes de 50 cm^2 ont une cinétique identique à celle des bioanodes de 9 cm^2 .

- Le modèle numérique confirme en partie les résultats expérimentaux ; il montre que les bioanodes de 50 cm² produisent des voltammétries stationnaires décalées vers les potentiels positifs, c'est-à-dire que pour une même valeur de potentiel, les bioanodes de 50 cm² produisent une densité de courant plus faible que les bioanodes de 9 cm².
- Le modèle montre que cette perte de performances est causée d'une part par la chute ohmique due à la faible conductivité de l'électrolyte, et d'autre part par la non-uniformité du potentiel local de Nernst le long de la surface de la bioanode.
- Toutefois, le modèle n'explique qu'une partie de la perte de performance observée expérimentalement avec les bioanodes de 50 cm² par rapport à celles de 9 cm². L'observation de la colonisation des bioanodes met en évidence sur les bioanodes de 50 cm² une hétérogénéité du biofilm corrélée à la position par rapport à l'électrode de référence.
- L'hétérogénéité du potentiel local engendrait donc l'hétérogénéité du biofilm, ce qui serait une cause supplémentaire de baisse des performances. Cette hétérogénéité des caractéristiques du biofilm n'est pas prise en compte par le modèle, elle expliquerait donc l'écart qui subsiste entre modèle et expérience pour les bioanodes de 50 cm².
- En conclusion, le développement d'une bioanode de grande surface nécessite à la fois de diminuer la chute ohmique et de conserver un potentiel uniforme le long de la surface de l'électrode. L'architecture d'une PCM doit être pensée en alliant ces deux objectifs.

Les « Supplementary data » mentionnées dans l'article sont insérées en Annexe 1.



Influence of the electrode size on microbial anode performance



Manon Oliot*, Poehere Chong, Benjamin Erable, Alain Bergel

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

HIGHLIGHTS

- Microbial anodes were scaled-up from 9 to 50 cm² surface area.
- Kinetics curves showed significant performance loss.
- The distribution of the potential over the anode surface was modelled numerically.
- Ohmic drop was responsible for only a part of the performance loss.
- Heterogeneity in biofilm development matched with the potential distribution.

Abstract

The performance of microbial fuel cells and other related microbial electrochemical processes is seen to deteriorate severely when they are scaled up. This crucial problem is addressed here by comparing the kinetics of microbial anodes with projected surface areas of 9 and 50 cm² under well-controlled electrochemical conditions. The microbial anode kinetics were characterized by low scan rate voltammetry. The 9-cm² anodes showed Nernstian behaviour, while the 50-cm² anodes showed significantly lower performance. The distribution of the electrostatic potential in the experimental set-up was modelled numerically. The model predicted the general trend of the voltammetry curves recorded with the 50-cm² anodes well, showing that part of the performance deterioration was due to ohmic drop and to non-uniformity of the local potential over the anode surface. Furthermore, the biofilm presented slightly different electrochemical characteristics when grown on the 9-cm² or 50-cm² anodes, and the difference in local potential over the 50-cm² anodes induced spatial heterogeneity in biofilm development. The effect of local potential on biofilm characteristics was an additional cause of the lower performance obtained with the 50-cm² anodes. In the current state of the art, the soundest way to design large-sized microbial anodes is to adopt the dual main aim of minimizing the ohmic drop while keeping the most uniform possible potential over the electrode surface. Modelling potential distribution inside the reactor should make an essential contribution to this.

Keywords : bioanode; microbial fuel cell; scale-up; numerical modelling; bioelectrochemical system.

1. Introduction

For around 15 years, microbial biofilms developed on anode surfaces have revealed an amazing capacity to catalyse the electrochemical oxidation of a large variety of organic compounds [1,2]. Microbial anodes have shown very high performance in terms of current density produced [3–5] and have opened up avenues for a huge number of new electrochemical processes [6,7]. Interesting applications have been predicted in various application sectors. Microbial fuel cells (MFCs) have been the pioneering systems implementing microbial anodes for the local production of small amounts of

electrical energy [8–12] and its storage [13,14]. In microbial electrolysis cells (MECs), microbial anodes reduce the energy cost of hydrogen production [15–17]. Microbial anodes have also been envisioned in the design of new wastewater treatment processes [18–20]. Extremely simplified processes, called electro-microbial snorkels, have been derived, based on short-circuiting a microbial anode with a cathode in order to maximize the organic matter consumption rate [21]. Such low-cost and low maintenance electrochemical systems may have promising futures in wastewater treatment [22] and environmental depollution [23,24].

These thrilling perspectives will only become reality when the difficulty of scaling-up laboratory devices to large-sized industrial equipment has been overcome [8]. Many attempts have been made, particularly with MFCs and MECs, but with only modest success [25–27]. In the case of MFCs equipped with air-breathing cathodes, which are the archetype of electro-microbial devices, the maximum power densities reported so far are 4.7 [28] and 6.4 W.m⁻² [29], but the maximum performance has been observed to fall to 2 W.m⁻² when the volume of the MFC is increased, even modestly, to 100 mL [30]. The problem is so tricky that some research teams think that the best way to develop MFC applications at reasonable scale should be to stack several small MFCs rather than increasing the size of a single cell [31]. Impressive results have been reported in this way, by stacking up to 400 individual small MFCs [32].

Nevertheless, the interest of the stacking approach should not discourage us from attempting scale-up. Little success has been reported so far in this domain, probably because scaling-up attempts have been carried out with whole reactors [8,33]. Considering microbial electrochemical reactors as a whole and trying to directly increase their size is a tough challenge because of the complex interactions that occur in these reactors. The performance decrease of the reactor can be due to the microbial anode itself, which may lose a part of its catalytic efficiency when its surface area increases, but it may also be caused by any other element of the reactor: cathode kinetics, ion transport through the electrolyte(s) [34] and any coupled effects such as the cross-over of substrates and metabolites between anode and cathode. Actually, scaling-up complex technological systems such as cars, planes or industrial chemical equipment is never carried out by considering the system as a whole and trying to increase its size from a small laboratory device to industrially-sized equipment. For example, planes are not constructed by increasing their size from a child's toy to a final long-haul aircraft, but by characterizing materials, hydrodynamics, motors, tyres, electric and hydraulic systems, etc. separately and then organizing all the information with numerical models in order to design the optimum prototype. Designing chemical equipment, e.g. catalytic hydrogenation columns or fuel cells, follows the same strategy: the reaction kinetics, the nature and the structure of the catalyst are firstly determined in analytical conditions according to well-defined analytical methods. In parallel, the hydrodynamics is characterized in so-called "cold prototype" by specific experiments performed in the absence of reaction. All these pieces of information are then used to design a numerical model that allows first prototype to be made. The deviations between the numerical predictions and the experimental data produced by the prototype are analysed in order to identify and quantify non-anticipated behaviours and non-anticipated interactions. Some gaps in fundamental knowledge may thus be pointed out, which must be overcome. It can consequently be decided to go back to some analytical investigations with specific experimental set-ups or to make another prototype to refine the model. When numerical predictions and experimental data are satisfactorily consistent, the size of the prototype can be increased. Finally, when the numerical model is assessed to be sound and accurate enough it is used to design the final industrial equipment.

The large number of studies that have demonstrated the difficulty of scaling up microbial electrochemical reactors show that it is now time to consider such reactors as complex technological devices. Some microbial electrochemical reactors, e.g. MFCs, are easy to build and it is pretty simple to get the first interesting results. This apparent simplicity, which is an asset in some respects, should not mask the real complexity of microbial electrochemical reactors and the need to use a rigorous engineering approach if the objective is to scale them up.

The purpose of the present study is to contribute to the strategy for scaling up electro-microbial processes starting from the very first step. The study focuses on the microbial anode, just looking at how its performance drops when the electrode size is increased from 9 to 50 cm². The study was performed under well-controlled electrochemical conditions, i.e. using a three-electrode analytical set-up, to extract the microbial anode from the interactions occurring in complete microbial electrochemical reactors, such as MFCs or MECs. In a three-electrode set-up, the potential of the anode is controlled accurately with respect to a reference electrode so that the evolution of the cathode kinetics or of some other steps of the system does not impact the value of the anode potential. For the same reason, the temperature was controlled so that the bioanodes were characterized in conditions that were as reproducible as possible. Experimental and numerical approaches were combined to unravel the causes of the performance degradation. Finally, practical suggestions were drawn for the design of analytical set-ups and on how progress could be made in scaling up microbial anodes.

3. Numerical modelling

3.1. Electrostatic potential distribution

Numerical modelling was based on the calculation of the secondary potential distribution in the electrolyte by solving the Laplace equation. The theoretical basis has already been detailed elsewhere [38]. The model was provided with the geometry of the experimental set-up, the ionic conductivity of the electrolyte (1.3 S.m⁻¹) and the anode and auxiliary electrode kinetics. The experimental kinetics of the microbial anode and the auxiliary electrode were characterized by low scan rate voltammetry (1 mV.s⁻¹) and fed into the model as boundary conditions. The experimental voltammetry curves were firstly corrected for the ohmic drop measured by EIS (3.4 Ω for the 9-cm² anode and 2.5 Ω for the auxiliary electrode) and then fitted numerically as described elsewhere [35]. It is important to note that numerical fitting was used only to transform the experimental kinetics data into equations that could be used as input to the model, but no parameter was numerically adjusted during the modelling phase.

The microbial anode CVs were fitted with a Nernst-Michaelis equation:

$$j = j_{max} \frac{1}{1 + \exp\left[-\frac{F}{RT}(E - E_K)\right]} \quad (4)$$

where j (A.m⁻²) is the current density, j_{max} is the maximum current density, $F = 96\,485$ C.mol⁻¹ is the Faraday constant, $R = 8.314$ J.mol⁻¹.K⁻¹ is the universal gas constant, $T = 313$ K is the temperature, E is the Nernst potential, E_K is the potential when j is equal to half j_{max} .

The kinetics of the platinum grid (auxiliary electrode) was determined by CV at 1 mV.s⁻¹ in the medium obtained at the end of the microbial anode formation. The auxiliary electrode, which worked at potential values lower than -0.6 V/SCE, was assumed to achieve water reduction into hydrogen:



The CV curve was fitted with a Tafel equation:

$$j = -j_0 \exp\left[\frac{-\alpha n F}{RT} (E - E_{OCP})\right] \quad (6)$$

where j_0 ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$) is the exchange current density, α is the transfer coefficient, E_{OCP} is the open circuit potential, and $n = 4$ is the number of electrons consumed per mole of water reduced.

The equations were solved with the Comsol Multiphysics software equipped with the "Electrochemistry" module (version 5). The model was run by scanning different values of cell voltage (U_{cell}), defined as the potential difference between the anode and the auxiliary electrode [32]. The model gave the distribution of the electrostatic potential ϕ in the electrolyte and the local values of current on the electrode surface. The total current was calculated by integrating the local current over the whole electrode surface area, which means the two sides and the 1-mm edge.

3.2. Nernst potential: local variation and value measured

The Nernst potential of the anode is defined as:

$$E_A = \phi_{MA} - \phi_{SA} \quad (7)$$

It is generally assumed that the electrode is conductive enough for the electrostatic potential of the electrode material (ϕ_{MA}) to be considered constant. In contrast, the electrostatic potential of the solution in contact to the electrode (ϕ_{SA}) varies over the electrode surface, so the Nernst potential (E_A) also varies over the electrode surface.

Experimentally, the value measured for the anode potential ($E_{A \text{ measured}}$) is the difference between the electrostatic potential of the anode material (ϕ_{MA}) and the electrostatic potential of the reference electrode material (ϕ_{MR}):

$$E_{A \text{ measured}} = \phi_{MA} - \phi_{MR} \quad (8)$$

This equation can be written as:

$$E_{A \text{ measured}} = (\phi_{MA} - \phi_{SA}) + (\phi_{SA} - \phi_{SR}) + (\phi_{SR} - \phi_{MR}) \quad (9)$$

where ϕ_{SR} is the electrostatic potential of the solution in contact with the tip of the reference electrode. This equation means that the measured anode potential is tainted by the ohmic drop between the anode and the reference electrode ($\phi_{SA} - \phi_{SR}$) and that it must be corrected for the potential of the reference electrode ($E_{REF} = \phi_{SR} - \phi_{MR}$):

$$E_{A \text{ measured}} = E_A + \text{Ohmic drop} - E_{REF} \quad (10)$$

Here, the potential of the reference electrode was equal to zero ($E_{REF} = 0$) because the model was fed with potential values expressed with respect to the saturated calomel electrode, the same reference as was used for the experiments (if the potentials were expressed with respect to the SHE in the model, the value $E_{REF} = 0.243 \text{ V}$ should be used here to compare the numerical values with the experimental data). Consequently, Equation (9) becomes:

$$E_{A \text{ measured}} = \phi_{MA} - \phi_{SR} \quad (11)$$

The value of the anode potential measured experimentally is the difference between the electrostatic potential of the anode material and the electrostatic potential of the solution in contact with the tip of the reference electrode.

For each value of U_{cell} , the model gave the value of the current and the values of ϕ_{MA} and ϕ_{SR} . The current was thus reported as a function of the measured anode potential ($E_{A\text{ measured}}$). In this way, the calculated current-potential curves could be directly compared with the voltammetry curves recorded experimentally.

4. Results and discussion

4.1. Microbial anode formation: 9-cm² vs 50-cm² anodes

Two electrode sizes were compared, with projected surface areas of 9 and 50 cm². Microbial anodes were formed under constant polarization at -0.20 V/SCE in compost leachate with a constant acetate concentration of 20 mM. Two independent experimental runs were performed, each with 2 anodes of 9 cm² and 2 anodes of 50 cm². After around 20 days, current densities reached 5 to 10 A.m⁻² and the compost leachate was replaced by a synthetic medium. Current density values were always expressed with respect to the total surface areas, i.e. 19.2 and 103 cm² for the 9-cm² and 50-cm² anodes, respectively.

In the second phase of microbial anode development, the performance increased in all reactors, reaching 7 to 17 A.m⁻² after around 10 days. Such an increase in performance is commonly observed with this procedure (data not shown). It may be due to a resupply in vitamins and nutrients favouring microbial activity and/or to the simplification of the medium content. Actually, the compost leachate used during the first phase is an excellent medium to initiate the formation of microbial anodes [39,40,41] but it is a rich medium, which probably contains dissolved electron acceptors such as nitrates, sulfates and humic acids that compete with the anode [36]. Many side-reactions can occur and induce the development of non-electroactive bacteria and acetogenic methanogen *Archae* [42]. This is the cause of the experimental deviations observed on the maximum current densities, as already reported when using rich natural media to form microbial anodes [36,43,44].

Acetate was more quickly consumed with the 50-cm² anodes than with the 9-cm² ones. Based on 12 different measurements made before acetate was added to restore its concentration to 20 mM, Faradaic yields were $32.7 \pm 5.1\%$ and $83.0 \pm 11.5\%$ on average with the 9-cm² and the 50-cm² anodes, respectively. Acetate was consumed either by electroactive bacteria that released the electrons to the anode or by non-electroactive bacteria that used other electron acceptors than the anode. The amount of electrons released to the electrode (Q_{elec}) is proportional to the anode surface area, while the amount of electrons released to soluble acceptors (Q_v) is proportional to the reactor volume. Faradaic yields are equal to:

$$\phi_e = \frac{Q_{elec}}{Q_v + Q_{elec}} \quad (12)$$

For the 9-cm² anodes, the value $\phi_e = 0.327$ led to $Q_{elec-9cm^2} = 0.49 Q_{v-9cm^2}$. When switching from the 9-cm² to the 50-cm² anodes, it can be assumed that the Q_v parameter was not affected because the reactor volume did not change, and that Q_{elec} was multiplied by the ratio of surface areas, from 19.2 to 103 cm². This simple approach led to $Q_{elec-50cm^2} = 103/19.2 \times 0.49 Q_v$, so the Faradic yield (Equation 12) would be 72 %.

Firstly, this value was of the same order of magnitude as the experimental value of 83%, which means that the considerable increase in Faradaic yield obtained with the 50-cm² anodes was mostly explained mathematically by the increase of the anode surface area. The difference between the calculated Faradaic yield and the experimental value was probably due to the faster consumption of acetate in the reactors equipped with the 50-cm² anodes, which resulted in lower acetate concentration being reached between two additions and consequently reduced the Q_V part. In conclusion, the large difference observed in the Faradaic yields according to the anode surface area seemed considerable at first glance, but an elementary mathematical approach evidenced its relevance.

CV curves were recorded at the end of anode development. The CV curves always exhibited a general sigmoid shape, which differed depending on the anode size (Fig. 1, triplicates presented in Fig. 1 of Supplementary Data). The j - E slope was markedly lower for the 50-cm² than for the 9-cm² anodes. This meant that, to reach a given current density value, a higher overpotential was needed with the 50-cm² than with the 9-cm² anodes. It can be concluded that the 50-cm² microbial anodes were less efficient than the 9-cm² anodes. As a first rough observation, it may be noted that scaling up microbial anodes, even in well-controlled electrochemical conditions, led to lower performance.

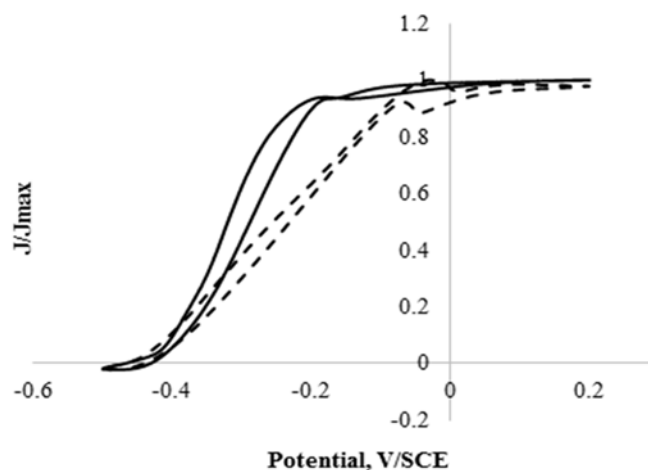


Fig. 29. Experimental cyclic voltammograms of the 9-cm² (continuous line) and 50-cm² (dotted line) microbial anodes after 10 days' polarization at -0.2 V/SCE in a synthetic medium (1 mV.s⁻¹).

All the CV curves recorded with the 50-cm² anodes showed a small superimposed oxidation peak in the potential range between -0.15 and 0.0 V/SCE, but this peak appeared on only one of the CVs recorded with the 9-cm² anodes (Fig. 1, triplicates presented in Fig. 1 of Supplementary Data). A similar peak shape has already been observed in previous studies [41,45]. It cannot be attributed to a transient effect, which would be revealed at high potential scan rate, because its shape does not correspond to theoretical transient curves [46]. This superimposed peak was probably due to a redox system that was not (or not efficiently) involved in the electrocatalytic process. If this redox system had been involved in the catalytic process, the current would not have decreased when the potential increased. The current decrease at increasing potential indicated a non-turnover behaviour. This system was detected in the 50-cm² microbial anodes but generally not in the 9-cm² microbial anodes (only in one of the four anodes).

The CV curves were corrected for the ohmic drop by removing the term $R_s \cdot i$ (where R_s (Ω) is the resistance between the anode and the reference electrode that was measured by EIS and i (A) is the current) from each value of potential. The corrected CVs were then derived in order to identify the

different redox systems involved in the electrocatalysis [47]. At the highest potential values, the CVs of the 50-cm² anodes were strongly disturbed by the presence of the superimposed peak (Fig. 2) and the first derivative revealed that a redox system could also be present in a similar potential range on the 9-cm² anodes, but with considerably lower intensity.

The first derivative of the 9-cm²-anode CVs revealed a main peak centred at -0.36 ± 0.06 V/SCE. Two other peaks were identified as shoulders close to the main peak on either side. The 50-cm² anodes exhibited two well-defined peaks centred at -0.34 ± 0.04 V/SCE and -0.15 ± 0.04 V/SCE. A third peak appeared as a shoulder at lower potential. For both electrode sizes, the first derivative of the CV curves identified three redox systems involved in the catalytic pathways, but with slightly different locations in terms of potential. Actually, attempts to accurately interpret the first derivative obtained with the 50-cm² anodes should be avoided, because the global correction of the ohmic drop on large electrodes may warp the curve and taint the potential values. To sum up, three similar catalytic redox systems were detected whatever the electrode size, but with different peak heights. Assuming that the peak heights of the first derivatives depended on the concentrations of the different redox systems, it can be speculated that the three redox systems were present at different concentration ratios depending on the electrode size.

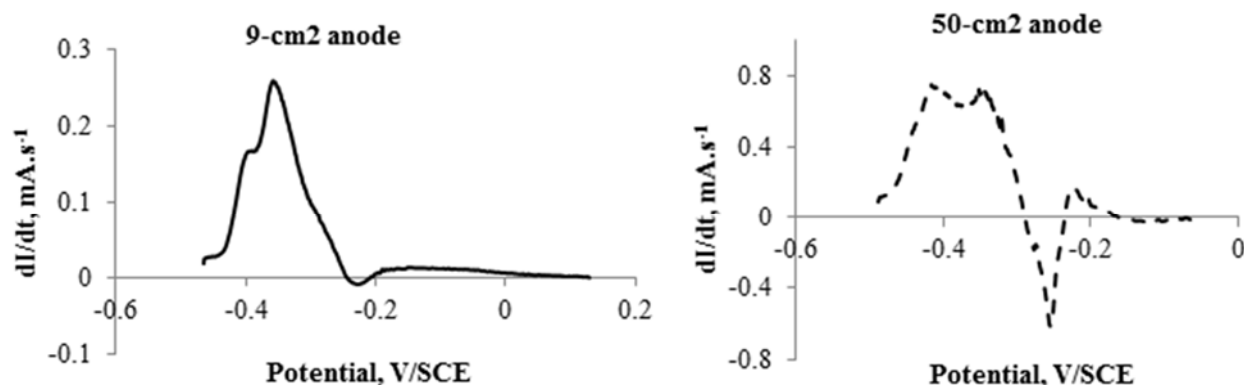


Fig. 2. First derivatives of the CV presented in Fig. 1, after correction of ohmic drop.

4.2. Numerical model

4.2.1. Validation of the numerical model with the 9-cm² anode

After correction of the ohmic drop, the experimental CV curves recorded with the 9-cm² microbial anodes were fitted with the Nernst-Michaelis equation (Equation 4). Although the fine analysis of the experimental curves revealed three redox systems, it was possible to fit them numerically with a single redox system equation. This approach was sufficient to obtain accurate anode kinetics. Here, the objective was not to establish a theoretical explanation of the kinetics curves but to provide the model with accurate anode kinetics. Considering a single system simplified the numerical fitting process as it was sufficient to introduce two parameter values into equation (4): the maximum current density (j_{max}) and the half-wave potential (E_K). The experimental values $j_{max} = 10.2$ A.m⁻² and $E_K = -0.353$ V/SCE, allowed the experimental CV curve to be fitted perfectly.

The platinum auxiliary electrode was fitted with a Tafel law (Equation 6). The parameters j_0 and α were numerically adjusted by a least-squares procedure. The values $j_0 = 0.135$ A.m⁻² and $\alpha = 0.82$ led to

perfect fitting of the experimental CV curves. The model was also provided with the ionic conductivity of the electrolyte, which was measured experimentally ($1.3 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$), and the geometry of the experimental set-up. The 9-cm^2 anode was in front of a larger auxiliary electrode ($3.5 \text{ cm} \times 6.5 \text{ cm}$) placed in front of the anode at a distance of 7 cm . The reference electrode was centred on the anode and at a distance of 2 cm from its surface. The integration space was a cube of side 25 cm . It was verified that the volume of the integration space was large enough not to affect the results, for instance the model run in a cubic integration space of 50 cm sides gave exactly the same results.

The current was calculated for different values of the cell voltage and the CV curves were drawn by plotting the current density (relating to total surface area) as a function of $E_{A \text{ measured}}$ (Equation 11). The numerical CV curve (solid line) matched the experimental data perfectly (dotted line) (Fig. 3.A), which confirmed the validity of the numerical approach. It should be recalled here that no parameter was numerically adjusted to calculate the CV curves from the experimental kinetics of each electrode.

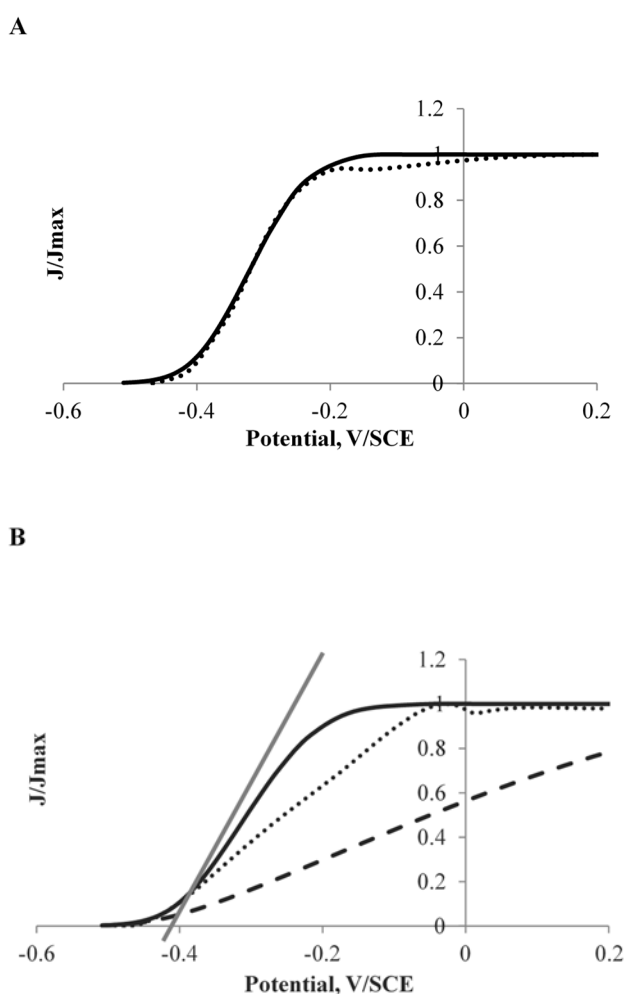


Fig.3. Experimental (dotted lines) and modelled (solid and dashed lines) CV curves of (A) 9-cm^2 and (B) 50-cm^2 anodes with the experimental electrolyte conductivity of $1.3 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$. Dashed line: modelled CV curve of the 50-cm^2 anode with ionic conductivity of $0.2 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$. The straight grey line gives the slope of the 9-cm^2 -anode CV.

4.2.2. From 9 cm^2 to 50 cm^2

The set-up with the 50-cm^2 anode was modelled with an auxiliary electrode of dimensions $6 \text{ cm} \times 22 \text{ cm}$, to keep a configuration and surface area ratio similar to that with the 9-cm^2 anode. The distance

between anode and auxiliary electrode and the position of the reference electrode were not changed. Consequently, except for the electrode sizes, nothing was changed with respect to the previous run. This meant that the kinetics determined experimentally with a 9-cm² anode was used to model the 50-cm² configuration. This is a first step of numerical scale-up. The model provided a CV with a current-potential slope lower than that of the 9-cm² anode (solid line, Fig. 3.B). The model confirmed the experimental trend: increasing the electrode size led to decreasing performance. Nevertheless, the modelled CV overestimated the experimental curve.

The performance decrease induced by increasing the electrode size can be understood by looking at the current provided by the anodes at the same potential $E_{measured}$, for instance -0.25 V/SCE (Fig. 4.A). Both sides of the 9-cm² anode provided similar current density (8.6 and 8.5 A.m⁻²), whereas the two sides of the 50-cm² anode provided smaller current densities (Fig. 4.B) and the back worked less efficiently than the side in front of the auxiliary electrode (7.25 against 8.0 A.m⁻²).

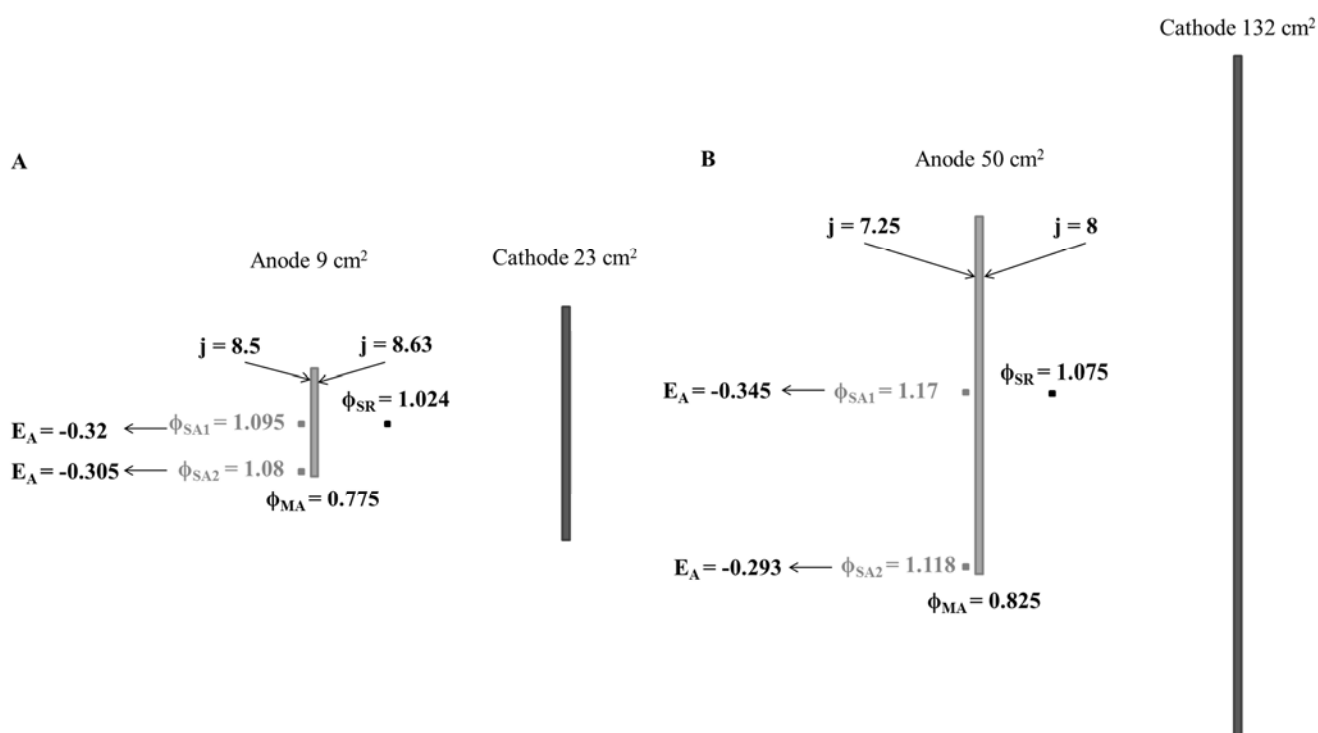


Fig. 4. Values of the electrostatic (ϕ) and Nernst (E , V/SCE) potentials and current densities (j , A.m⁻²) along a 9-cm² (A) and a 50-cm² (B) microbial anode for $E_{measured} = -0.25$ V/SCE. The electrostatic potentials of the cathode material were the origin of electrostatic potentials ($\phi_{MC} = 0$).

The distribution of the electrostatic potential of the solution in contact with the anode surface (ϕ_{SA}) was different in the two cases. For comparison, the values were extracted from the model at the middle and at 1 mm from the extremity of the front and the back sides of the anode. The front side was defined as the anode side that faced the auxiliary electrode (Fig. 4.A). For each local electrostatic potential, the corresponding Nernst potential was calculated according to Equation (7) (Table 1). The front side and the back side of the 9-cm² anode worked with an identical range of Nernst potentials from -0.303 to -0.320 V/SCE. The electrode worked at local potential values significantly different from the measured value $E_{measured} = -0.25$ V/SCE, because of the ohmic drop, but the potential over the electrode surface was fairly uniform, with a maximum difference of only 17 mV, and both sides produced similar current densities, of 8.63 and 8.5 A.m⁻² (Fig. 4.A). The situation of the 50-cm² anode was different. It showed a significantly broader distribution of potentials, of 58 mV (from -0.287 to -

0.345 V/SCE), and produced lower current densities. Each side worked at a slightly different potential, which resulted in different current densities, of 8.0 and 7.25 A.m⁻².

Because of a broader distribution of local potential, the 50-cm² anode produced lower current density than the 9-cm² anode. The current lines could easily reach the entire back surface of the 9-cm² anode, so only a small potential distribution occurred and the back side produced current similar to that of the front side. In contrast, the current lines struggled to reach the back surface of the 50-cm² anode, which was consequently less efficient than the front.

Table 1. Values of the Nernst potentials and current densities along a 9-cm² and a 50-cm² microbial anode for $E_{measured} = -0.25$ V/SCE, in different conditions.

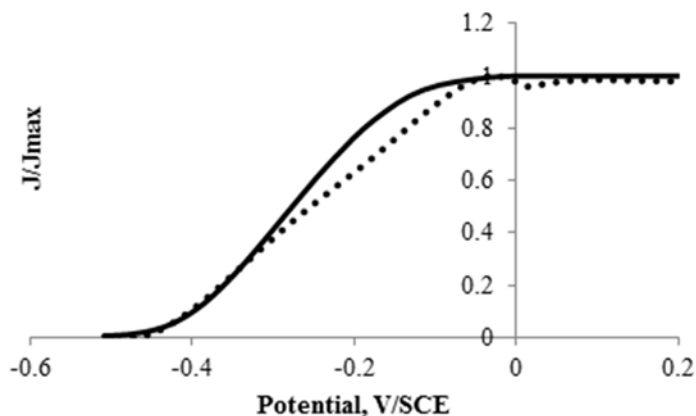
		Front side			Back side		
		Bottom	Centre	Top	Bottom	Centre	Top
9-cm² anode (Fig. 4)	E (V/SCE)	-0.303	-0.317	-0.303	-0.305	-0.320	-0.305
	j (A.m ⁻²)	8.63			8.5		
50-cm² anode (Fig. 4)	E (V/SCE)	-0.287	-0.332	-0.287	-0.293	-0.345	-0.293
	j (A.m ⁻²)	8			7.25		
50-cm² anode at 0.2 S.m⁻¹	E (V/SCE)	-0.355	-0.393	-0.355	-0.36	-0.404	-0.36
	j (A.m ⁻²)	2.46			2.03		
50-cm² anode tilted of 30°	E (V/SCE)	-0.322	-0.345	-0.31	-0.324	-0.356	-0.318
	j (A.m ⁻²)	6.34			5.75		

In summary, although the applied potential was equal in the two cases ($E_{measured} = -0.25$ V/SCE), the anodes worked in different local potential conditions depending on their size. Both sides of the 9-cm² anode provided similar current density, while the two sides of the 50-cm² anode provided lower and different current densities. The 50-cm² anode worked in less favourable electrochemical conditions than the 9-cm² electrode. This effect was stronger here than an “abiotic electrochemist” would intuitively anticipate, because of the low ionic conductivity of the media used in electro-microbial systems in comparison to that of the electrolytes implemented in conventional electrochemical processes.

The model illustrates the drastic effect of the ionic conductivity. For instance, with an ionic conductivity of 0.2 S.m⁻¹, as encountered when wastewaters are used as the electrolyte [16,48], the 50-cm² anode would display a drastic performance loss (dashed line, Fig. 3.B). In this case, always for $E_{measured} = -0.25$ V/SCE, the Nernst potential at the middle of the back side fell to -0.404 V/SCE. With ionic conductivity of 0.2 S.m⁻¹, the 50-cm² anodes would thus work far from the potential value applied by the experimentalist. Nevertheless, the potential distribution over the anode surface would be of 49 mV (Table 1), i.e. slightly less large than with the conductivity of 1.3 S.m⁻¹, and both anode sides would produce fairly similar current densities (2.46 for the front side and 2.03 A.m⁻² for the back). Actually, ohmic drop considerably impacted the anode operating conditions by holding the local potentials away from the applied value. In counterpart, it flattened the potential distribution.

The model predicted the general evolution trend of the CV curve when the anode was scaled up from 9 to 50 cm² but the performance loss predicted by the model (Fig. 3) was smaller than that observed on the experimental curves (Fig. 1). The difference in local potentials due to the low conductivity of the medium explained the performance loss linked to scaling up to some extent, but not fully. Actually, the position of the anode was not strictly controlled in the experimental set-ups and the anode was

not strictly parallel to the auxiliary electrode. The angle may have been up to around 30 degrees with respect to the vertical axis in some reactors. The model was run by tilting the 50-cm² anode by 30 degrees with respect to the vertical axis. Tilting the anode exacerbated the performance loss (Fig. 5). The potential distribution range over the anode surface was reduced to 46 mV (vs. 58 mV when the anode was vertical) but potentials were globally farther from the applied potential $E_{measured}$ than with the vertical anode (Table 1). As a result, the anode performance decreased significantly. The model showed that keeping the anode and the auxiliary electrode strictly parallel became essential when



implementing large electro-microbial devices. Small laboratory prototypes can tolerate some small geometric deviations without significant impact being detected on electrode performance, but geometric deviation is no longer acceptable in large reactors.

Fig. 5 Experimental (dotted line) and modelled (solid line) (i-E) curves of a 50-cm² anode. The modelled anode was tilted by 30° with respect to the vertical axis.

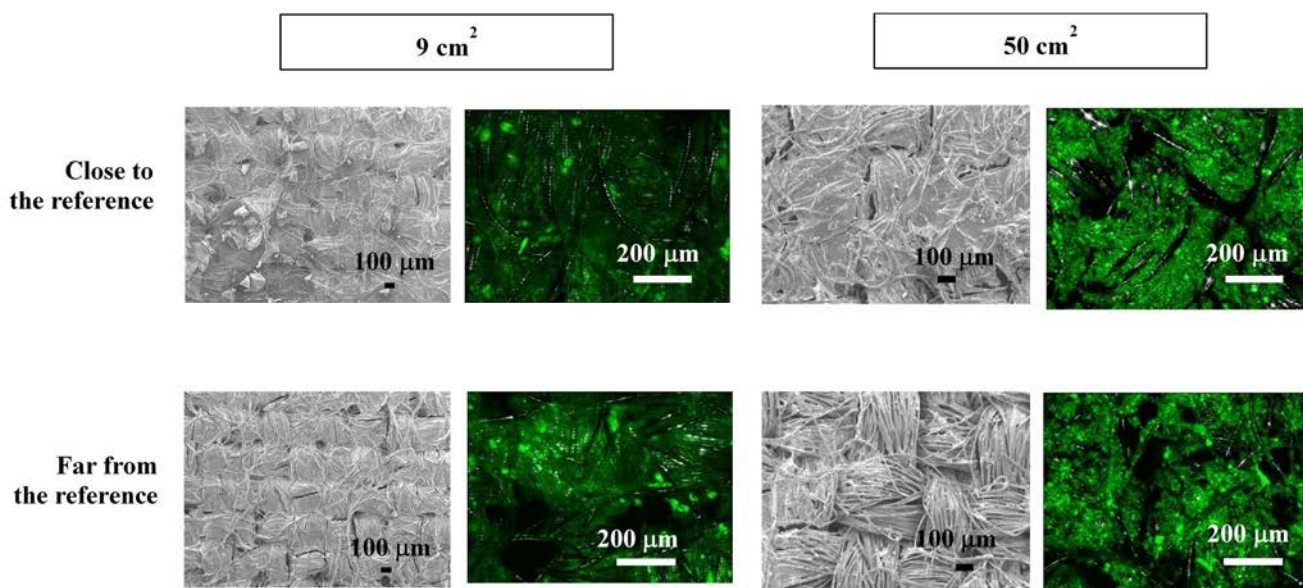
In summary, the model showed that the differences in local potential were responsible for a part of the performance loss when microbial anodes were scaled up from 9 to 50 cm². The non-parallel positioning of the anode relatively to the auxiliary electrode worsened the performance loss and the modelled curve was thus closer to the experimental one. Nevertheless, the model still predicted more efficient CV curves than were recorded experimentally.

4.3. Biofilm development

The 9-cm² and 50-cm² microbial anodes were observed by SEM and epifluorescence microscopy at the end of the experiments. Two different areas were imaged: close to the middle and close to the extremity of the electrode surface (Fig. 6) and, for each area, three neighbouring spots selected at random were imaged on two different anodes. The average values and standard deviations given below are thus the result from 6 measurements. For each spot, a stack of 30 to 50 images was obtained along the z-axis in order to assess the biofilm volume ratio. Epifluorescence imaging was performed by using acridine orange so that both intracellular and extracellular nucleic acids were stained and epifluorescence gave a fair representation of the global biofilm.

The 9-cm² anodes presented dense, uniform colonization of the surface whatever the location of the spots. The microbial volume ratios were of the same order of magnitude close to and far from the middle of the electrode: 49.1 ± 7.1 % and 45 ± 4 %, respectively. In contrast, SEM imaging of the 50-cm² anodes showed a non-uniform biofilm, which was thick close to middle of the electrode and thinner farther away. The volume coverage ratios extracted from epifluorescence imaging confirmed the SEM observation, with a microbial volume ratio of 60.3 ± 11.2 % close to the middle and 51.7 ± 5.6

% far away. Actually, the difference of visual impression given by SEM imaging seemed even more marked than the difference expressed by the quantitative assessment of the biofilm volume ratios.



The biofilm was denser on the zones where the model showed less negative local potentials. A comparison of the theoretical potential distribution over the anode surface and the observed biofilm development suggests that the potential gradient along the electrode may impact biofilm development.

Fig. 6. Epifluorescence and scanning electron microscopy images of the 9-cm² and 50-cm² anodes close to the extremity and close to the middle of the electrode surface.

4.4. Discussion

It is well known that the best electroanalytical set-up to characterize electrochemical kinetics consists of an electrode of small surface area and with only one side working in front of an auxiliary electrode of larger surface area. This configuration can be easily achieved with a plane electrode by insulating one side and the edges, as is done for rotating disk electrodes for example. It is more difficult, or even impossible, to achieve such a one-sided configuration with porous electrodes (felt, foam, etc.) and electrodes such as carbon cloth, which are used for the development of the most efficient electroactive biofilms. In this case, the best electroanalytical strategy is to use a small electrode and to consider the two sides, without forgetting the edge, as the working surface area. It has already been demonstrated experimentally that, in such a configuration, both sides of the anode work in similar conditions [49]. This was confirmed here by the numerical modelling of the 9-cm² anode.

It should be kept in mind that the potential applied (Equation 11) was measured as the difference between the electrostatic potential of the anode material (ϕ_{MA}) and the electrostatic potential of the solution in contact with the tip of the reference electrode (ϕ_{SR}). In a relevant electro-analytical system, two conditions must be validated:

- the electrostatic potential of the solution in contact with the tip of the reference electrode must not be significantly different from that of the solution in contact with the anode (ϕ_{SA}), i.e. the ohmic drop between the anode and the reference electrode must be negligible (Equations 9 and 10),

- the electrostatic potential of the solution must not vary significantly over the electrode surface.

If these two conditions hold, the electrode can be considered as a uniform surface working at the applied potential. This is the situation that should be ensured in an appropriate electroanalytical set-up. Relevant characterization of the electrode kinetics can thus be performed by expressing the current density relative to the total surface area (both sides and edge) [35].

In the case of electro-microbial technologies, which commonly use electrolytes with low ionic conductivity, the ohmic drop often taints experimental measurements. The ohmic drop can be corrected as a whole, as was done here for the CV curves recorded with the 9-cm² anodes. The simplest way to do this is to measure the global ionic resistance, R_s , experimentally and to correct each potential value of the current-potential curve using the $R_s \cdot i$ term. In terms of electrostatic potential, this operation removes the $(\phi_{SA} - \phi_{SR})$ term from Equation (9). In this way, the electrode is hypothesized to be a surface working at the same potential everywhere. This assumption was reasonable here for the 9-cm² anode operating in the 1.3 S.m⁻¹ electrolyte but modelling showed that such an assumption could no longer be made for the 50-cm² anode, because of the significant distribution of local Nernst potentials (Fig. 4). The 50-cm² anode operating in the 1.3 S.m⁻¹ electrolyte could not be considered as a uniform electrode.

The scaling-up step investigated in this study was based on a modest scaling ratio, from 9 to 50 cm², and was carried out in well controlled electrochemical conditions. Despite these favourable circumstances, the experiments showed a marked loss of performance from 9 to 50 cm². Such clear performance deterioration with such a modest scaling-up ratio and well-controlled electrochemical conditions provides a basis to approach the drastically low performance reported so far when larger microbial electrochemical reactors have been used under more complex conditions.

The model showed that the decrease of the anode performance, when passing from 9 to 50 cm² surface area, was explained by the difference in the local Nernst potential to some extent. At large size, the anode worked at potentials significantly far from the applied value and presented a broad distribution of local potential. The performance deterioration was exacerbated by non-parallel positioning of the anode with respect to the auxiliary electrode. Nevertheless, even with a tilting angle of 30°, which was the maximum that might be encountered in the present experiments, performance predicted by the model for the 50-cm² anodes remained higher than the experimental data.

The remaining difference between the numerical and experimental CV curves can be explained by differences in the characteristics of the electroactive biofilms. The 9-cm² anodes presented uniform microbial colonization, while the 50 cm² anodes presented differences in local biofilm volumes, which matched the difference in local potential predicted by the model. The potential distribution over the anode surface corresponded to some difference in biofilm development. Furthermore, the biofilms exhibited three similar redox systems whatever the electrode size, but with different concentration ratios depending on the anode size.

It can be speculated that biofilm growth is sensitive to the local anode potential and this may be the source of a vicious circle: the potential gradient along the electrode surface impacts the biofilm development, which in turn affects the local potential by establishing patches with different catalytic capabilities. Several informative studies have reported on the relationship between anode potential and electroactive biofilm development [36,44,50,51] but basic knowledge on this issue remains

sporadic and no obvious way has yet been found to correlate the biofilm growth and the development of its electrocatalytic properties with the electrode potential. In the current state of the art, the soundest design of large-sized microbial anodes would follow the main guideline of reducing the ohmic drop while keeping the most uniform possible potential over the anode surface. These two objectives must be pursued concomitantly. For instance, the model run with low ionic conductivity (0.2 S.m^{-1}) showed that increasing the ohmic drop between the anode and the auxiliary electrode reduced the potential distribution over the electrode surface - but it also showed that the anode performance was severely decreased. Uniformity of the local potential must not be achieved at the price of higher ohmic drop but by appropriate design of the anode-cathode architecture. Modelling the potential distribution inside the reactor will constitute an essential tool for this purpose.

5. Conclusions

Although scaling-up was performed in well-controlled electrochemical conditions and with a modest scale-up ratio, from 9 to 50 cm² surface area, marked deterioration in the performance of microbial anodes was observed. The numerical model showed that the performance loss was, to some extent, explained by differences in the local Nernst potential, which depended on the electrode size. The difference in biofilm development was the other contribution to the performance loss. The biofilm development seemed to be sensitive to the local potential. The biofilm formed on a large anode suffering from broad local potential distribution may develop electrocatalytic properties different from those in a small electroanalytical set-up. In the absence of certain correlation between potential and electroactive biofilm development, minimizing the ohmic drop while ensuring uniform potential over large-sized electrodes should be considered as the main rule for scale-up.

Acknowledgements

This work benefited from the 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). P. Chong gratefully thanks the MEGEP doctoral school for the attribution of a PhD grant.

References

- [1] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresour Technol.* 101 (2010) 1533–43.
- [2] P. Pandey, VN. Shinde, RL. Deopurkar, SP. Kale, SA. Patil, D. Pant, Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery, *Appl. Energy.* 168 (2016) 706–23.
- [3] S. Chen, G. He, Q. Liu, F. Harnisch, Y. Zhou, Y. Chen, et al., Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9769–72.
- [4] SF. Ketep, A. Bergel, A. Calmet, B. Erable, Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 1633–7.
- [5] A. Baudler, I. Schmidt, M. Langner, A. Greiner, U. Schröder, Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 2048–55.
- [6] AP. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z-W. Wang, Y. Feng, BH. Kim, Electroactive biofilms: Current status and future research needs, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 4813–34.
- [7] H. Wang, ZJ. Ren, A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1796–807.
- [8] BE. Logan, MJ. Wallack, K-Y. Kim, W. He, Y. Feng, PE. Saikaly, Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (2015) 206–14.

- [9] IA. Ieropoulos, P. Ledezma, A. Stinchcombe, G. Papaharalabos, C. Melhuish, J. Greenman, Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 15312–6.
- [10] J. Chouler, GA. Padgett, PJ. Cameron, K. Preuss, M-M. Titirici, I. Ieropoulos, et al., Towards effective small scale microbial fuel cells for energy generation from urine, *Electrochimica Acta.* 192 (2016) 89–98.
- [11] YRJ. Thomas, M. Picot, A. Carer, O. Berder, O. Sentieys, F. Barriere, A single sediment-microbial fuel cell powering a wireless telecommunication system, *J. Power Sources* 241 (2013) 703–8.
- [12] A. Schievano, A. Colombo, M. Grattieri, SP. Trasatti, A. Liberale, P. Tremolada, et al., Floating microbial fuel cells as energy harvesters for signal transmission from natural water bodies, *J. Power Sources*, 340 (2017) 80–8.
- [13] J. Houghton, C. Santoro, F. Soavi, A. Serov, I. Ieropoulos, C. Arbizzani, et al., Supercapacitive microbial fuel cell: Characterization and analysis for improved charge storage/delivery performance, *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 552–60.
- [14] C. Santoro, F. Soavi, A. Serov, C. Arbizzani, P. Atanassov, Self-powered supercapacitive microbial fuel cell: The ultimate way of boosting and harvesting power, *Biosens. Bioelectron.* 78 (2016) 229–35.
- [15] Y. Zhang, I. Angelidaki. Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges, *Water. Res.* 56 (2014) 11–25.
- [16] ES. Heidrich, SR. Edwards, J. Dolfing, SE. Cotterill, TP. Curtis, Performance of a pilot scale microbial electrolysis cell fed on domestic wastewater at ambient temperatures for a 12 month period, *Bioresour. Technol.* 173 (2014) 87–95.
- [17] A. Escapa, MI. San-Martín, R. Mateos, A. Morán, Scaling-up of membraneless microbial electrolysis cells (MECs) for domestic wastewater treatment: Bottlenecks and limitations, *Bioresour. Technol.* 180 (2015) 72–8.
- [18] ES. Heidrich, J. Dolfing, K. Scott, SR. Edwards, C. Jones, TP. Curtis, Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 6979–89.
- [19] W-W. Li, H-Q. Yu, Z. He, Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 911–24.
- [20] O. Lefebvre, A. Uzabiaga, IS. Chang, B-H. Kim, NY. Ng, Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment-a review and discussion from energetic consideration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 259–70.
- [21] B. Erable, L. Etcheverry, A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling.* 27 (2011) 319–26.
- [22] Q. Yang, H. Zhao, H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 512–4.
- [23] DR. Lovley, Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 4896–906.
- [24] CC. Viggi, E. Presta, M. Bellagamba, S. Kaciulis, SK. Balijepalli, G. Zanzaroli, et al., The “Oil-Spill Snorkel”: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 881.
- [25] BE. Logan, Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 1665–71.
- [26] A. Dewan, H. Beyenal, Z. Lewandowski, Scaling up Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7643–8.
- [27] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, *J. Power Sources* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- [28] W. Yang, BE. Logan, Immobilization of a Metal-Nitrogen-Carbon Catalyst on Activated Carbon with Enhanced Cathode Performance in Microbial Fuel Cells, *Chemosuschem* 9 (2016) 2226–32.
- [29] M. Oliot, L. Etcheverry, A. Mosdale, R. Basseguy, M-L. Délia, A. Bergel, Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance, *J. Power Sources* 356 (2017) 389–99.
- [30] C. Santoro, S. Babanova, P. Atanassov, B. Li, I. Ieropoulos, P. Cristiani, High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode, *J. Electrochem. Soc.* 160 (2013) H720–6.
- [31] P. Ledezma, A. Stinchcombe, J. Greenman, I. Ieropoulos, The first self-sustainable microbial fuel cell stack, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 2278–81.

- [32] IA. Ieropoulos, A. Stinchcombe, I. Gajda, S. Forbes, I. Merino-Jimenez, G. Pasternak, et al., Pee power urinal – microbial fuel cell technology field trials in the context of sanitation, *Environ Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 336–43.
- [33] VB. Oliveira, M. Simoes, LF. Melo, AMFR. Pinto, Overview on the developments of microbial fuel cells, *Biochem. Eng. J.* 73 (2013) 53–64.
- [34] M. Olliot, S. Galier, H. Roux de Balmann, A. Bergel, Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review, *Appl. Energy*. 183 (2016) 1682–704.
- [35] M. Olliot, L. Etcheverry, A. Bergel, Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 691–6.
- [36] B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, et al., Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 276–84.
- [37] E. Blanchet, B. Erable, M-L. De Solan, A. Bergel, Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste, *Electrochem. Commun.* 66 (2016) 38–41.
- [38] R. Lacroix, S. Da Silva, MV. Gaig, R. Rousseau, M-L. Delia, A. Bergel, Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 22892–902.
- [39] B. Cercado-Quezada, M-L. Délia, A. Bergel, Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 440–3.
- [40] S. Parot, M-L. Delia, A. Bergel, Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4809–16.
- [41] D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M-L. Delia, A. Bergel, Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 13332–43.
- [42] B. Demirel, P. Scherer, The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7 (2008) 173–90.
- [43] DA. Finkelstein, LM. Tender, JG. Zeikus, Effect of Electrode Potential on Electrode-Reducing Microbiota, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6990–5.
- [44] R. Rousseau, C. Santaella, A. Bonnafous, W. Achouak, J-J. Godon, M-L. Delia, et al., Halotolerant bioanodes: The applied potential modulates the electrochemical characteristics, the biofilm structure and the ratio of the two dominant genera, *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 112 (2016) 24–32.
- [45] SM. Strycharz, AP. Malanoski, RM. Snider, H. Yi, DR. Lovley, LM. Tender, Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 896–913.
- [46] R. Rousseau, M-L. Delia, A. Bergel, A theoretical model of transient cyclic voltammetry for electroactive biofilms, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 1079–94.
- [47] M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable, A. Bergel, Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives, *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 16 (2014) 16349–66.
- [48] B. Christgen, K. Scott, J. Dolfing, IM. Head, TP. Curtis, An Evaluation of the Performance and Economics of Membranes and Separators in Single Chamber Microbial Fuel Cells Treating Domestic Wastewater, *Plos. One.* 10 (2015) e0136108.
- [49] A. Carmona-Martinez, R. Lacroix, S. Da Silva, E. Trably, N. Bernet, On the modeling of the surface area that actually contributes to the current density produced in microbial electrochemical systems, EU-ISMET, 2nd European meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, 2014; Alcalá de Henares, Spain.
- [50] H. Yan H, MD. Yates, JM. Regan, Effects of constant or dynamic low anode potentials on microbial community development in bioelectrochemical systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 9319–29.
- [51] AS. Commault, G. Lear, MA. Packer, RJ. Weld, Influence of anode potentials on selection of *Geobacter* strains in microbial electrolysis cells, *Bioresour. Technol.* 139 (2013) 226–34.

3. Conclusions du Chapitre 4

L'assemblage d'une anode microbienne et d'une cathode à air abiotique pour construire une PCM est un réel challenge tant les conditions optimales de chacune sont différentes.

Les nombreuses tentatives d'optimisation de la cathode à air ont été quelque peu décevantes. Améliorer le contact électrique entre la cathode et le collecteur de courant par un système de vissage d'une couronne latérale avec un joint torique est la seule option qui a conduit à une amélioration notable des performances de l'électrode. Par ailleurs, la faible tenue mécanique de la couche active de la cathode, qui empêche tout nettoyage de l'électrode en cas d'encrassement, reste un verrou majeur dans la conception d'une PCM, particulièrement pour les opérations de long terme. Ces résultats vont conditionner l'architecture du prototype PCM, comme cela sera développé dans le Chapitre 5. Pour l'instant, il est apparu essentiel de retarder le plus possible l'encrassement de la cathode. Une grande partie des travaux dédiés à l'amélioration de la bioanode a donc eu pour objectif de simplifier le milieu réactionnel, en s'extrayant du lixiviat de terreau initial qui permet de former des bioanodes efficaces mais qui est épais et colmatant.

Les tentatives d'acclimatation de la bioanode à des milieux alcalins n'ont pas été couronnées de succès. Cette option a été abandonnée, d'autant plus opportunément que les tests menés sur les cathodes à air ont fait douter de sa justification. Les essais destinés à alléger la composition du lixiviat de terreau ont démontré qu'il devait (malheureusement) être le plus complet possible pour assurer la formation de bioanodes efficaces de façon reproductible. Il y aurait d'ailleurs là une réflexion intéressante à initier sur la localisation des microorganismes électroactifs au sein du terreau et donc sur la nécessité de garder des particules solides au sein du lixiviat. Toutefois, l'objectif de la thèse et du projet Bioelec étant de développer l'ingénierie des PCMs, nous n'avons pas approfondi ce point plus fondamental.

Le lixiviat sous sa forme la plus complète étant nécessaire pour former les bioanodes, il a été décidé de se diriger vers une stratégie en deux étapes. Dans un premier temps, la bioanode est formée dans du lixiviat de terreau puis, dans une seconde étape, dans un milieu synthétique. Le remplacement du lixiviat par un milieu synthétique est une étape primordiale pour retarder le (bio)fouling de la cathode à air au sein d'une pile.

Diverses combinaisons ont été testées pour réaliser ces deux étapes, essentiellement pour vérifier s'il était nécessaire de polariser les électrodes tout au long du processus. La réponse est claire : pour assurer la reproductibilité des résultats, la polarisation tout au long de l'expérience est nécessaire, aussi bien pour la première étape dans le lixiviat de terreau que pour la seconde dans le milieu synthétique. Toutefois, il convient de noter que des résultats intéressants, mais peu reproductibles, ont été obtenus en plongeant d'abord l'électrode non polarisée dans le lixiviat puis en utilisant cet échantillon pour inoculer le milieu synthétique. Certes, le manque de reproductibilité a condamné la méthode dans le contexte de ce projet, mais on pourrait voir là une procédure intéressante pour échantillonner facilement toutes sortes de milieux naturels. Jeter, immerger ou enfouir un échantillon de matériau d'électrode non connecté dans un milieu naturel, et ensuite utiliser cet échantillon comme inoculum au laboratoire, pourrait être une procédure commode et efficace. On peut ainsi espérer une sélection des microorganismes les plus aptes à former un biofilm sur le matériau de l'électrode. Vu la simplicité de la méthode, le manque de reproductibilité pourrait être pallié par la multiplication du nombre des échantillons. Il n'a pas été entrepris d'explorer cette piste hasardeuse car elle nous aurait trop détourné de l'objectif du projet.

Les bioanodes peuvent être dupliquées au sein du milieu synthétique. C'est un résultat important car il n'est donc pas nécessaire de repartir du lixiviat de terreau initial. Une bioanode, dite primaire, peut être utilisée comme inoculum pour former une nouvelle génération de bioanode, dite secondaire. Cette méthode très efficace permet de former des bioanodes secondaires de façon reproductible, en un temps relativement court (5 jours) et avec des densités de courant égales à celles de la bioanode primaire de l'ordre de 25 A.m^{-2} .

Parmi les améliorations de la procédure de formation des bioanodes, notons qu'il a été démontré que la température pouvait être portée à 40°C pour gagner du temps et que les bioanodes étaient ensuite capables d'opérer à température ambiante. Enfin, une concentration maintenue en acétate permet d'augmenter les performances et de réduire le temps de formation. En conclusion, il est maintenant possible de former en quelques jours des bioanodes délivrant jusqu'à 30 A.m^{-2} en milieu synthétique.

Enfin, une première tentative d'extrapolation a mis en lumière toute la difficulté à accroître la taille des bioanodes. Bien que le changement d'échelle soit modeste, de 9 à 50 cm^2 , et qu'il ait été effectué dans des conditions électrochimiques bien contrôlées, la perte de performance est significative. L'approche combinée entre expérience et modèle a permis d'attribuer une partie de la perte de performance à la chute ohmique et à la non-uniformité du potentiel local de l'électrode. Cependant, ces causes bien identifiées par le modèle n'expliquent pas la totalité de la perte de performance lors du passage de 9 à 50 cm^2 . Il semble que le problème soit exacerbé par la sensibilité du biofilm à la distribution du potentiel local. La colonisation des bioanodes de 50 cm^2 est non-uniforme et semble corrélée avec la distribution locale de potentiel. On peut supposer que les propriétés électrocatalytiques du biofilm varient en fonction du potentiel local, ce qui exacerbe la perte de performances lorsque la taille de l'électrode croît. Dans une optique d'extrapolation, il est bien sûr impératif de limiter la chute ohmique au sein de la PCM, mais il faut également veiller à conserver un potentiel uniforme sur l'ensemble de la surface de l'électrode, sous risque de provoquer des hétérogénéités de développement du biofilm. Dans un objectif plus fondamental, il faudrait promouvoir la recherche de corrélations entre le développement de biofilms électroactifs et le potentiel appliqué, afin d'en tirer des règles d'optimisation plus précises.

CHAPITRE 5 : Optimisation d'une pile à combustible microbienne

1. Contourner le biofouling de la cathode à air grâce à l'architecture de « pile à combustible microbienne (PCM) avec cathode amovible » (Publication 3).....	183
2. Augmenter la surface de la cathode à air.....	196
2.1. Prototype « Multiple Air-Cathodes » ou « MAC ».....	196
2.1.1. Description du prototype	196
2.1.2. Résultats expérimentaux d'une pile à combustible microbienne avec une bioanode plane	197
2.1.3. Analyse de la contribution des cathodes à air	198
2.1.4. Résultats expérimentaux de piles à combustible microbiennes avec une bioanode tridimensionnelle	200
2.2. Prototype « Cube »	201
2.2.1. Description du prototype	201
2.2.2. Résultats avec le prototype « Cube ».....	203
2.2.3. Extrapolation du prototype grâce au modèle numérique	203
3. L'Assemblage Séparateur-Electrodes (ASE) avec une bioanode tridimensionnelle et une cathode à air amovible booste les performances d'une pile à combustible microbienne (Publication 4)	207
4. Conclusions du Chapitre 5	229

Le chapitre 5 présente les quatre architectures de piles à combustible microbiennes (PCMs) testées dans le cadre de ce travail de thèse. Chaque prototype est élaboré dans le but de répondre à une problématique donnée et tous suivent une ligne directrice commune: contourner le biofouling de la cathode à air avec un dispositif qui permette le démontage facile de l'électrode sans vidanger l'électrolyte et sans altérer la bioanode.

Le premier prototype de PCM avec une architecture de cathode à air amovible avait été conçu préalablement au démarrage de la thèse. La première partie du chapitre décrit les tests réalisés sur une version améliorée de ce prototype. Ils mettent en lumière tout l'intérêt de cette stratégie, bien au-delà des bénéfices pressentis initialement.

Les deux réacteurs présentés dans la seconde partie de ce chapitre sont élaborés dans le but d'augmenter la surface de la cathode à air. La cinétique de réduction de l'oxygène à des pH proches de la neutralité est lente et la cathode est donc connue pour être l'électrode limitante dans une PCM. Deux architectures sont conçues pour augmenter la surface de la cathode par rapport à une bioanode donnée. La première dite « Multiple Air Cathode » permet d'utiliser l'acronyme MAC. Relativement originale, elle consiste à plonger dans l'électrolyte des structures de cathodes fermées à l'électrolyte qui sont alimentées en air par le haut. La seconde dite « Cube » a bénéficié des talents de l'atelier du LGC pour fabriquer des prototypes cubiques qui permettent de disposer jusqu'à quatre cathodes planes autour d'une bioanode.

Enfin, un des verrous majeurs des PCMs est lié à la faible conductivité de l'électrolyte imposée par la faible tolérance des microorganismes aux fortes salinités. Le dispositif « Assemblage Séparateur-Electrode » ou « ASE » présenté dans la dernière partie du chapitre a pour objectif initial de minimiser la résistance interne en diminuant la distance entre l'anode microbienne et la cathode. Les ASEs sont présents dans la bibliographie la plus récente sur les PCMs. Toutefois le dispositif conçu ici est original car il inclut, pour la première fois à notre connaissance, une cathode amovible. Il apparaîtra que là encore, les résultats furent au-delà des attentes.

1. Contourner le biofouling de la cathode à air grâce à l'architecture de « pile à combustible microbienne (PCM) avec cathode amovible » (Publication 3)

Le fouling ou biofouling de la cathode à air est provoqué par le dépôt de matières organiques ou le développement de microorganismes à sa surface (cf. Chapitre 1). Ce phénomène est accentué dans une PCM dépourvue de séparateur. L'étude menée sur la formation de la bioanode (chapitre 4) a permis de déterminer une méthode qui limite le biofouling de la cathode en remplaçant le lixiviat de terreau par un milieu synthétique. Malgré tous nos efforts, ce phénomène reste toutefois inévitable sur le long terme. L'encrassement du milieu synthétique, initialement limpide, est observé à l'œil nu après quelques jours d'expérimentation. La présence de traces d'oxygène dans l'électrolyte, due au transfert au-travers de la cathode et peut-être à des défauts d'étanchéité des réacteurs, en est certainement la cause. Des bactéries planctoniques utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons prolifèrent dans le milieu et provoquent le biofouling de la cathode. Il n'est également pas exclu que des bactéries se détachant du biofilm participent à la pollution de l'électrolyte.

Plusieurs solutions ont été proposées pour combattre le biofouling de la cathode à air. Des études ont envisagé de placer un séparateur sur la face exposée à l'électrolyte (Song et coll., 2015), d'appliquer

un revêtement antimicrobien à la surface de l'électrode pour inhiber la formation de biofilm (Pu et coll., 2014), ou bien de modifier la composition de la cathode (X. Wang et coll., 2014; L. Zhou et coll., 2016). Ces solutions sont appliquées en amont de la conception de la pile. Or, le problème majeur de la plupart des PCM réside dans le fait que la cathode à air fait partie intégrante du système. Elle est installée au démarrage de la pile et ne peut être retirée pour être changée ou nettoyée sans avoir recours à une vidange de l'électrolyte, ce qui perturbe fortement la bioanode.

Une architecture innovante de PCM est développée dans ces travaux de thèse afin de facilement démonter la cathode à air pour la nettoyer ou la remplacer par une électrode neuve, sans avoir à vidanger l'électrolyte et sans altérer la bioanode. Ce prototype nommé « PCM avec cathode à air amovible » (Figure 29.B) est une version améliorée de celui conçu dans le cadre d'une thèse antérieure réalisée au laboratoire (Pocaznoi, 2012) (Figure 30.A).

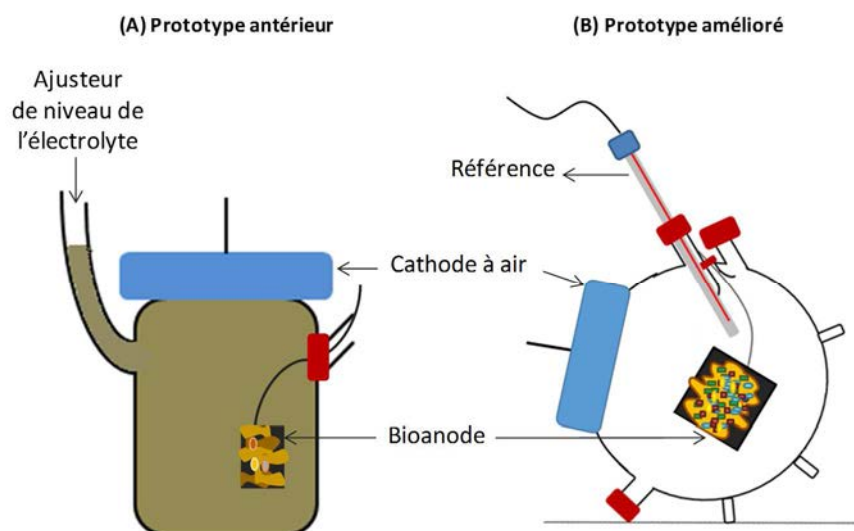


Figure 30. Schémas des prototypes « PCM avec cathode à air amovible » (A) prototype antérieur, (B) prototype amélioré utilisé dans ces travaux de thèse, ici en position horizontale.

Dans le prototype précédent, la cathode à air était placée horizontalement sur le dessus du réacteur. Des bulles de dioxyde de carbone produites lors du fonctionnement de la pile pouvaient s'accumuler sous la cathode et créer une sorte de mousse qui altérait le contact ionique entre la cathode et l'électrolyte. De plus, l'ajustement du niveau de l'électrolyte pour compenser l'évaporation s'effectuait par le biais du tube latéral, ce qui ne permettait pas de vérifier de manière précise si le contact cathode-électrolyte était bien établi. Par ailleurs, le prototype ne permettait pas la mesure des cinétiques des électrodes car aucun piquage n'avait été prévu pour l'insertion d'une électrode de référence. Dans le nouveau prototype, la cathode à air est disposée quasi-verticalement sur le côté afin d'éviter l'accumulation de bulles et permettre ainsi un contact optimal avec l'électrolyte. Plusieurs piquages supplémentaires sont ajoutés pour l'insertion d'une électrode de référence et pour réaliser des prélèvements du milieu pour la mesure de la concentration du substrat.

Le réacteur « PCM avec cathode amovible » est conçu pour remplir trois fonctions distinctes :

- 1 Former la bioanode par chronoampérométrie : le réacteur est en position verticale, c'est-à-dire avec le bouchon vissant au-dessus (Figure 31.A) ; la bioanode et l'électrode de référence sont placées sur le côté du réacteur et la contre-électrode est insérée par un piquage du bouchon vissant. A ce stade, la cathode à air n'est pas encore incorporée à la PCM, ce qui

permet d'éviter un fouling prématuré de sa surface avant même le commencement du fonctionnement en pile.

- 2 Fonctionner en pile : une fois qu'une bioanode mature est formée, le bouchon est dévissé et la contre-électrode retirée du système. Elle est remplacée par la cathode à air maintenue par un dispositif vissant qui la solidarise avec le collecteur de courant, une grille d'acier inoxydable (Chapitre 4, Figure 15). Le réacteur est ensuite basculé sur le côté, en position horizontale, afin de mettre la cathode à air en contact avec l'électrolyte (Figure 31.B). Le réacteur est maintenu dans cette position tout le long du fonctionnement en pile.
- 3 Remplacer la cathode à air : lorsque les performances de la cathode chutent, le réacteur est replacé en position verticale (Figure 31.A), la cathode est dévissée sans vidanger l'électrolyte. Une fois la cathode remplacée, le réacteur est rebasculé en position horizontale pour un fonctionnement en pile (Figure 31.B).

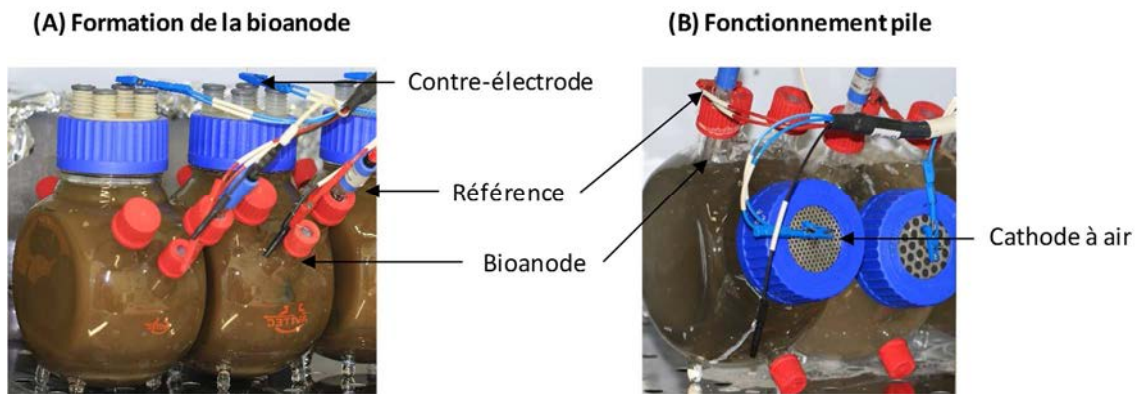


Figure 31. Photographies du prototype « PCM avec cathode à air amovible » en positions (A) de formation de la bioanode et (B) de fonctionnement pile.

Cette étude fait l'objet de la publication 3 « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells » publiée dans le journal *Bioresource Technology* (Année 2016, Volume 221, Pages 691-696).

Dans l'article qui suit, quatre PCMs sont analysées en parallèle. Deux sont équipées avec des bioanodes de surface projetée 9 cm^2 ($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$) et deux autres avec des bioanodes 50 cm^2 ($5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). Les conditions expérimentales de l'étude sont décrites dans le Tableau 22 et les dispositifs sont décrits en détails dans le Chapitre 2.

La procédure expérimentale est la suivante :

- Les bioanodes sont formées en chronoampérométrie pendant environ 20 jours dans du lixiviat de terreau puis du milieu synthétique ; chaque bioanode est ensuite associée à une cathode à air pour fonctionner en pile.
- Après 10 jours de fonctionnement en pile, la PCM avec une bioanode 9 cm^2 qui délivre la densité de courant la plus faible voit sa cathode à air remplacée par une cathode neuve.
- Après 18 jours de fonctionnement en pile, la cathode à air de l'une des PCMs avec une bioanode 50 cm^2 est également remplacée.
- Les deux autres piles conservent la même cathode à air tout au long des 25 jours de l'expérience pour comparaison.

L'étude expérimentale est couplée avec la modélisation numérique des réacteurs (procédure détaillée au Chapitre 3).

Tableau 22. Conditions expérimentales utilisées dans l'article 3 « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile avec une résistance de 33 à 100 Ω		
Réacteur : « PCM avec cathode à air amovible » - $S_{\text{cathode}} = 15.9 \text{ cm}^2$		
4 PCMs : 2 avec une bioanode de 9 cm ² et 2 avec une bioanode de 50 cm ²		
Bioanode : plane, tissu de carbone, $S_{\text{projetée}} = 9 \text{ cm}^2$ ou 50 cm ² , formée par procédure « polarisation complète », inoculum « lixiviat de terreau »		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	
Spectroscopie d'impédance électrochimique à potentiel imposé pour mesurer la chute ohmique		
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence		
Modèle numérique		
Distribution secondaire de potentiel		
Equations utilisées pour lisser les cinétiques expérimentales :		
Bioanode :	Contre-électrode :	
Butler-Volmer-Monod	Butler-Volmer	
$j = j_{\text{max}} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right)}{K_1 \exp\left(-\frac{(1-\alpha)n_e F}{RT} \eta\right) + K_2 \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right)$		$j = -j_0 \exp\left[\frac{-\alpha n_e F}{RT} \eta\right]$

Les principaux résultats présentés dans la publication sont les suivants :

- Tous les remplacements de cathode entraînent une augmentation immédiate de la puissance délivrée par la pile. Il est donc vérifié que le prototype « PCM avec cathode amovible » permet bien de remplacer une cathode à air encrassée par une cathode neuve sans perturber l'anode microbienne.
- Remplacer la cathode salie par une électrode neuve permet d'accroître la densité de puissance de 0.7 W.m⁻² jusqu'à 1.96 W.m⁻². Cette augmentation considérable révèle l'impact du fouling de la cathode sur les performances de la PCM.
- Le modèle numérique confirme que l'augmentation des performances des PCMs est effectivement due au remplacement de la cathode à air.
- Les courbes de puissance des PCMs montrent des performances stables au cours des premiers jours de fonctionnement. Le tracé des cinétiques de la bioanode et de la cathode à air montre que cette stabilité masque en réalité deux phénomènes antagonistes : la dégradation rapide de la cinétique de la cathode d'une part et l'amélioration de la bioanode d'autre part.

Ce dernier résultat est particulièrement important car il révèle que l'impact du fouling des cathodes à air est plus important que suspecté jusqu'à présent dans l'état de l'art. En effet, tous les travaux reportés dans la bibliographie utilisent des piles pour lesquelles cathode et bioanode sont disposées en même temps dès le début des expériences. La cathode se salit rapidement dès les premiers jours pendant que la bioanode s'améliore. Au cours des premiers jours de connexion avec la cathode à air, la bioanode voit ses performances s'améliorer, même si celle-ci a été préalablement formée par une

longue période de potentiel imposé et qu'elle délivre une densité de courant stable comme dans le présent travail. L'expérimentateur est donc satisfait de constater des performances stables de la PCM dès le début de son fonctionnement, mais cette apparente stabilité masque une importante dégradation initiale de la cinétique de la cathode compensée par l'amélioration de la bioanode. Ici, le remplacement de la cathode en cours de fonctionnement permet de « démasquer » l'importance du fouling de la cathode.

Les « Supplementary data » mentionnées dans l'article sont insérées en Annexe 2.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Short Communication

Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells



Manon Oliot*, Luc Etcheverry, Alain Bergel

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

HIGHLIGHTS

- An innovative MFC design allowed the air-cathode to be removed and replaced.
- Replacing the air-cathode immediately boosted power density from 0.7 to 1.96 W/m².
- Initial biofouling of air-cathodes may be a widespread cause of underperformance.
- Air-cathode replacement was modelled numerically.

Abstract

An innovative microbial fuel cell (MFC) design is described, which allows the air-cathode to be replaced easily without draining the electrolyte. MFCs equipped with 9-cm² or 50-cm² bioanodes provided 0.6 and 0.7 W.m⁻² (referred to the cathode surface area) and were boosted to 1.25 and 1.96 W.m⁻², respectively, when the initial air-cathode was replaced by a new one. These results validate the practical interest of removable air-cathodes and evidence the importance of the cathode biofouling that takes place during the MFC starting phase. As this biofouling is compensated by the concomitant improvement of the bioanodes it cannot be detected on the power curves and may be a widespread cause of performance underestimation

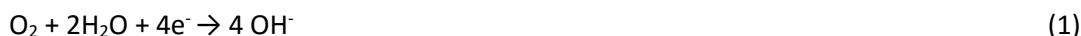
Keywords : Bioelectrochemical system; Bioanode; Reactor design; Numerical modelling

1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) can convert the chemical energy contained in a large variety of organic compounds into electrical energy. Such systems are composed of a microbial anode, which catalyses the oxidation of organic matter and is associated with a cathode, which is most often an abiotic air-cathode that ensures oxygen reduction (Ahn et al. 2014) (Ye et al. 2016). Considerable advances have been made in bioanodes (Rimboud et al. 2014) but, in contrast, the oxygen-reducing cathodes remain a major rate-limiting step. There are several reasons for this, including the modest solubility of oxygen in water, the poor efficiency of O₂-reduction catalysts at the neutral pH values that are required to grow microbial anodes and, particularly in the case of abiotic air-cathodes, sensitivity to fouling.

When implemented in an MFC, the side of the air-cathode in contact with the electrolyte is exposed to a solution rich in microorganisms, organic compounds and salts. Bacteria colonize the cathode

surface, forming a biofilm (Ma et al. 2014) (Rismani-Yazdi et al. 2008), which may hinder the transport of the hydroxide ions away from the electrode and consequently enhance alkalization in the vicinity of the cathode surface (Ma et al. 2014) (Yuan et al. 2013):



Local alkalization is detrimental to the oxygen reduction reaction from the point of view of thermodynamics and it also contributes to the deactivation of the cathode via the precipitation of cations in the form of hydroxides and scale (Tlili et al. 2003), particularly Ca^{2+} or Mg^{2+} , which are commonly present in the MFC electrolytes (Santoro et al. 2013), (Ma et al. 2014), (Santini et al. 2015). Various solutions have been proposed to mitigate air-cathode biofouling (Chatterjee and Ghangrekar 2014), (Li et al. 2014), (Liu et al. 2015) including a separator to protect the cathode surface from organic compounds (Song et al. 2015), antimicrobial coating to mitigate biofilm formation (Pu et al. 2014), or modification of the cathode composition (Wang et al. 2014), (Zhou et al. 2016).

The solutions envisioned so far are one-shot options, i.e. they are designed at the beginning of the MFC's life and do not allow intervention during MFC operation. Once the air-cathode has been placed in the system, it cannot be removed without draining the anolyte because the air-cathode is generally part of the cell wall. With common MFC architecture, removing the air-cathode results in the loss of a large part of the electrolyte, which could severely disturb the bioanode, through exposure to ambient air, for instance.

The present study describes an innovative MFC design, which allows the air-cathode to be replaced easily. The fouled air-cathode can thus be cleaned or replaced without changing the electrolyte and without altering the bioanode. Surprisingly, using this new device to change the air-cathode in the course of MFC operation revealed the unsuspected magnitude of initial biofouling, which may have been a widespread cause of underestimation of MFC performance up to now.

3. Results and discussion

3.1. MFC operation

Bioanodes were formed under chronoamperometry (CA) at -0.2 V/SCE in compost leachate for 20 days. The electrolyte was then replaced by a synthetic medium, without inoculum, for 10 additional days of CA, before switching to MFC operation. The aim of this procedure was to work in a clean medium and thus to avoid as much (bio)fouling of the air-cathode surface as possible. Four MFCs were run in identical conditions, two with bioanodes of 9 cm^2 geometrical area and two with bioanodes of 50 cm^2 geometrical area.

At day 0, the two MFCs equipped with 9-cm^2 bioanodes gave similar power curves and similar maximum power, around 1 mW (Fig. 2.A and 2.B). The power curves did not display a symmetrical bell shape, the right parts (low resistance, high current) being close to vertical. As already explained (Pocaznoi et al. 2012), this behaviour identified the rate-limiting effect of the bioanode. In contrast, the two 50-cm^2 bioanodes led to symmetrical bell-shaped power curves (Fig. 3A and 3B). Because of their large surface area in comparison to the air-cathodes of 15.9 cm^2 , the 50-cm^2 bioanodes did not limit the MFC performance. The rate-limiting effect of the 9-cm^2 bioanodes was confirmed by current-potential ($i\text{-E}$) curves (Fig. 2.C), which showed a maximum current plateau starting at around 4.8 mA .

For resistances lower than 100 Ω , the bioanodes were not able to produce more than the 4.8 mA. At the same time, the air-cathodes gave a conventional i-E curves of oxygen reduction (Fig. 2.C).

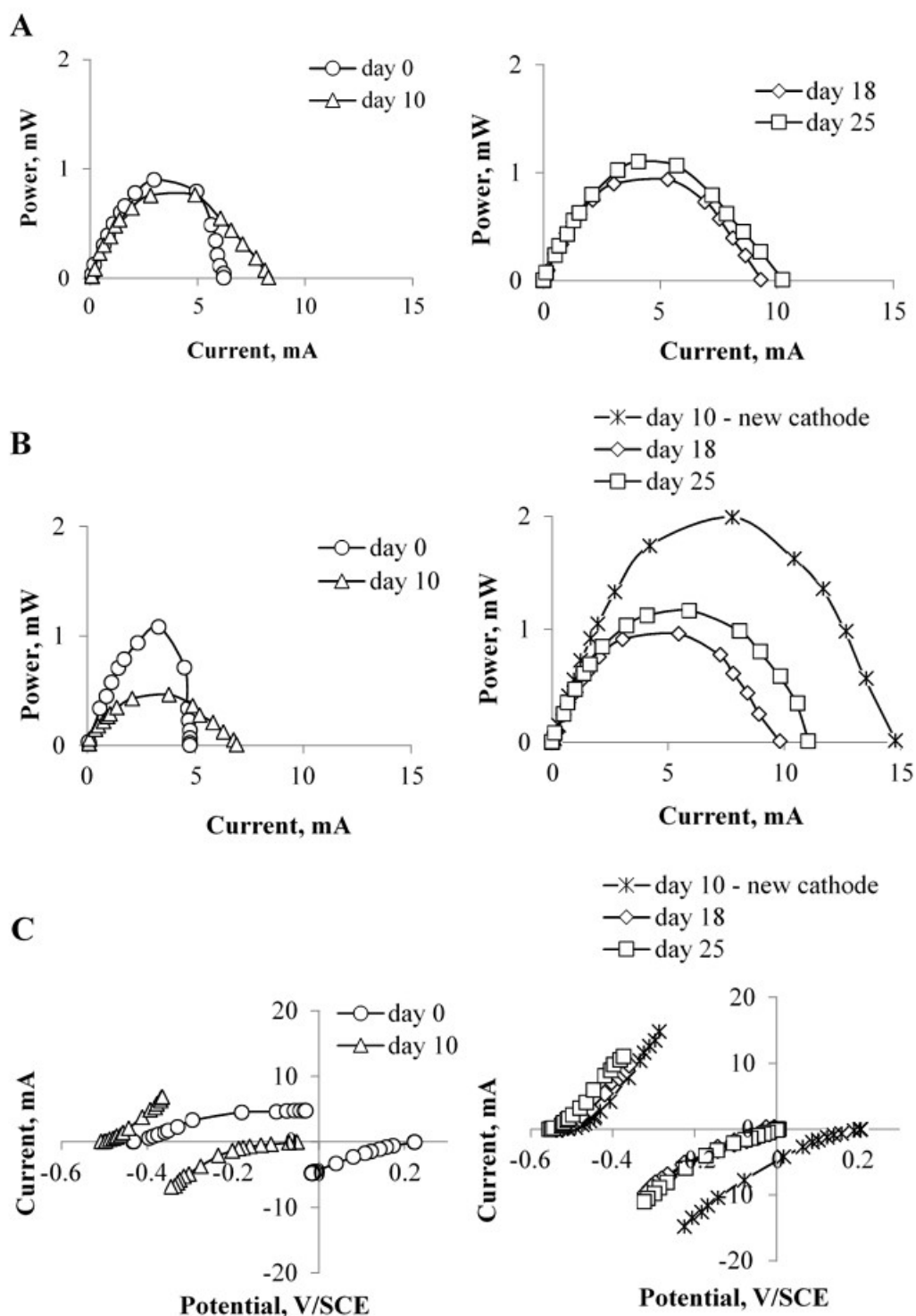


Fig. 2. Power curves in MFC operation with a 9-cm² bioanode, (A) the air-cathode was not changed; (B) duplicate with the air-cathode changed at day 10; (C) electrode kinetics (i-E curves) for the MFC characterized in (B) with the air-cathode changed at day 10.

At day 10, the i-E curve of each bioanode showed improved kinetics (Fig. 2C and 3C). The 9-cm² bioanodes were able to provide up to 6.8 mA, and all the i-E curves were shifted by around 70 mV towards negative potentials in comparison to the i-E curves recorded at day 0. The open circuit potential (OCP) decreased by 50 + 14 mV (average for the 4 bioanodes).

In contrast, the air-cathodes lost a considerable proportion of their efficiency during the same period (Fig. 2.C). The cathode OCPs decreased by 212 + 45 mV (average for the 4 cathodes) and the i-E curves as a whole were shifted towards negative potentials. Such a performance decrease is usually attributed to biofouling of the air-cathode surface (Ma et al. 2014) (Rismani-Yazdi et al. 2008). Here, an extensive slimy film, including a thick brown deposit, was visible with the naked eye on the side of the air-cathode in contact with the solution (Fig. 1 in Supplementary Data). Epifluorescence microscopy confirmed the presence of microorganisms on the surface, whereas no microorganisms were initially present on the surface of the clean air-cathode (Fig. 1 in Supplementary Data).

The behaviour of the MFC during the initial period of operation was consequently the result of two opposite phenomena:

- the improvement in the bioanode kinetics,
- the decrease in the air-cathode kinetics because of biofouling.

These two phenomena were confirmed by the four MFCs. The behaviour of each MFC is consequently controlled by the ratio of their strengths. When the air-cathode deterioration is greater than the bioanode improvement, the maximum power can decrease significantly, as was the case here with an MFC that produced 1 mW initially and 0.47 mW after 10 days (Fig. 2.B). When the two phenomena approximately cancel each other out, the MFC performance appears nicely stable, as was the case here for three MFCs. An MFC equipped with a 9-cm² bioanode produced 0.9 to 0.76 mW during the first 10 day period (Fig. 2.A), the two MFCs equipped with 50-cm² bioanodes delivered fairly stable power, around 1.2 mW.

After day 10, the three MFCs that continued to operate without change showed a stabilization of the cathode i-E curve. Thus, biofouling had a rapid detrimental effect on the clean air-cathodes and then led to stable degraded kinetics.

At day 10, the MFC equipped with a 9-cm² bioanode that showed the lowest performance had its air-cathode replaced by a new one. The design of the reactor allowed this operation to be achieved easily without draining the electrolyte or disturbing the bioanode. Maximum power immediately increased from 0.46 to 1.99 mW (Fig. 2.B and 2.B). The kinetics curves (Fig. 2.C) showed that, as expected, the replacement of the air-cathode did not affect the bioanode. This confirmed the suitability of the reactor design and of the cathode removal procedure. The increase in MFC performance is explained by the efficiency of the new air-cathode, which showed an OCP of 0.2 V/SCE. Performance was higher than at the beginning of the experiment, confirming the improvement of the bioanode during the first 10-day period. The air-cathode i-E curves then showed the same trend as previously: the cathode firstly lost a part of its efficiency (day 18) and then stabilized (day 25).

The air-cathode was also replaced on an MFC equipped with a 50-cm² bioanode at day 18 (Fig. 3). Here again, the MFC performance immediately rose, reaching 3.12 mW. After a few days, the air-cathode tended to become biofouled and the power production decreased.

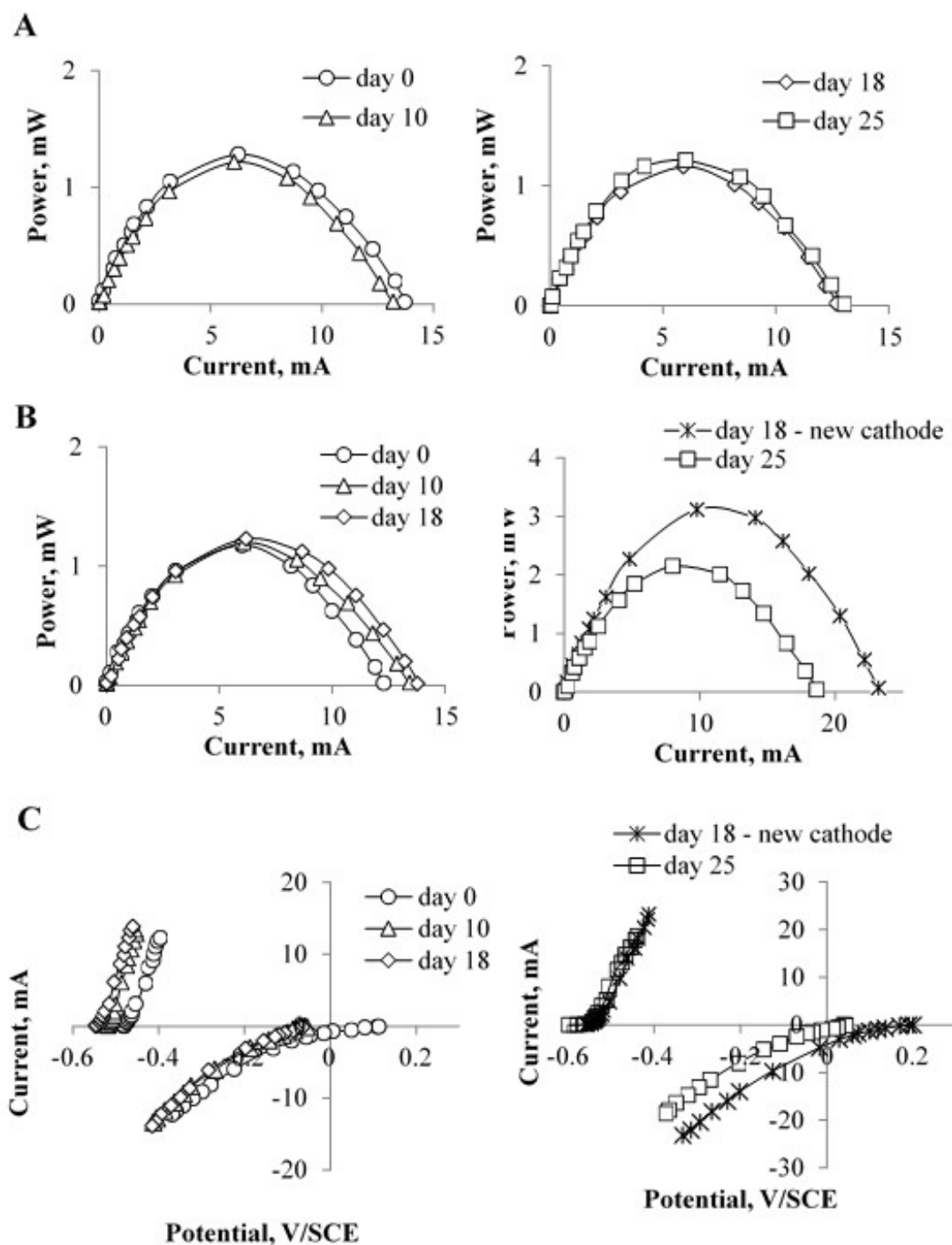


Fig. 3. Power curves of MFCs equipped with a 50-cm² bioanode, (A) the air-cathode was not changed; (B) duplicate with the air-cathode changed at day 18; (C) electrode kinetics (i-E curves) for the MFC characterized in (B) with the air-cathode changed at day 18.

Air-cathode replacement was modelled numerically. The power curves were firstly modelled using the experimental i-E curves of the bioanode and the air cathode, which were recorded just before the cathode was changed. The numerical power curves overlapped the experimental data perfectly in all cases, without any parameter having to be adjusted, which demonstrated the validity of the model (Figure 2 in Supplementary Data).

The model was then run in an identical way, but using the i-E curve of a clean air-cathode. The numerical power curves were close to the experimental curves that were recorded just after the air-

cathode replacement. The experimental maximum powers were 1.99 and 3.12 mW for the MFCs equipped with a 9-cm² and a 50-cm² bioanode, respectively, while the model gave 1.84 and 3.19 mW. The model confirmed that the improvement of the cathode kinetics was responsible for the considerable improvement of the MFC performance. For the MFC equipped with the 9-cm² bioanode, the slightly lower numerical value indicated a small improvement of the bioanode kinetics, which may have been due to the gentle movement of the electrolyte during cathode replacement. The perfect match between the experimental data and the numerical data obtained by just changing the air-cathode kinetics confirmed the suitability of the reactor design to enable the air-cathode to be changed without significantly disturbing the bioanode.

3.2. Discussion

Power densities were calculated with respect to the air-cathode surface area, which was equal to 15.9 cm² for each MFC. Before the air-cathode was changed, power densities around 0.6 and 0.7 W.m⁻² were produced by the MFCs equipped with the 9-cm² and the 50-cm² bioanodes, respectively. The kinetics curves of the bioanodes and air-cathodes showed that the apparent power stability during the early days resulted from the concomitant cathode degradation and bioanode improvement. Actually, the bioanode improvement masked the degradation of the cathode kinetics during the starting period. After this period, the air-cathode ensured rather stable kinetics for several weeks.

Following these observations, it can be guessed that the maximum power that MFCs can produce may have been underestimated in numerous studies because the initial phase of air-cathode fouling is hard to detect considering the apparent stability of the power curves. Moreover, common MFC devices do not allow the air-cathode to be replaced without severely disturbing the system. Here, thanks to the removable-cathode design, replacing the air-cathode by a new one revealed the full potential of the MFCs. The new air cathodes boosted power density to 1.25 and 1.96 W.m⁻² on the MFCs equipped with the 9-cm² and the 50-cm² bioanodes, respectively. This significant power boost confirms the considerable involvement of the initial air-cathode fouling in limiting the MFC performance.

The design of the reactor proved to be fully efficient and practical for replacing the air-cathode without altering MFC operation. Actually, it would not be economically sustainable to throw away the cathode when it was changed and cleaning procedures should now be considered. This new MFC design is a strong incentive to direct some research work towards the design of cleanable air-cathodes. This research direction started to be envisioned very recently (Pasternak et al. 2016) and the efficiency of the removable air-cathode MFC described here should arouse considerably increased interest in this new research objective.

4. Conclusion

Replacing the air-cathode during MFC operation evidenced the great importance of the initial biofouling of the air-cathode, which is generally hard to detect because it is masked by concomitant bioanode improvement. The fast initial biofouling of air-cathodes may consequently have been a widespread cause of underestimation of MFC performance so far. The efficiency of the removable air-cathode design described here now incites researchers to direct future work towards cleanable air-cathodes.

Acknowledgments

This work benefited from the 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).

References

1. Ahn, Y., Zhang, F., Logan, B.E., 2014. Air humidity and water pressure effects on the performance of air-cathode microbial fuel cell cathodes. *J. Power Sources*. 247, 655-659
2. Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., Bergel, A., 2013. Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresource Technol.* 134, 276-284
3. Chatterjee, P., Ghangrekar, M.M., 2014. Preparation of a fouling-resistant sustainable cathode for a single-chambered microbial fuel cell. *Water Sci. Technol.* 69, 634-639
4. Lacroix, R., Da Silva, S., Viaplana Gaig, M., Rousseau, R., Delia, M-L., Bergel, A., 2014. Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *PCCP* 16, 22892-22902
5. Li, N., Liu, Y., An, J., Feng, C., Wang, X., 2014. Bifunctional quaternary ammonium compounds to inhibit biofilm growth and enhance performance for activated carbon air-cathode in microbial fuel cells. *J. Power Sources*. 272, 895-899
6. Liu, W., Cheng, S., Sun, D., Huang, H., Chen, J., Cen, K., 2015. Inhibition of microbial growth on air cathodes of single chamber microbial fuel cells by incorporating enrofloxacin into the catalyst layer. *Biosens. Bioelectron.* 72, 44-50
7. Ma, J., Wang, Z., Suor, D., Liu, S., Li, J., Wu, Z., 2014. Temporal variations of cathode performance in air-cathode single-chamber microbial fuel cells with different separators. *J. Power Sources*. 272, 24-33
8. Parot, S., Delia, M-L., Bergel, A., 2008. Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresource Technol.* 99, 4809-4816
9. Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2016. Regeneration of the power performance of cathodes affected by biofouling. *Appl. Energ.* 173, 431-37
10. Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M-L., Bergel, A., 2012. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *PCCP* 14, 13332-13343
11. Pu, L., Li, K., Chen, Z., Zhang, P., Zhang, X., Fu, Z., 2014. Silver electrodeposition on the activated carbon air cathode for performance improvement in microbial fuel cells. *J. Power Sources*. 268, 476-481
12. Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *PCCP* 16, 16349-16366.
13. Rismani-Yazdi, H., Carver, S.M., Christy, A.D., Tuovinen, I.H., 2008. Cathodic limitations in microbial fuel cells: an overview. *J. Power Sources*. 180, 683-694
14. Santini, M., Guilizzoni, M., Lorenzi, M., Atanassov, P., Marsili, E., Fest-Santini, S., Cristiani, P., Santoro, C., 2015. Three-dimensional X-ray microcomputed tomography of carbonates and biofilm on operated cathode in single chamber microbial fuel cell. *Biointerphases*. 10, 031009

15. Santoro, C., Cremins, M., Pasaogullari, U., Guilizzoni, M., Casalegno, A., Mackay, A., Li, B., 2013. Evaluation of water transport and oxygen presence in single chamber microbial fuel cells with carbon-based cathodes. *J. Electrochem. Soc.* 160, G3128-G3134
16. Song, J., Liu, L., Yang, Q., Liu, J., Yu, T., Yang, F., Crittenden, J., 2015. PVDF layer as a separator on the solution-side of air-cathodes: the electricity generation, fouling and regeneration. *Rsc Advances*. 5, 52361-52368
17. Tlili, M.M., Benamor, M., Gabrielli, C., Perrot, H., Tribollet, B., 2003. Influence of the interfacial pH on electrochemical CaCO₃ precipitation. *J. Electrochem. Soc.* 150, C765-C771
18. Wang, X., Feng, C., Ding, N., Zhang, Q., Li, N., Li, X., Zhang, Y., Zhou, Q., 2014. Accelerated OH⁻ transport in activated carbon air cathode by modification of quaternary ammonium for microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4191-4198
19. Ye, Y., Zhu, X., Logan, B.E., 2016. Effect of buffer charge on performance of air-cathodes used in microbial fuel cells. *Electrochem. Acta.* 194, 441-447
20. Yuan, Y., Zhou, S., Tang, J., 2013. In situ investigation of cathode and local biofilm microenvironments reveals important roles of OH⁻ and oxygen transport in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4911-4917
21. Zhou, L., Fu, P., Cai, X., Zhou, S., Yuan, Y., 2016. Naturally derived carbon nanofibers as sustainable electrocatalysts for microbial energy harvesting: a new application of spider silk. *Appl. Catal. B-Environ.* 188, 31-38

2. Augmenter la surface de la cathode à air

Comme indiqué dans les chapitres 1 et 4, la cathode à air se trouve être l'électrode limitante dans une PCM en raison de la faible efficacité des catalyseurs de réduction de l'oxygène à des pH proches de la neutralité. La conception de prototypes permettant d'augmenter la surface de la cathode par rapport à une bioanode donnée serait donc une solution pour surmonter ce verrou majeur de la technologie PCM. Deux tentatives dans ce sens sont décrites dans cette partie.

2.1. Prototype « Multiple Air-Cathodes » ou « MAC »

2.1.1. Description du prototype

Le prototype « Multiple Air-Cathodes » ou « MAC » est inspiré du réacteur développé par Tremouli et coll. (Tremouli et coll., 2015; Tremouli et coll., 2016) dans lequel les cathodes sont constituées de quatre tubes ouverts à l'air ambiant et partiellement plongés dans l'électrolyte d'une PCM cylindrique.

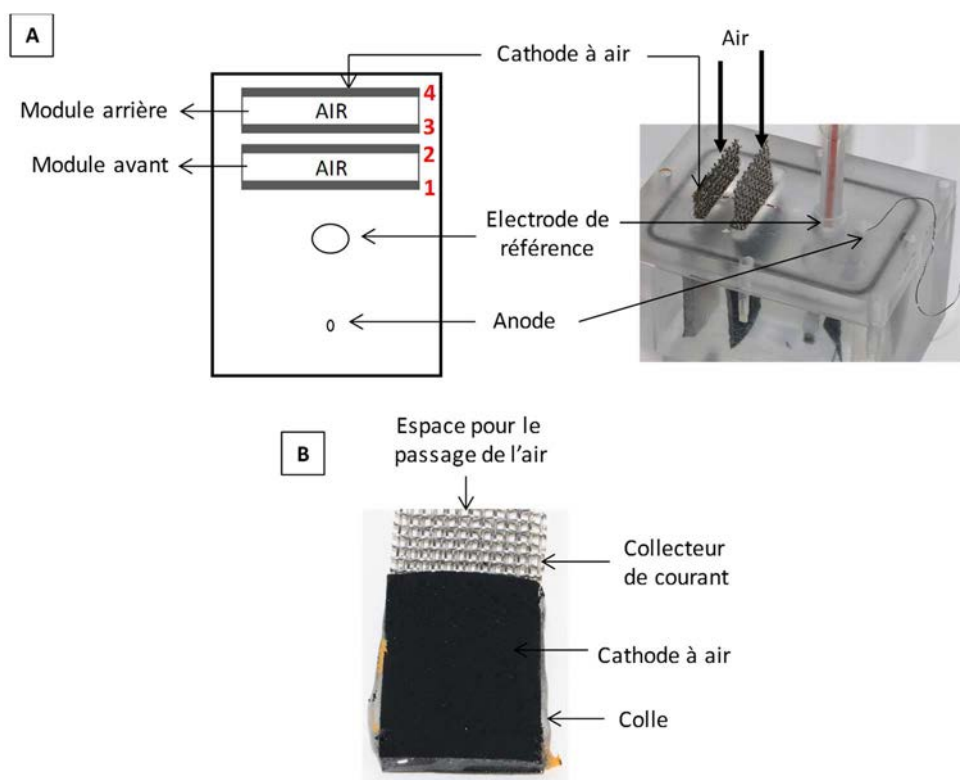


Figure 32. (A) Schéma et photographie du prototype « MAC ». (B) Photographie du module composé de deux cathodes à air fixées sur deux grilles en acier permettant l'accès de l'air et utilisées comme collecteur de courant.

Le réacteur élaboré dans cette partie des travaux est un parallélépipède creux en plexiglass avec un volume intérieur de 170 mL (Figure 32.A). Le couvercle pourvu d'un joint torique assure l'étanchéité du système et deux piquages circulaires permettant l'insertion de la bioanode et l'électrode référence. Deux fentes de 7 mm de largeur, situées à 2 cm (fente avant) et 3.5 cm (fente arrière) de la référence, sont conçues pour venir y glisser des modules de cathodes à air (Figure 32.B). Un module de cathodes est fabriqué artisanalement de cette façon : deux grilles de collecteur de courant en acier inoxydable (longueur 6.5 cm x largeur 3.5 cm) sont placées l'une contre l'autre, avec une forme légèrement bombée de sorte à créer un espace entre les deux pour assurer l'arrivée de l'air ambiant. Autour des

deux grilles, deux cathodes à air de surfaces égales, pouvant varier de 8 à 12 cm² selon les modules, sont assemblées l'une à l'autre en collant leurs bords respectifs, avec beaucoup de précaution pour ne pas altérer la couche active du catalyseur. Une fois confectionnés, les deux modules de cathodes à air sont délicatement insérés dans les fentes, avec une partie qui dépasse du réacteur pour permettre la connexion électrique et l'arrivée de l'air au centre du module. Le prototype finalisé comporte deux modules de cathodes, soit un total de quatre cathodes à air (numérotées de 1 à 4 sur la Figure 32.A). Les modules de cathodes sont maintenus dans le couvercle par simple coincement mécanique. Il serait ainsi possible de les changer facilement mais l'étanchéité du réacteur n'est pas assurée. Dans une version plus élaborée, on peut envisager un système qui assurerait une meilleure étanchéité tout en permettant de retirer les modules en cas de biofouling ou de détérioration des cathodes.

Deux configurations sont étudiées en connectant la bioanode soit à un seul module de cathodes (MAC 1), celui positionné le plus proche de l'électrode de référence (cathodes 1 et 2 de la Figure 32.A), soit aux deux modules de cathodes à air (MAC 2). Les PCMs sont analysées par mesure des courbes de puissance et des cinétiques des électrodes (dispositifs décrits dans le Chapitre 2). Pour chaque mesure, les deux configurations MAC 1 et MAC 2 sont testées l'une à la suite de l'autre, et aucun ajout d'acétate n'est effectué entre les deux mesures de courbe de puissance. Les conditions expérimentales de cette étude sont résumées dans le Tableau 23.

Tableau 23. Conditions expérimentales de l'étude du prototype « Multiple Air-Cathodes ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile avec une résistance de 22 à 100 Ω		
Réacteur : « MAC » - S _{cathode} varie de 8 à 12 cm ²		
3 PCMs : 1 avec une bioanode plane et 2 avec une bioanode tridimensionnelle		
Bioanode : formée par procédure « polarisation complète », inoculum « lixiviat de terreau »		
- plane, tissu de carbone, S _{projetée} = 9 cm ²		
- tridimensionnelle, tissu de carbone, S _{projetée} = 12.25 cm ²		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	
Voltammétrie cyclique : 1 mV.s ⁻¹	Aller : OCP → -0.5 V/ECS puis Retour : -0.5 → OCP V/ECS	

2.1.2. Résultats expérimentaux d'une pile à combustible microbienne avec une bioanode plane

Un premier prototype de MAC est réalisé avec une bioanode plane rectangulaire de surface projetée 9 cm² (3 cm x 3 cm). La courbe de puissance dans la configuration MAC 1 (un seul module de cathode connecté) présente la forme classique d'une cloche symétrique avec une puissance maximale de 1.8 mW et un courant maximal de 12.6 mA (Figure 33.A, marqueurs carrés). Chaque point correspond à une mesure réalisée à une valeur de résistance donnée. Plus la résistance aux bornes de la pile diminue, plus le courant délivré augmente jusqu'à 12.6 mA. La bioanode montre une cinétique classique d'oxydation de l'acétate catalysée par les microorganismes du biofilm démarrant vers -0.5 V/ECS. La réduction de l'oxygène débute à +0.2 V/ECS (Figure 33.B, marqueurs carrés).

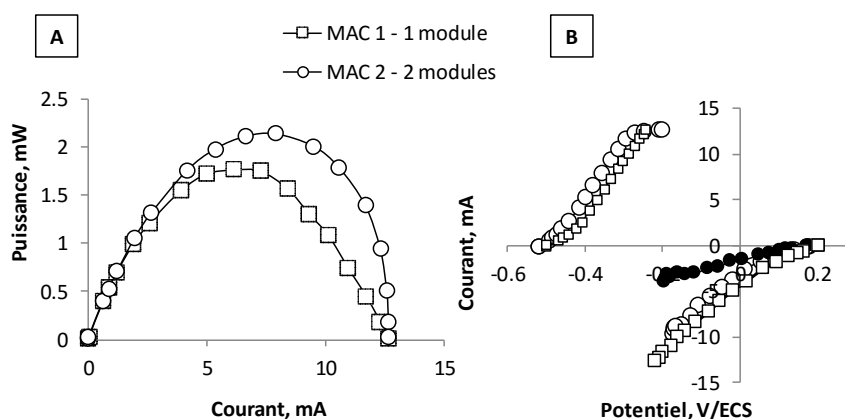


Figure 33. (A) Courbes de puissance expérimentales et (B) cinétiques des électrodes d'une PCM dans le prototype « MAC » avec une bioanode plane de surface projetée 9 cm². Carrés : configuration avec un module de cathodes à air (MAC 1). Ronds : deux modules de cathodes à air (MAC 2) ; pour MAC 2 la cinétique du module en position avant est représentée par les marqueurs ronds blancs et celle du module en position arrière par les marqueurs ronds noirs.

Connecter le second module de cathodes à air (configuration MAC 2) permet d'augmenter les performances de la pile de 20% et d'atteindre une puissance maximale de 2.1 mW (Figure 33.A, marqueurs ronds). Dans cette configuration MAC 2, la bioanode tend à devenir l'électrode limitante de la PCM. En effet, la courbe de puissance ne forme plus une cloche parfaitement symétrique mais révèle une branche légèrement verticale pour la partie correspondant aux courants élevés et aux faibles valeurs de résistance (Figure 33.A, marqueurs ronds). Cette allure, déjà observée dans le cas de PCMs, est identifiée comme une limitation de la bioanode (Pocaznoi et coll., 2012; Watson & Logan, 2011). Ce phénomène est d'ailleurs confirmé par la courbe intensité-potentiel de la bioanode (Figure 33.B, marqueurs ronds) qui montre un plateau limite en courant à 12.6 mA démarré vers -0.3 V/ECS. Pour des résistances inférieures à 10 Ω, la bioanode travaille dans une zone de potentiel correspondant à ce plateau limite. Quelle que soit la valeur de la résistance imposée au système, la bioanode n'est plus capable d'assurer un courant supérieur à celui du plateau limite. Elle devient l'électrode limitante de la PCM.

La mesure des cinétiques des électrodes renseigne également sur la contribution en courant de chaque module de cathodes à air. Lorsque les deux modules sont connectés à la bioanode (MAC 2), celui placé en position arrière (Figure 33.B, marqueurs ronds noirs) délivre des courants significativement plus faibles que le module en position avant (Figure 33.B, marqueurs ronds blancs), bien que leurs surfaces soient similaires. Au potentiel de -0.15 V/ECS, le module arrière ne délivre que 3.1 mA contre 8.6 mA pour le module avant. Il est logique que les performances du module arrière soient inférieures étant donné sa position plus éloignée dans le réacteur et la faible conductivité de l'électrolyte. De plus, les deux modules de cathodes à air ne sont espacés que de 1 cm, il est donc fort probable que le module avant gêne le déploiement des lignes de courant vers le module arrière (cathodes 2 et 3, Figure 32).

2.1.3. Analyse de la contribution des cathodes à air

Dans le but de vérifier expérimentalement l'effet de la position de la cathode sur son apport au courant total, un module spécifique est confectionné avec non pas deux cathodes collées de part et d'autre du collecteur en acier, mais une cathode à air d'un côté et une feuille de caoutchouc inerte de l'autre (Figure 33). L'objectif est ici de caractériser les performances de la cathode en fonction de sa position dans le réacteur, selon les différentes configurations 1 à 4 décrites dans la Figure 33.A. Pour ce faire,

un montage de type Nstat (dispositif décrit dans le Chapitre 2) est mis en place avec deux électrodes de travail :

- 1ère électrode de travail : la cathode du module spécifique.
- 2ème électrode de travail : les deux cathodes assemblées sur le module complet.

Les voltammétries cycliques correspondant à la cathode du module spécifique sont présentées dans la Figure 33.B pour les 4 configurations étudiées.

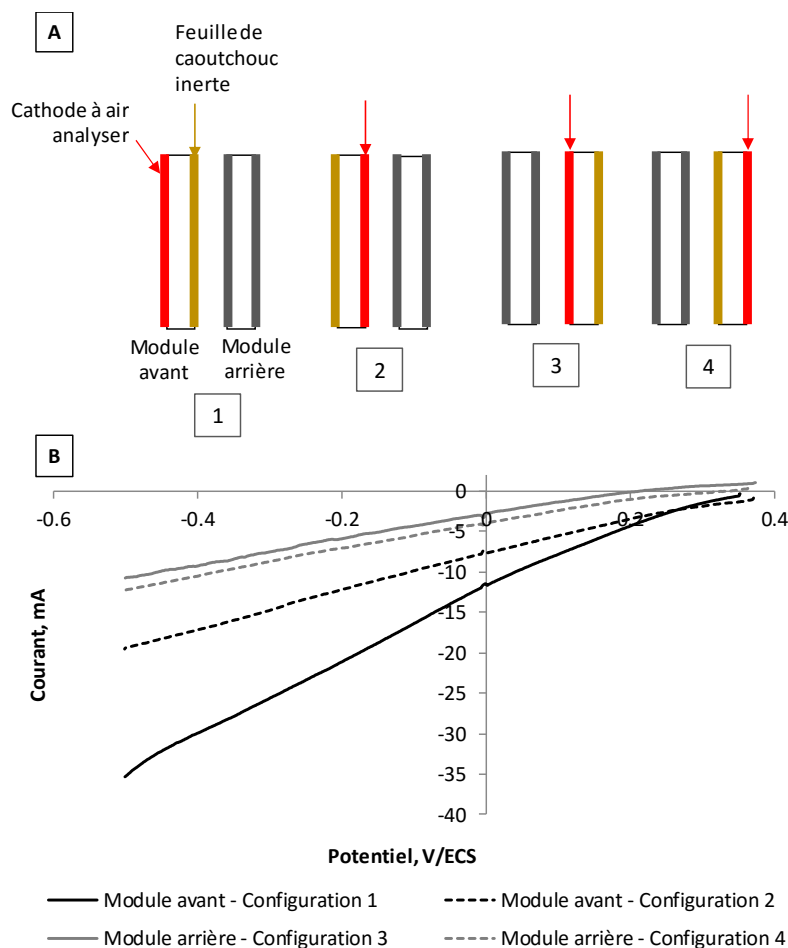


Figure 34. (A) Différentes configurations mettant en œuvre le module spécifique qui ne contient qu'une seule cathode à air (rouge) et une feuille en caoutchouc inerte (brun). (B) Voltammogrammes expérimentaux correspondants aux différentes configurations décrites en (A).

La position de la cathode a une influence marquée sur les courants délivrés. Les courants les plus forts sont atteints lorsque la cathode est placée le plus proche de la bioanode, soit au niveau du module avant (configurations 1 et 2, Figure 33, courbes noires). La cathode positionnée au premier plan (configuration 1) surpasse de loin les performances de toutes les autres. Au contraire, lorsque la cathode est placée au niveau du module arrière (configurations 3 et 4, Figure 33, courbes grises), les courants sont significativement plus faibles. Comme supposé précédemment, la cathode assurant les moins bonnes performances est celle de la configuration 3, située dans l'espace restreint entre les deux modules. Le courant délivré par les cathodes à air est donc conditionné par deux phénomènes : la distance plus ou moins éloignée par rapport à la bioanode et l'emplacement dans une zone plus ou moins difficile d'accès pour les lignes de champs dans l'électrolyte.

On peut observer que les voltammétries cycliques présentent toutes une allure de droite, ce qui laisse penser à la présence d'une résistance électrique importante. Il est à craindre que la méthode artisanale de formation des modules de cathodes à air ne permette pas d'assurer un contact électrique de qualité entre la cathode et le collecteur de courant.

2.1.4. Résultats expérimentaux de piles à combustible microbiennes avec une bioanode tridimensionnelle

La bioanode de géométrie plane devenant l'électrode limitante de la PCM dans la configuration MAC 2, il a été décidé de stopper les essais sur cette pile. Deux autres PCMs sont montées avec une bioanode tridimensionnelle de plus grande surface active afin de surmonter la limitation due à la bioanode. Les moyennes des puissances et courants maximaux mesurés expérimentalement, depuis le lancement en pile jusqu'au jour 12, sont reportés dans le Tableau 24.

Tableau 24. Puissances et courants maximaux mesurés expérimentalement pour deux prototypes « MAC » mis en œuvre avec une bioanode tridimensionnelle.

Jour	MAC 1 1 module de cathodes à air		MAC 2 2 modules de cathodes à air	
	P (mW)	i (mA)	P (mW)	i (mA)
0	2.7 ± 0.3	20.6 ± 1.2	2.9 ± 0.7	21.6 ± 4.3
1	1.6 ± 0.6	13.7 ± 6	2.3 ± 0.5	17.7 ± 4.2
4	1.2 ± 0.8	10.6 ± 5.7	1.7 ± 0.5	15.7 ± 4.6
8	0.9 ± 0.6	7.7 ± 4.6	0.8	8.3
12	0.7 ± 0.4	5.2 ± 2.3	0.9	8.7

Les performances des PCMs augmentent lorsque le second module de cathodes à air est connecté à la bioanode mais cette augmentation reste toutefois modeste. Les cinétiques cathodiques (courbes non présentées) montrent une fois de plus que le module placé en position arrière travaille moins efficacement que le module en position avant. Par ailleurs, les écarts types calculés sont élevés révélant un manque de reproductibilité des résultats d'une pile à l'autre.

La faible reproductibilité des résultats peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, la faible tenue mécanique de la couche active des cathodes à air, décrite dans le Chapitre 4, rend leur manipulation très délicate. La fabrication artisanale des modules de cathodes a pu endommager la couche active de certaines d'entre elles et entraîner des hétérogénéités. Par ailleurs, les modules sont extrêmement fragiles. Il a par exemple été observé pour l'un des prototypes qu'une des cathodes du module arrière s'est percée au huitième jour, provoquant l'immersion du module par l'électrolyte et sa mise hors d'usage.

Enfin, les performances des PCMs ne restent pas stables dans le temps et tendent à chuter dès le premier jour de fonctionnement en pile et ce jusqu'à la fin de l'étude (Tableau 24). Cette diminution des performances est causée par la concomitance de deux phénomènes mis en évidence par les courbes intensité-potentiel (courbes non présentées). La cinétique des cathodes se dégrade

légèrement, probablement dû à un léger fouling. Toutefois, la chute des performances est principalement due à la dégradation notable de la cinétique de la bioanode. Le petit volume du réacteur associé à une bioanode de grande surface a probablement entraîné une consommation rapide du substrat et des vitamines/nutriments du milieu réactionnel. Les périodes de carence entre chaque ajout de substrat et entre chaque remplacement du milieu synthétique par un milieu propre, ont sans doute perturbé les microorganismes du biofilm. Par ailleurs, les fentes dans lesquelles sont insérés les modules de cathodes ne sont pas hermétiquement fermées et permettent une entrée parasite d'oxygène dans le réacteur, ce qui est fortement néfaste au fonctionnement des bioanodes. L'évaporation du milieu réactionnel, assez rapide à la température de 40°C, est également un verrou technique inhérent à ce dispositif qui peut affecter la bioanode.

La faible stabilité des bioanodes dans ce type de réacteur et la fabrication complexe et non optimale des modules de cathodes nous ont incités à ne pas poursuivre cette direction. Le remplacement d'un module de cathodes encrassées ou abîmées n'a pas été étudié. Une voie d'amélioration de ce prototype a toutefois été envisagée avec le partenaire PaxiTech pour tenter simplifier et standardiser la fabrication des modules de cathodes à air.

2.2. Prototype « Cube »

2.2.1. Description du prototype

Le réacteur « Cube » est, comme son nom l'indique, un cube en plexiglass creux de 400 mL de volume intérieur (Figure 35). Ce type de prototype a déjà été rencontré dans la bibliographie (Katuri & Scott, 2011; B. Kim et coll., 2013).

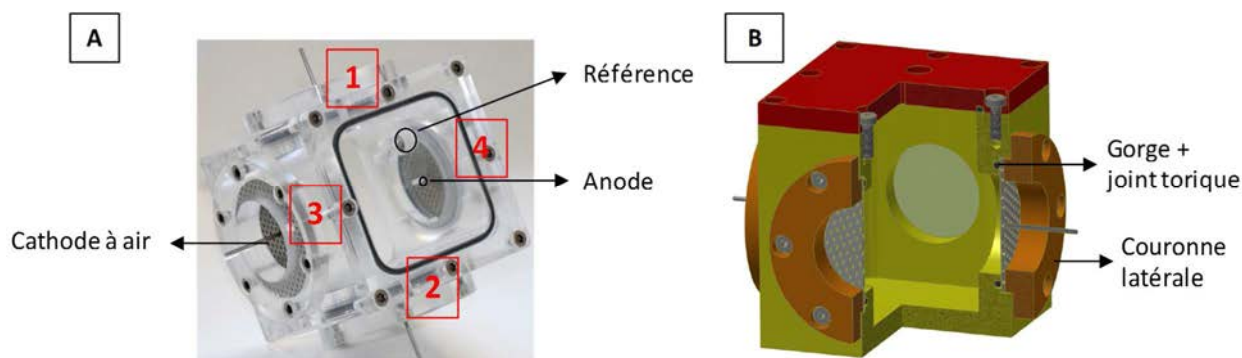


Figure 35. (A) Photographie et (B) représentation 3D (logiciel *Inventor*) du prototype « Cube » conçu au laboratoire.

Sur chacune des quatre faces latérales, une ouverture circulaire de diamètre 4 cm est usinée pour accueillir une cathode à air et un collecteur de courant. Le plaquage des deux éléments est réalisé mécaniquement par vissage d'une couronne contre le réacteur, avec un joint torique pour assurer l'étanchéité. Ce type de contact cathode-collecteur est défini dans ces travaux de thèse comme le plus efficace (partie 1 du Chapitre 4). De la même façon que le prototype « PCM avec cathode amovible », ce dispositif permet de retirer la cathode sans avoir à vidanger l'électrolyte, simplement en penchant le réacteur et en dévissant la couronne. Un couvercle, également muni d'un joint torique, est vissé sur le dessus du prototype. Il comporte deux piquages pour l'insertion de la bioanode et de l'électrode de référence, fermés hermétiquement afin d'éviter la fuite de l'électrolyte lorsque le réacteur est basculé pour remplacer une cathode. Grâce aux ouvertures situées sur chacune des faces latérales, ce

prototype permet d'insérer quatre cathodes à air. Autour d'une même bioanode, la surface de la cathode peut ainsi être augmentée de 12.6 cm² à 50.4 cm² suivant que l'on dispose une seule ou quatre cathodes.

Deux PCMs sont testées de manière indépendante, chacune composée d'une bioanode plane (3 cm x 3cm) placée au centre de l'électrolyte et de quatre cathodes à air. Le montage est décrit dans la section 3.2 du Chapitre 2. Trois configurations différentes sont étudiées (Figure 35.A) :

- Cube 1 : une seule des quatre cathodes (cathode n°1) est connectée à la bioanode. Dans cette configuration, la référence est placée de façon optimale entre les deux électrodes.
- Cube 2 : deux cathodes, placées l'une en face de l'autre (n°1 et 2) sont connectées à la bioanode.
- Cube 4 : la totalité des quatre cathodes (n°1, 2, 3 et 4) sont connectées à la bioanode.

Les courbes de puissance sont tracées pour les trois configurations successivement le même jour, en veillant à ne faire aucun ajout d'acétate entre les trois mesures de courbes de puissance. Le suivi des performances au cours du temps n'est ici pas étudié pour ce prototype. La présence d'une électrode de référence permet de tracer également la cinétique des électrodes. Il faut toutefois considérer la cinétique des cathodes avec précaution car la position de l'électrode de référence entache ces cinétiques d'une chute ohmique non négligeable qui n'est pas identique pour chacune.

Un modèle numérique utilisant les cinétiques expérimentales pour calculer la distribution de potentiel (Chapitre 3) est développé afin de prévoir les effets possibles de l'extrapolation du réacteur sur les performances délivrées. Les conditions de cette étude sont résumées dans le Tableau 25.

Tableau 25. Conditions des essais réalisés avec le prototype « Cube ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile		
Réacteur : « Cube » - S _{cathode} = 12.6 cm ² (Cube 1), 25.2 cm ² (Cube 2) et 50.4 cm ² (Cube 4)		
2 PCMs identiques en parallèle analysées le même jour		
Bioanode : plane, tissu de carbone, S _{projetée} = 9 cm ² , formée par procédure « polarisation complète », inoculum « lixiviat de terreau »		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	
Spectroscopie d'impédance électrochimique à potentiel imposé pour mesure de la chute ohmique		
Modèle numérique		
Distribution secondaire de potentiel		
Equations utilisées pour lisser les cinétiques expérimentales :		
Bioanode : Butler-Volmer-Monod		Contre-électrode : Butler-Volmer
$j = j_{max} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right)}{K_1 \exp\left(-\frac{(1-\alpha)n_e F}{RT} \eta\right) + K_2 \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right)$		$j = -j_0 \exp\left[\frac{-\alpha n_e F}{RT} \eta\right]$

2.2.2. Résultats avec le prototype « Cube »

La caractérisation des bioanodes indique que l'oxydation de l'acétate démarre vers -0.55 V/ECS avec une allure de type sigmoïde commune aux bioanodes formées en lixiviat de terreau (Cercado et coll., 2013; Pocaznoi et coll., 2012). La cinétique de la cathode à air présente une courbe conventionnelle de réduction de l'oxygène (Figure 36.B, marqueurs carrés).

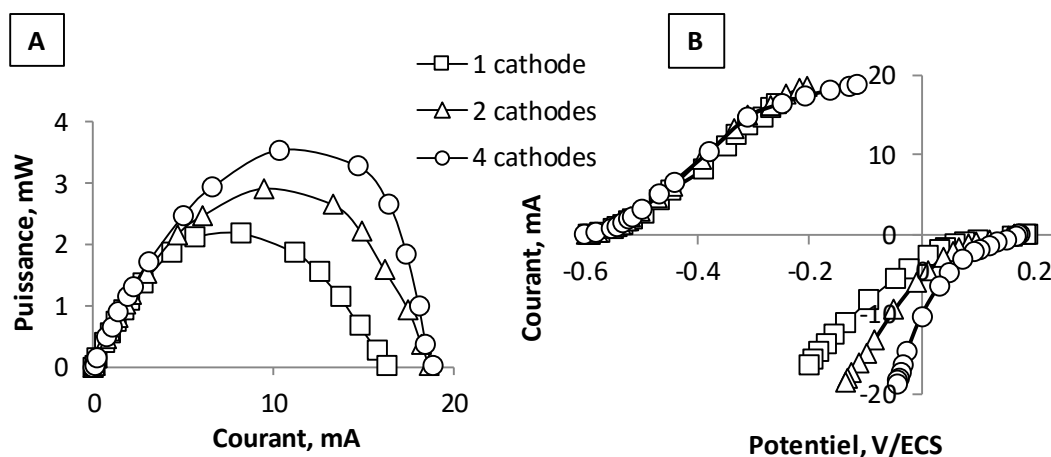


Figure 36. Courbes expérimentales de la PCM « Cube » ayant fourni les meilleures performances. (A) Courbes de puissance et (B) cinétiques des électrodes enregistrées le jour du lancement de la pile. Carrés : une cathode. Triangles : deux cathodes. Ronds : quatre cathodes.

Les courbes de puissance dans la configuration Cube 1 présentent la forme conventionnelle d'une cloche symétrique, avec des puissances maximales et des courants atteignant jusqu'à 2.2 mW et 16.3 mA respectivement (1.9 mW et 13.7 mA pour le duplicata) (Figure 36.A, marqueurs carrés). Augmenter le nombre de cathodes connectées à la bioanode d'une à deux puis à quatre permet d'augmenter la puissance délivrée par la PCM à 2.9 mW et 3.6 mW respectivement (2.6 mW et 3 mW pour le duplicata). L'architecture du réacteur est donc efficace puisque des hausses des puissances délivrées de 40% et 61% sont observées dans le cas d'une configuration à deux et quatre cathodes.

Toutefois, les courants maximaux relevés en court-circuit restent limités et ne dépassent pas 19 mA dans la configuration Cube 4. Une limitation due à la bioanode s'observe à la fois sur la courbe de puissance (branche légèrement verticale aux courants élevés) et sur la cinétique anodique (plateau limite en courant à 19 mA qui débute vers -0.3 V/ECS). Ce phénomène est décrit plus en détails dans la partie 2.1.2 de ce chapitre.

2.2.3. Extrapolation du prototype grâce au modèle numérique

La modélisation de la distribution de potentiel au sein de la pile est mise en œuvre pour guider l'amélioration du prototype. Suivant la procédure détaillée au Chapitre 3, les cinétiques expérimentales sont utilisées comme conditions aux limites ; elles sont au préalable corrigées de la chute ohmique (mesurée par spectroscopie d'impédance électrochimique, méthode décrite dans le Chapitre 2) puis mises en équation (Tableau 26). Les paramètres sont ajustés numériquement par la méthode des moindres carrés. Tous les calculs sont réalisés à une concentration en acétate de 36 mM et la conductivité de l'électrolyte est fixée à la valeur mesurée après 2 ajouts d'acétate égale à 1.3 S.m⁻¹. Le modèle donne la répartition des distributions de courant et de potentiel dans l'électrolyte de la PCM. Le courant délivré par le système est calculé en faisant varier la tension aux bornes de la cellule,

depuis la tension en circuit ouvert jusqu'à une tension nulle, ce qui permet ensuite de tracer les courbes de puissance $P = f(i)$.

Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier la validité du modèle numérique. La PCM ayant fourni les meilleures performances expérimentales dans la configuration Cube 1 (une cathode à air) sert de support. La courbe de puissance obtenue par le modèle se superpose parfaitement aux données expérimentales (Figure 37.A, ligne pleine). La puissance maximale calculée est identique à celle obtenue expérimentalement (2.2 mW) et la tension de cellule correspondante est du même ordre de grandeur (0.3 V contre 2.7 V expérimentalement) (Tableau 26).

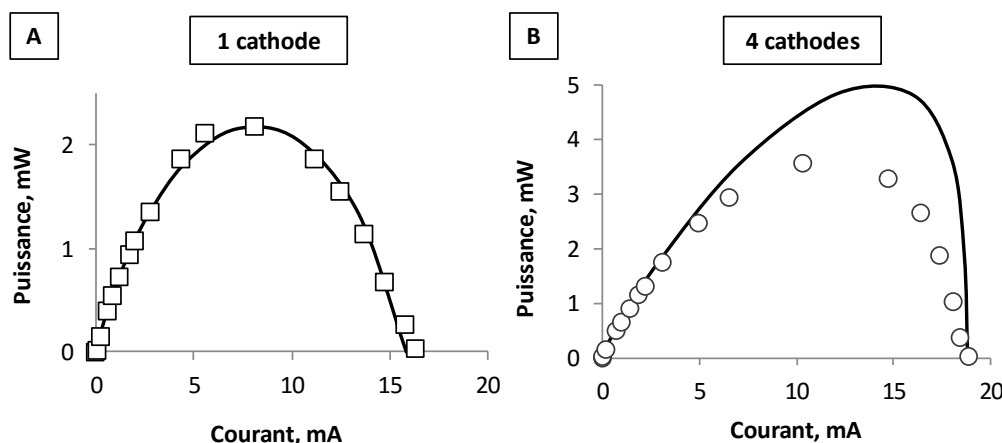


Figure 37. Courbes de puissance expérimentales (avec marqueurs) et obtenues par le modèle (lignes pleines) de la PCM ayant fourni les meilleures performances expérimentales dans la configuration (A) Cube 1 et (B) Cube 4.

Il faut insister sur le fait qu'il n'y a aucun paramètre ajustable dans la démarche de modélisation. Les cinétiques expérimentales de la bioanode et d'une cathode à air sont utilisées pour alimenter le modèle. Ces valeurs expérimentales sont mises sous une forme exploitable par le modèle, c'est-à-dire sous forme d'équations ; les paramètres des équations cinétiques sont ajustés numériquement. Les cinétiques expérimentales ainsi introduites, la distribution de potentiel puis les courants locaux sur l'électrode ainsi que le courant total délivré par la pile sont calculés pour une géométrie, une conductivité ionique et une tension de cellule données, sans qu'il soit possible d'ajuster aucun paramètre. Le fait que la courbe de puissance calculée se superpose parfaitement aux mesures expérimentales prouve donc que le modèle appréhende parfaitement les distributions de potentiel dans la pile pour l'ensemble des tensions de cellule.

La configuration Cube 4 de cette même PCM est ensuite modélisée de la même manière. Les paramètres des équations sont différents de ceux utilisés dans le cas de la configuration Cube 1 avec une cathode à air, car les cinétiques expérimentales des électrodes évoluent d'une configuration à l'autre (Figure 36.B). Les valeurs numériques obtenues sont supérieures aux données expérimentales (4.8 mW contre 3.6 mW mesuré expérimentalement) (Figure 37.B, ligne pleine). Il est vérifié, en retraçant les cinétiques des électrodes grâce au modèle, que cet écart de performances provient d'une surestimation de la cinétique des cathodes à air. L'hypothèse émise est que les cathodes utilisées expérimentalement n'ont pas toutes des performances initiales identiques. Il est possible qu'elles aient été légèrement abîmées lors du montage du réacteur et aient perdu une partie de leur couche active (Chapitre 4, partie 2).

Tableau 26. Comparaison des puissances maximales et courants maximaux (en court-circuit) obtenus expérimentalement et calculés par le modèle dans les différentes configurations du prototype « Cube ». Les paramètres des équations utilisées pour lisser les courbes expérimentales dans le modèle numérique sont indiqués pour chaque électrode.

Configuration de la PCM	Résultats expérimentaux		Lissage des courbes de cinétique		Résultats modélisés	
	P (mW)	i (mA)			P (mW)	i (mA)
1 cathode Bioanode plane	2.2	16.3	Bioanode $J_{\max} = 9 \text{ A.m}^{-2}$ $\alpha_{\text{anode}} = 0.444$ $K_1 = 33.22$ $K_2 = 0$ $K_M = 0 \text{ mol.L}^{-1}$	Cathode $j_0 = 0.285 \text{ A.m}^{-2}$ $\alpha_{\text{cathode}} = 0.674$	2.2	15.9
4 cathodes Bioanode plane	3.6	18.8	Bioanode $J_{\max} = 9.8 \text{ A.m}^{-2}$ $\alpha_{\text{anode}} = 0.586$ $K_1 = 11.72$ $K_2 = 70.33$ $K_M = 0 \text{ mol.L}^{-1}$	Cathode $j_0 = 0.0257 \text{ A.m}^{-2}$ $\alpha_{\text{cathode}} = 0.0405$	4.8	18.8
4 cathodes Bioanode cylindrique	/	/			10.7	53.5
6 cathodes Bioanode cylindrique					10.9	53.6
8 cathodes Bioanode cylindrique					10	52.3

Le modèle est ensuite utilisé pour guider l'amélioration de l'architecture du prototype. Tout d'abord, il est observé expérimentalement que la bioanode devient limitante dans une configuration de PCM avec quatre cathodes. Pour surmonter cette limitation, nous avons modifié dans le modèle la géométrie de la bioanode. La bioanode rectangulaire de surface 3 cm x 3 cm et d'épaisseur 1 mm (19.2 cm² de surface totale) utilisée expérimentalement est remplacée par une bioanode cylindrique creuse de 3 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre externe (surface totale 56 cm²). Le modèle indique qu'une telle augmentation de la surface de la bioanode accroît considérablement les performances maximales de la PCM, avec une puissance et un courant de 10.7 mW et 53.5 mA susceptibles d'être atteints. Cette configuration permet notamment aux lignes de champs d'avoir accès à toute la surface interne du cylindre anodique.

Afin de valider les résultats du modèle, cette configuration d'une bioanode est reproduite expérimentalement en cousant du tissu de carbone autour d'une grille en plastique inerte de forme cylindrique utilisée comme support (hauteur 3 cm, diamètre 3 cm). Cependant, avec cette géométrie, il n'a pas été possible de développer une bioanode aussi performante que les bioanodes planes. Sous chronoampérométrie pendant quinze jours, dans les conditions standards de formation des bioanodes, les densités de courant n'ont jamais excédé 10 A.m⁻² sur deux essais indépendants. Cette piste a donc été abandonnée par la suite. Cet insuccès remet en perspective la difficulté qu'il y a à développer des bioanodes de grande surface et le manque de connaissances fondamentales sur les mécanismes de formation des biofilms électroactifs qui puissent guider le changement d'échelle. Il peut être rapproché des observations relevées au cours de l'optimisation de la bioanode (partie 2.5 du Chapitre 4), où il est démontré qu'accroître la taille de la bioanode de 9 cm² à 50 cm² peut provoquer des disparités de formation du biofilm en surface qui entraînent des pertes de performances.

Tous les calculs numériques d'extrapolation présentés dans la suite de cette étude sont donc réalisés avec la cinétique de la bioanode obtenue expérimentalement de façon courante avec une surface

projetée de 9 cm^2 . Les effets subsidiaires qu'impliquent l'accroissement de la surface de la bioanode sur les propriétés du biofilm électroactif ne sont donc pas pris en compte dans la suite de cette étude car nous n'avons à ce jour aucune piste théorique pour les prévoir. C'est là un biais du modèle dont il faut être conscient.

Il est ensuite envisagé d'augmenter le nombre de faces du réacteur dans le but d'augmenter le nombre de cathodes à air, en passant d'un cube à un parallélépipède à base hexagonale (6 cathodes) ou octogonale (8 cathodes) (Figure 37). Pour ces deux réacteurs, une bioanode cylindrique creuse de surface 56 cm^2 est utilisée.

Les calculs montrent qu'augmenter le nombre de cathodes à air ne permet pas d'accroître la puissance produite par la PCM. La puissance stagne autour de 11 mW avec six cathodes et tend même à légèrement diminuer à 10 mW avec huit cathodes (Tableau 26). Cette limitation des performances s'explique par le fait que le volume du réacteur augmente lorsque le nombre de cathodes devient supérieur à quatre et que fatalement, bioanode et cathodes s'éloignent les unes des autres. Les effets bénéfiques engendrés par l'augmentation des surfaces de la bioanode et de la cathode sont contrebalancés par les phénomènes de chute ohmique devenus trop importants. La contrainte d'une conductivité de l'ordre de 1 S.m^{-1} vient à nouveau cruellement limiter nos extrapolations. Il ne serait donc pas judicieux de développer une telle PCM en raison d'une géométrie complexe à usiner qui n'apporterait qu'un gain faible en performance. Cette conclusion pourrait toutefois être invalidée en mettant en œuvre des électrolytes plus conducteurs, comme cela a été réalisé au laboratoire avec des bioanodes halotolérantes (Raphael Rousseau et coll., 2013).

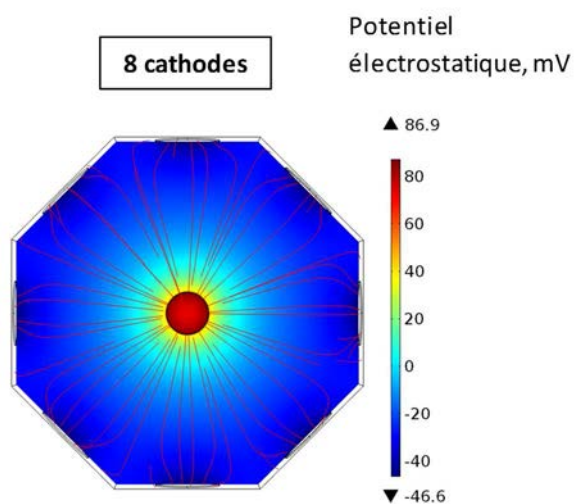


Figure 38. Distribution de potentiel au sein de l'électrolyte d'une PCM avec huit cathodes à air et une bioanode cylindrique. La légende de couleur donne les valeurs de potentiel et les lignes de courant sont représentées en rouge. $U_{\text{cellule}} = 0.4 \text{ V}$, conductivité de l'électrolyte = 1.3 S.m^{-1} .

3. L'Assemblage Séparateur-Electrodes (ASE) avec une bioanode tridimensionnelle et une cathode à air amovible booste les performances d'une pile à combustible microbienne (Publication 4)

Les travaux décrits ci-dessus ont mis en évidence la lourde contrainte que fait peser la faible conductivité de l'électrolyte sur les performances d'une PCM. Les biofilms électroactifs, excepté ceux formés à partir de sédiments marins ou de marais salants par exemple, ne tolèrent pas de trop fortes salinités. Il n'est donc pas possible d'augmenter la conductivité du milieu autant que souhaité et celle-ci ne dépasse que très rarement quelques $S.m^{-1}$ (Oliot et coll., 2016). Notons par ailleurs que les bioanodes développées en milieu marin présentent souvent des cinétiques moins efficaces que les biofilms développés dans le cadre de cette thèse (Rousseau et coll., 2016; Rousseau et coll., 2013). Changer d'inoculum et de milieu aurait donc engendré d'autres problèmes, et nous avons préféré conserver des bioanodes dont nous avons optimisé la procédure de formation. Nous avons plutôt tenté d'améliorer la puissance délivrée par la PCM en diminuant la résistance interne, et la façon la plus simple d'y parvenir consiste à réduire la distance entre bioanode et cathode. Il est toutefois conseillé dans la bibliographie de conserver une distance minimale de l'ordre de 2 cm entre les deux électrodes pour éviter que l'oxygène qui diffuse au-travers de la cathode n'atteigne la bioanode (S. Cheng et coll., 2006; Logan et coll., 2015; Moon et coll., 2015). Ce phénomène appelé « crossover » est très défavorable à la bioanode. L'oxygène inhibe, inactive ou tue les bactéries électroactives anaérobies, et pousse celles qui sont capables d'aérobiose à se détourner du transfert extracellulaire vers la bioanode en préférant la respiration aérobie (Gil et coll., 2003; Harnisch & Schroeder, 2009; Popat & Torres, 2016).

Diminuer la distance bioanode-cathode au minimum amène à une configuration de type « Assemblage Séparateur-Electrode » ou « ASE », qui consiste à intercaler un séparateur entre la bioanode et la cathode. La qualité de l'ASE repose en grande partie sur celle du séparateur qui doit opposer le moins de résistance possible aux transferts ioniques, mais doit constituer une barrière efficace au transport de l'oxygène vers la bioanode. Ce dispositif est largement étudié pour les PCMs depuis quelques années (Abourached et coll., 2014; Fan et coll., 2012; Fan et coll., 2007; Krieg et coll., 2014) sans toutefois accroître les puissances délivrées de façon exceptionnelle par rapport aux PCMs conventionnelles. L'un des atouts majeurs des ASEs réside dans le gain de volume qui permet d'envisager leur multiplication tout en conservant des dispositifs relativement compacts.

Dans ces travaux de thèse, le prototype ASE est conçu sur la base du prototype « Cube 1 » (partie 2.2 de ce chapitre). Un ASE est disposé sur une seule face du réacteur en utilisant le même principe de couronne vissée pour maintenir l'assemblage des trois éléments Anode-Séparateur-Cathode. La surface active de l'ASE est donc de 9.6 cm^2 et les densités de puissances et de courants sont calculées par rapport à cette surface. Comme pour le prototype « Cube », la couronne latérale est démontable à tout moment et permet le changement de la cathode à air et du séparateur sans perturber la bioanode. Cette architecture est nommée par la suite « ASE avec cathode à air amovible ».

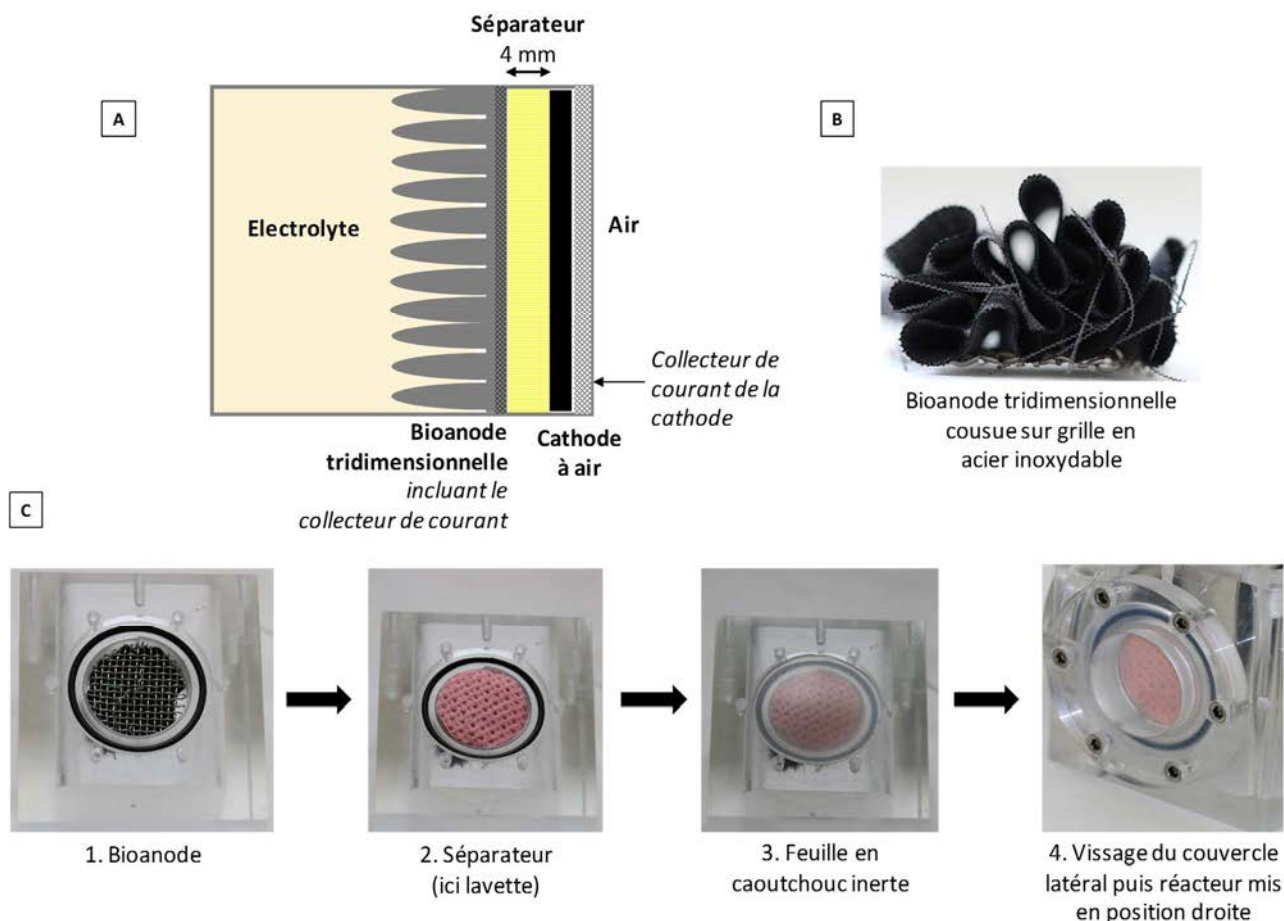


Figure 39. (A) Photographie et schéma du prototype « ASE avec cathode à air amovible ». (B) Photographie de la bioanode tridimensionnelle cousue sur une grille en acier inoxydable utilisée comme collecteur de courant (C) Photographies décrivant les différentes étapes de l'assemblage des trois éléments Anode-Séparateur-Cathode. Dans ce cas, la cathode à air est remplacée par une feuille en caoutchouc durant la phase de préparation de la bioanode.

L'assemblage des trois éléments Anode-Séparateur-Cathode à air s'effectue en trois temps (Figure 39.C). Tout d'abord, une bioanode tridimensionnelle est fabriquée en cousant un tissu de carbone de 4 cm x 40 cm de surface de façon à obtenir une multitude de plis d'environ 1 cm d'épaisseur (Figure 39.B). Le tissu de carbone est ensuite cousu sur une grille en acier inoxydable de 3.5 cm de diamètre utilisée comme collecteur de courant. La structure tridimensionnelle ainsi obtenue est placée du côté de l'électrolyte.

Le choix d'une bioanode tridimensionnelle permet d'augmenter sa surface active. En outre, il a été spéculé que ce type de structure résisterait mieux au phénomène de crossover de l'oxygène en permettant le développement de bactéries aérobies au niveau des zones proches de la cathode formant une sorte de « séparateur microbien » (comme décrit dans la revue « Ion transport in microbial fuel cells : Key roles, theory and critical review » présentée dans le Chapitre 1). Les bactéries anaérobies du biofilm seraient ainsi protégées de l'arrivée de l'oxygène en trouvant refuge dans les zones anoxiques plus éloignées de la cathode.

Le séparateur est ensuite posé sur le collecteur anodique (Figure 39.C.2). Le choix du séparateur dans une PCM est crucial de façon générale, et encore plus important pour un ASE. Il doit être capable de minimiser l'arrivée de l'oxygène à la bioanode sans être un obstacle au transfert ionique au sein de l'électrolyte. L'analyse faite dans la revue présentée dans le Chapitre 1 a amené à la conclusion qu'il était inutile de mettre en œuvre des séparateurs sophistiqués, sauf si la PCM visait des applications spécifiques en complément de la production d'électricité, comme des fonctions de dessalement par

exemple. Les séparateurs poreux, et en particulier les séparateurs tels que les textiles, les fibres de verre ou les J-Cloths, sortes de lavettes qui remplacent nos traditionnelles éponges dans les ménages anglo-saxons, s'avèrent être de bons candidats et qui plus est bon marché (Fan et coll., 2007; Yousefi et coll., 2016; X. Zhang et coll., 2009; 2010; 2013). Faire le choix de tels séparateurs peu spécifiques et à moindre coût se justifie toutefois moins facilement pour les ASEs. En effet dans une PCM de configuration classique, la distance entre bioanode et cathode, actée dans la bibliographie à au moins 2 cm, permet de limiter l'effet néfaste de la diffusion de l'oxygène vers la bioanode, sans doute grâce au développement de microorganismes aérobies dans cette zone. Au contraire dans un ASE, la distance inter-électrode est réduite à son minimum et seul le séparateur est censé protéger la bioanode. Utiliser un séparateur peu efficace pourrait donc ruiner les performances de l'ASE en ne protégeant pas la bioanode contre la diffusion de l'oxygène. Sur la base de cette réflexion, nous avons cependant osé les choix suivants :

- Garder la diminution de la résistance interne comme l'objectif majeur et, par conséquent, utiliser des séparateurs de faible qualité séparative tels que du J-Cloth ou du papier qui n'introduiront qu'une faible barrière au transport ionique.
- Pousser l'objectif à l'extrême en allant jusqu'à n'utiliser comme séparateur qu'une grille largement ouverte, dans le seul objectif d'éviter les courts-circuits électriques entre bioanode et cathode.
- Espérer que la structure tridimensionnelle de la bioanode lui permette de développer une majorité de zones anaérobies malgré une inévitable diffusion d'oxygène depuis la cathode.
- Ne pas assumer totalement ces choix drastiques et ménager tout de même une distance de 4 mm entre bioanode et cathode.

Dans ce contexte, trois séparateurs sont testés :

- Une grille en plastique formée de mailles de 5 mm de diamètre ; deux couches sont superposées formant une épaisseur totale de 4 mm. L'unique mission de ce séparateur est d'éviter tout court-circuit entre la bioanode et la cathode qui serait susceptible de se produire à cause des fibres du tissu de carbone. Le transport ionique n'est donc uniquement gêné par l'encombrement stérique du séparateur.
- Une lavette de type J-Cloth avec des pores de diamètre d'environ 1 mm ; trois couches sont superposées formant une épaisseur totale de 2 mm.
- Un papier sulfurisé composé de fibres de pâte chimique de feuillus avec une taille de pores de 15 μm environ ; une seule feuille d'une épaisseur de 1 mm est utilisée pour ce séparateur.

Quel que soit le type de séparateur, la distance bioanode-cathode est maintenue constante à environ 4 mm pour assurer une comparaison aisée des résultats.

Six « ASEs avec cathode amovible » (deux pour chaque type de séparateur) sont développées en parallèle. L'étude se décompose en plusieurs étapes. La première consiste à former les bioanodes à partir d'une bioanode primaire formée au préalable. Cette procédure est décrite dans la partie 2.3.2. du Chapitre 4. Un montage de type Nstat (décrit dans le Chapitre 2) permet de polariser simultanément la bioanode primaire, qui sert d'inoculum, et la bioanode tridimensionnelle, qui doit être formée tout en suivant séparément le courant délivré par chacune d'elles. Cette opération est réalisée dans le réacteur « ASE avec cathode amovible », mais en ayant disposé une feuille en caoutchouc inerte à la place de la cathode (Figure 39.B.3 et B.4). Cette feuille remplace la cathode à air au sein de l'ASE durant

la préparation de la bioanode afin d'éviter le fouling prématuré de l'électrode dès le début de l'expérience, avant même le commencement du fonctionnement en pile.

On estime que les bioanodes tridimensionnelles sont matures lorsqu'elles délivrent un courant stable de l'ordre de 30 A.m⁻². La feuille de caoutchouc est alors remplacée par la cathode à air et son collecteur, sans vidanger l'électrolyte et sans perturber la bioanode. Des courbes de puissance ainsi que les cinétiques des électrodes sont régulièrement mesurées. Lorsque les cathodes à air voient leurs performances diminuer, elles sont remplacées par des cathodes neuves.

La résistance interne des différentes PCMs est mesurée par spectroscopie d'impédance (méthode décrite au Chapitre 2). Les coefficients de diffusion des ions hydroxydes au-travers des séparateurs J-Cloth et Papier sont déterminés en conditions abiotiques via un montage expérimental annexe décrit dans la partie 2.2.1 du Chapitre 2. Les conditions de cette étude « ASE avec cathode amovible » sont résumées dans le Tableau 27.

Tableau 27 . Conditions expérimentales de l'étude « ASE avec cathode amovible ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile avec une résistance de 10 à 33 Ω		
Réacteur : « ASE avec cathode à air amovible » - S _{cathode} = 9.6 cm ²		
6 PCMs : 2 par type de séparateur		
Bioanode : tridimensionnelle, tissu de carbone replié sur une grille en acier, S _{projetée} = 9.6 cm ² , formée à partir d'une bioanode primaire (S _{projetée} = 9 cm ²), inoculum « lixiviat de terreau »		
Séparateurs :		
- Grille en plastique, Ø _{pores} = 5 mm, 2 couches (4 mm d'épaisseur au total)		
- Lavette type J-Cloth, Ø _{pores} = 1 mm environ, 3 couches (2 mm d'épaisseur au total)		
- Papier sulfurisé, Ø _{pores} = 15 µm, 1 couche (1 mm d'épaisseur au total)		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	
Spectroscopie d'impédance électrochimique à courant imposé pour la mesure de résistance interne		
Calcul de coefficient de diffusion des ions OH ⁻ à travers les séparateurs Lavette type J-Cloth et Papier dans réacteur « Standard double compartiments »		
Observation des électrodes		
Microscopie à épifluorescence		
Analyse des populations microbiennes		
Pyroséquençage de l'ANR 16S		

Les résultats obtenus font l'objet de la publication 4 « Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boots microbial fuel cell performance » publiée dans le *Journal of Power Sources*.

Les principaux résultats de la publication sont les suivants :

- La PCM ASE implémentée avec une grille en tant que séparateur fournit les densités de puissance les plus élevées, jusqu'à 6.42 W.m⁻² et 5.95 ± 0.47 W.m⁻² en moyenne. Ces densités de puissance sont plus élevées que le maximum reporté jusqu'à présent dans la bibliographie de 4.7 W.m⁻² (W. Yang & Logan, 2016).

- Les PCMs ASE implémentées avec la lavette type J-Cloth et le papier produisent des densités de courant de l'ordre du maximum de l'état de l'art, $4.85 \pm 0.33 \text{ W.m}^{-2}$ et $1.76 \pm 0.05 \text{ W.m}^{-2}$ respectivement.
- Les densités de puissance produites par les PCMs tendent à diminuer au cours du temps. La caractérisation des cinétiques des électrodes permet d'attribuer cette chute des performances à la légère dégradation de la bioanode et surtout au rapide encrassement de la cathode à air.
- La configuration du prototype « ASE avec cathode à air amovible » permet de remplacer la cathode à air salie par une électrode neuve. Cette opération s'est toujours accomplie sans altération de la bioanode et le remplacement de la cathode a immédiatement relancé les performances des PCMs. Jusqu'à 4 W.m^{-2} ont ainsi pu être obtenu dans le cas du séparateur « grille » après sept semaines de fonctionnement.
- Le crossover de l'oxygène vers la bioanode ne s'est pas révélé être un problème car la très grande majorité des espèces se développant à la bioanode sont anaérobies. Comme espéré initialement, le transfert de l'oxygène semble être atténué par le biofilm qui se développe à la surface de la cathode, et potentiellement dans des zones aérobies de la structure tridimensionnelle de la bioanode.
- Quel que soit le type de séparateur, toutes les bioanodes montrent une forte sélection en *Proteiniphilum acetatigenes*, en particulier sur les bioanodes délivrant de fortes densités de courant. Ce résultat étonnant doit être approfondi afin de déterminer si cette espèce a un rôle dans le processus électroactif.

La suprématie surprenante de la grille utilisée comme séparateur peut s'expliquer, d'un point de vue théorique, par le meilleur équilibre des pH qu'elle assure entre la bioanode et la cathode. En effet, comme développé au Chapitre 1, la bioanode s'acidifie localement et la cathode s'alcalinise. Ces deux phénomènes inhibent le fonctionnement de la pile, en particulier les biofilms qui sont très sensibles à l'acidification du milieu. La meilleure issue pour lutter contre ces deux processus consiste à rapprocher au maximum les deux électrodes pour favoriser le transport des espèces tampon entre les deux. C'est cette situation optimale d'un point de vue de l'équilibre des pH que permet de réaliser la grille. Il semble donc que l'équilibre des pH soit la voie royale d'optimisation des PCMs. Ici, le crossover de l'oxygène est certainement géré par l'établissement de biofilms aérobies sur la surface de la cathode, sur la grille et en périphérie de la bioanode.

Peut-être aurions-nous dû assumer notre réflexion initiale jusqu'à sa limite et ne pas garder les 4 mm d'espacement entre bioanode et cathode. L'équilibre des pH eût pu être encore amélioré et la bioanode tridimensionnelle eût pu accepter un flux parasite d'oxygène un peu plus important. C'est certainement une voie de progression à envisager au plus tôt.

Les « Supplementary data » mentionnées dans l'article sont insérées en Annexe 3.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Power Sources

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpowsour

Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance



M. Olliot ^{a,*}, L. Etcheverry ^a, A. Mosdale ^b, R. Basseguy ^a, M.-L. Délia ^a, A. Bergel ^a

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

^b PaxiTech SAS, 32 rue de Comboire, 38130 Echirolles, France

HIGHLIGHTS

- The separator membrane assembly with a grid as the separator performed the best.
- Efficient pH balance by diffusion of the buffering species is essential.
- Oxygen crossover was mitigated by the biofilm on the cathode and the 3D bioanode.
- Biofouling did not impact the resistance; fouling deteriorated the cathode kinetics.
- All bioanodes showed stringent selection of *Proteiniphilum acetatigenes*.

Abstract

Separator electrode assemblies (SEAs) were designed by associating a microbial anode with an air-cathode on each side of three different kinds of separator: plastic grid, J-cloth and baking paper. The SEA was designed to allow the air-cathode be removed and replaced without disturbing the bioanode. Power densities up to 6.4 W.m^{-2} were produced by the Grid-SEAs (on average $5.9 \pm 0.5 \text{ W.m}^{-2}$) while JCloth-SEAs and Paper-SEAs produced 4.8 ± 0.3 and $1.8 \pm 0.1 \text{ W.m}^{-2}$, respectively. Power densities decreased with time mainly because of fast deterioration of the cathode kinetics. They always increased again when the air-cathodes were replaced by new ones; the Grid-SEAs were thus boosted above 4 W.m^{-2} after 7 weeks of operation. The theoretical analysis of SEA functioning suggested that the high performance of the Grid-SEAs was due to the combination of several virtuous phenomena: the efficient pH balance thanks to free diffusion through the large-mesh grid, the likely mitigation of oxygen crossover thanks to the 3-dimensional structure of the bioanode and the possibility of overcoming cathode fouling by replacing it during MFC operation. Finally, the microbial community of all bioanodes showed stringent selection of *Proteiniphilum acetatigenes* in proportion with the performance.

Keywords : Microbial anode, pH balance, biofouling, *Proteiniphilum*, power density, bioelectrochemical system.

1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) can convert the chemical energy contained in a large variety of organic compounds [1,2] directly into electrical energy. They are composed of a microbial anode, which oxidizes organic matter thanks to the catalytic activity of anode-respiring bacteria, associated with a cathode, which most often ensures oxygen reduction [3]. Considerable advances have been made on microbial anodes [4–7] but the power density achieved still remains modest. It generally does not exceed one or two $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ [8]. Values of the order of $7 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ [5,9] have been reported but by expressing density with respect to the anode surface area, which, in this case, was considerably smaller than that of the cathode. Nevertheless, on the basis of the cathode surface area, to the best of our knowledge, the highest power densities reported so far are of the order of $4.7 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ [10]. Furthermore, power density generally falls when the MFC volume increases. For instance, it has recently been claimed that $2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ is the highest power density reported for a single compartment MFC with a volume greater than 100 mL [11].

There are other causes but the low ionic conductivity of the electrolyte used in MFCs is largely responsible for such poor performance. Electroactive biofilms are generally sensitive to high salinity and, except those formed in marine sediments [12–16], microbial anodes require a low-salinity medium. The ionic conductivity of MFC electrolyte is generally around $1 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ and often less, down to $0.1 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ [17,18], when the objective is to treat wastewater. In this context, a major objective has been to reduce the internal resistance of MFCs by minimizing the anode-cathode distance. However, this can increase oxygen crossover from the cathode to the anode, which inhibits or kills electroactive bacteria or shifts them from anode respiration to aerobic respiration. It is generally agreed that a distance of 1 to 2 cm is the optimum [8,19–21].

Promising paths towards further reduction of the anode-cathode distance while minimizing oxygen transfer to the anode, have been opened up by separator-electrode assemblies (SEA) [20,22]. The nature of the separator is essential. It must minimize oxygen diffusion while impeding ionic transfer as little as possible in order to keep the ionic resistance at a minimum and avoid upsetting the pH balance between the anode, which produces protons, and the cathode, which produces hydroxide ions [23]. Porous separators, and particularly macro-porous separators such as textile material, glass fibre and J-cloth, have led to interesting performance levels with fairly low cost separator materials [20,22,24–26].

In association with porous separators, three-dimensional anodes, like carbon mesh or fibre brush, applied against the separator surface have been observed to perform better than flat anodes [22,27,28]. It has been speculated that aerobic bacteria growing on the anode or on the separator itself consume the oxygen that diffuses from the cathode and thus permits stable anoxic zones to develop in the three-dimensional anode [8,28]. Using a three-dimensional bioanode to build an SEA consequently reduces the importance of finding a separator structure that minimizes oxygen diffusion.

Here, we chose to have full confidence in the capacity of an electroactive biofilm to self-organize so as to protect itself against oxygen crossover, provided that it was provided with a three-dimensional structure to develop on. SEAs were consequently built with three-dimensional bioanodes and large-mesh plastic grids used as the separators, the sole mission of which was to prevent electrical short-circuiting between anode and cathode. Ion transport was thus not impeded, except by the low

volumetric hindrance of the grid. For comparison, similar SEAs were tested in identical conditions, using J-cloth or baking paper as the separator.

Finally, a recent study performed with a separated anode-cathode configuration has shown that the initial biofouling of the air-cathode is a major cause of performance underestimation [29]. It described a device that allowed the air-cathode to be removed and replaced without disturbing the MFC operation. It was thus observed that cathode biofouling occurred very fast, from the beginning of MFC operation, and led to the MFC performance being significantly underestimated. Here, a similar removable air-cathode system was developed with an SEA. It was thus possible to set the air-cathode into the SEA only after the bioanode was fully developed. This procedure avoided biofouling of the air-cathode during the preliminary phase of bioanode formation and allowed the initial performance of the SEAs to be assessed in optimal conditions.

3. Results and discussions

3.1. SEA bioanode formation

Six similar bioanodes were formed in parallel, in synthetic medium, using primary anodes as the inocula. For this phase of bioanode preparation, the SEAs were built with a silicon foil in place of the air-cathode and the MFC devices were implemented as three-electrode set-ups by using a platinum electrode dipped into the electrolyte bulk as the auxiliary electrode. Thanks to this system, the air-cathode was not used during the phase of bioanode formation, and consequently not exposed to biofouling. Bioanodes were polarized at -0.2 V/SCE for one week, with 4 successive additions of acetate 20 mM. At the end of one week of polarization, the bioanodes produced around $20 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$. Finally, the synthetic medium was replaced by a fresh one and bioanodes were polarized for one additional day, which led to current densities ranging from 30 to $60 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$.

3.2. MFC operation

Thanks to the MFC architecture developed here, at the end of the phase of anode preparation, the silicon foil that sealed the cell was easily replaced by an air-cathode so as to complete the SEA. The silicon foils removed presented different deposits on their surface depending on the nature of the separator. Those used with the grid showed a dark brown deposit, those used with J-cloth a less intensively coloured deposit, and those used with the paper separators showed only a pale mark (Fig. 1 in Supplementary Data). Seeing this gradation, it can be anticipated that the paper separator will be more efficient to protect the air-cathode against fouling than J-cloth or, obviously, the grids will do.

Once the silicon foil had been replaced by an air cathode, each SEA was composed of a 3-dimensional bioanode, a separator and an air-cathode, held against one another mechanically. The six SEAs used three different separator types: plastic grid (Grid-SEA), J-cloth (JCloth-SEA) and baking paper (Paper-SEA), each in duplicate. The presence of a reference electrode in the MFCs allowed stationary current-potential curves to be recorded at the same time as power curves. The reference was located in the electrolyte bulk, which means that the potential measured for the air-cathodes was tainted by a high ohmic drop, including that due to the separator. The duplicates run with the same separator type always provided similar trends and power densities of the same order of magnitude. Only one curve is

reported in the text for each separator type; the others are available in the Supplementary Data (Fig. 2 in Supplementary Data).

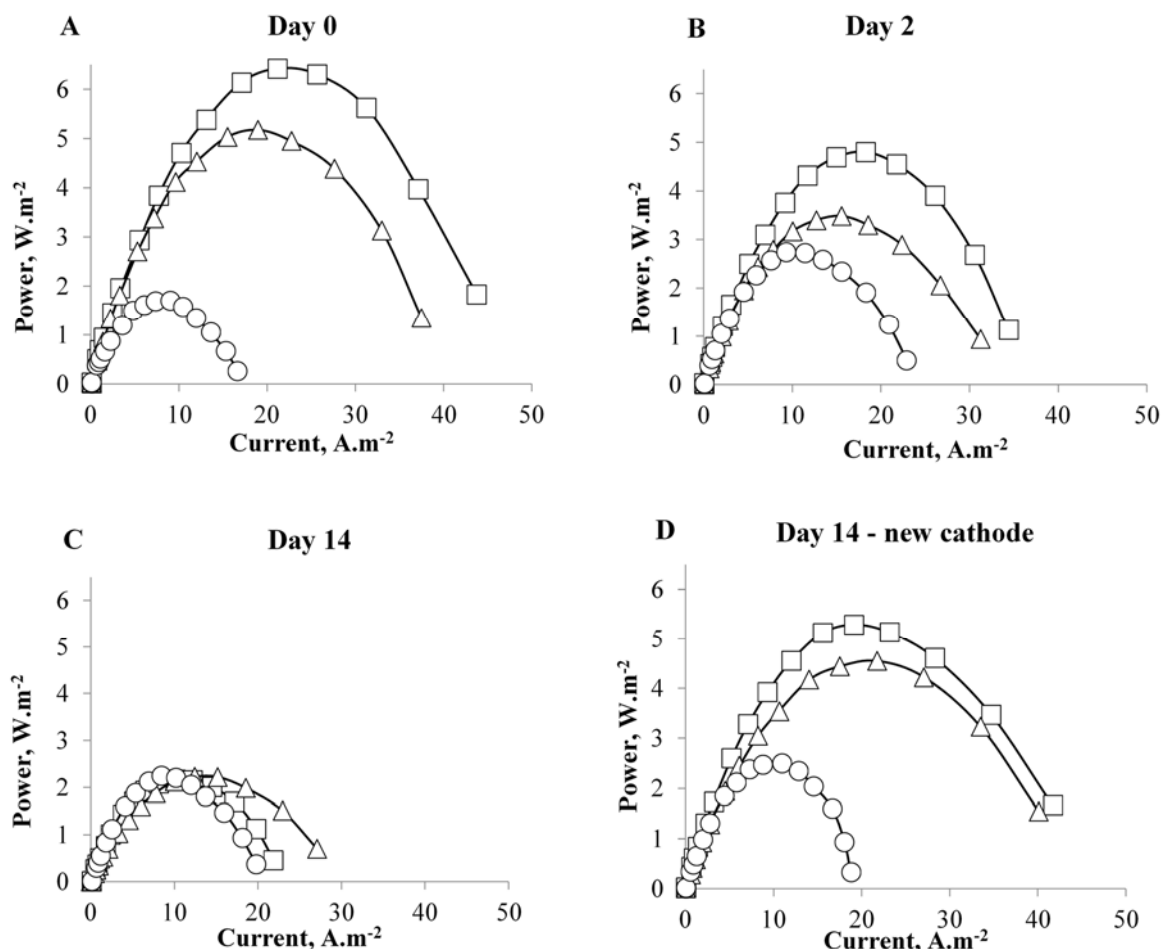


Figure 2. Power curves in MFC operation. Squares: Grid-SEA. Triangles: JCloth-SEA. Circles: Paper-SEA.

Power curves were recorded 2 hours after the air-cathodes had been installed (day 0) (Fig. 2.A, Table 1). High power densities were achieved by the Grid-SEAs, up to 6.42 W.m^{-2} ($6 \pm 0.5 \text{ W.m}^{-2}$ on average), and JCloth-SEAs, up to 5.18 W.m^{-2} ($4.9 \pm 0.3 \text{ W.m}^{-2}$ on average). Paper-SEAs showed lower values ($1.8 \pm 0.1 \text{ W.m}^{-2}$ on average). The current-potential curves indicated much lower performance for the cathodes of the Paper-SEAs than for the other two types (Fig. 3). Thus, at the beginning of MFC operation, the paper separator was clearly detrimental to the cathode kinetics, resulting in lower MFC performance than the grid and the J-cloth separators.

Then, the Grid-SEAs and JCloth-SEAs showed similar evolution with time. At day 2 (Fig. 2.B, Table 1), their performance decreased. In both cases, the current-potential curves showed that the bioanodes stayed stable and that the performance loss was mainly due to deterioration of the air-cathode kinetics (Fig. 3.A and 3.B). The air-cathode current-potential curves were globally shifted towards negative potentials. Such evolution is commonly associated with air-cathode biofouling. In single compartment MFCs, organic compounds and microorganisms become deposited on the air-cathode surface and form a biofilm that decreases the catalytic efficiency by various mechanisms [23,33,34]. The detrimental

effect of biofouling on the cathode kinetics has recently been observed to occur very soon, in the first days of MFC operation [29], as confirmed here with SEA.

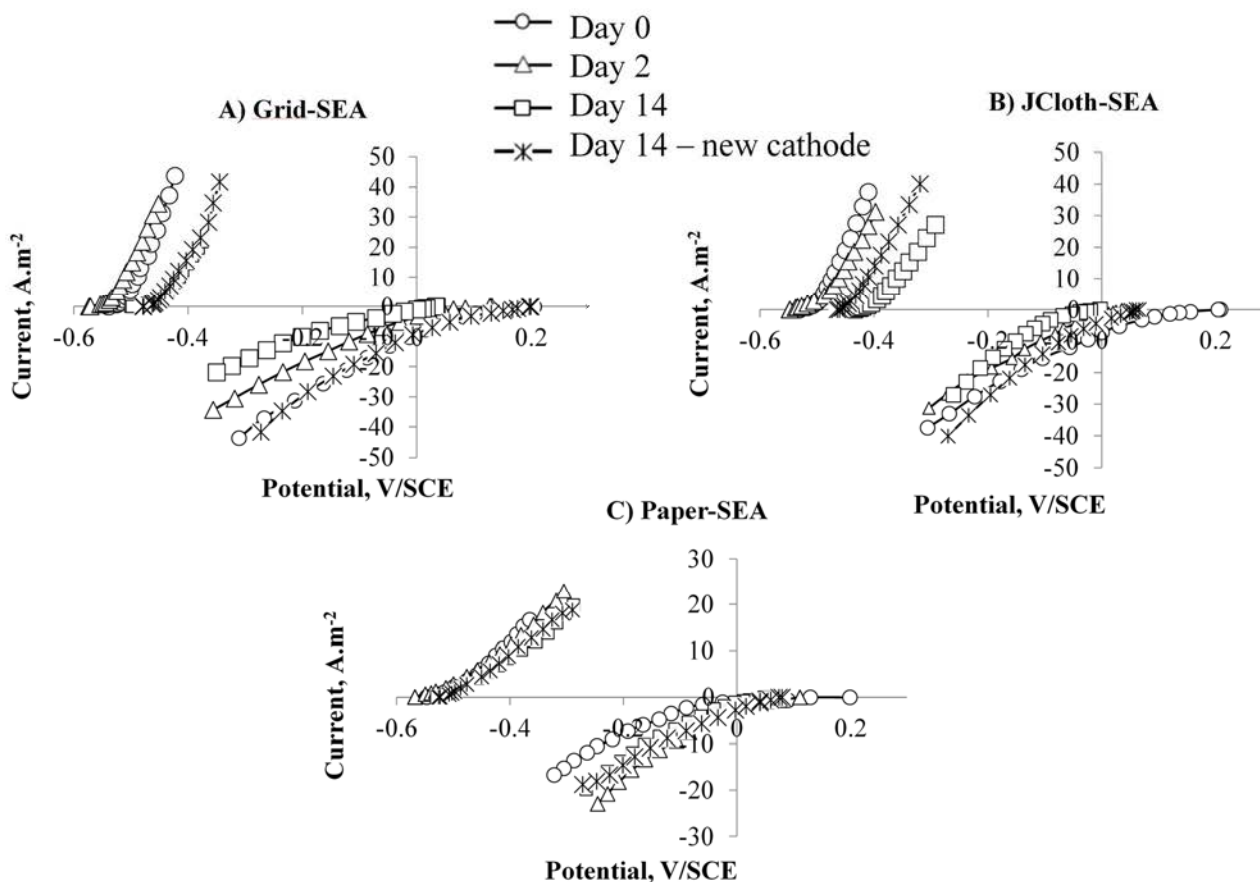


Figure 3. Electrode kinetics (i-E curves) for the MFCs characterized in Figure 2. (A) Grid-SEA. (B) JCloth-SEA. (C) Paper-SEA.

From day 2 to day 14, the performance decrease continued with the Grid-SEAs and JCloth-SEAs. The power curves recorded at day 14 gave maximum power values ranging from 2.2 to 2.6 W.m⁻² for all MFCs. The air-cathode kinetics continued to deteriorate from day 2 to day 14. In addition, between day 2 and day 14, for 3 MFCs out of the 4 that used grid or J-cloth separators, the power loss was also due to a concomitant deterioration of the bioanode kinetics, shown by the shift of the current-potential curves towards more positive potentials (Fig. 3.A and 3.B).

Unlike the Grid-SEAs and JCloth-SEAs, the Paper-SEAs presented increasing performance from day 0 to day 2 (Fig. 2, Table 1). Current-potential curves showed an improvement in the air-cathode kinetics while the bioanode kinetics remained stable (Fig. 3.C). It can be guessed that the hydrophobicity of the baking paper impeded the initial performance by slowing down the arrival of the electrolyte at the air-cathode. It took some time for the air-cathode to reach optimal wetting. Progressive wetting of the cathode then resulted in higher power production at day 2.

Despite the clear improvement from day 0 to day 2, the cathode kinetics of the Paper-SEAs remained significantly less efficient than those of the Grid-SEAs and JCloth-SEAs. The possibility of an impediment of HO⁻ ion transfer [34,35] by the paper separator was investigated. HO⁻ mass transfer coefficients through J-cloth and paper were determined experimentally in abiotic conditions. The OH⁻ mass transfer coefficient through paper ($8.35 \times 10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$) was considerably lower than that through the three layers

of J-cloth as used in the SEA ($1.52 \times 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$). These results confirmed that the paper separator hindered the transfer of the HO^- ions produced by the oxygen reduction reaction:



The resulting alkalization in the vicinity of the cathode was thermodynamically detrimental to the oxygen reduction reaction.

From day 2 to day 14, the Paper-SEAs displayed quite steady performance (Fig. 2, Table 1). Anodes stayed stable and current-potential curves of the air-cathode showed only a minor decrease (Fig. 3.C). Compared to the Grid-SEAs and JCloth-SEAs, the Paper-SEAs ensured lower but more stable performance. By hindering the OH^- transfer, the paper separator impeded the air-cathode kinetics but, in return, the paper separator protected the air-cathodes from kinetic deterioration. Furthermore, the paper separator also had a stabilizing effect on the bioanode kinetics, probably by decreasing the parasitic mass transfer of oxygen from the cathode to the bioanode.

Table 1. Average maximum power densities of SEA-MFCs over time. Maximum power density values were extracted from the power curves.

	$\langle P_{\max} \rangle, \text{W.m}^{-2}$		
	Grid-MFCs	JCloth-MFCs	Paper-MFCs
Day 0	6 ± 0.5	4.9 ± 0.3	1.8 ± 0.1
Day 2	4.8 ± 0.1	3.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Day 14	2.6 ± 0.4	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Day 14 - new cathode	5.7 ± 0.4	3.8 ± 0.7	2.3 ± 0.2
Day 21	3.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.4
Day 36	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Day 36 - new cathode	5 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3 ± 0.2
Day 49	4.2 ± 0.4	2.7 ± 0.5	1.7 ± 0.5
Day 49 new cathode / new separator	4.3 ± 0.3	3.4 ± 0.7	2.5 ± 0.8

At day 14, the air-cathodes were removed and their surfaces were imaged by epifluorescence microscopy to characterize biofouling (Fig. 4). As anticipated, the air-cathodes of the Grid-SEAs showed a strong presence of microorganisms as a compact biofilm on the surface (Fig. 4.A). The role of the plastic grid was only to prevent an electrical short-circuit between the anode and cathode and not to protect the air-cathode from biofouling. Logically, the air-cathode from the Grid-SEAs showed dense biofouling. Microorganisms were also present on the cathodes of the JCloth-SEAs and the Paper-SEAs but in smaller amounts (Fig. 4.B and 4.C). There was no significant difference in microbial colonization between the air-cathodes coming from the JCloth-SEAs and the Paper-SEAs. The three layers of J-cloth and the paper both protected the air-cathodes from microbial colonization to a similar extent.

At day 14, all SEAs had their air-cathode replaced by a new one. The reactor design allowed this operation to be performed without draining the electrolyte. Immediately, the power densities increased to as high as 6 W.m^{-2} and 4.55 W.m^{-2} (5.7 ± 0.4 and $3.8 \pm 0.7 \text{ W.m}^{-2}$ on average) for Grid-SEAs and JCloth-SEAs respectively (Fig. 2.D). The Paper-SEAs maintained almost stable performance after air-cathode replacement ($2.3 \pm 0.7 \text{ W.m}^{-2}$ on average). A comparison of the current-potential curves recorded just before and 2 hours after the change of air-cathodes, showed that the bioanode kinetics were not affected by the operation (Fig. 3). The capacity of the design proposed here to enable the air-cathode of a SEA to be replaced without impacting the bioanode was fully confirmed. It can thus be concluded that the immediate increase in MFC performance was exclusively due to the air-cathode (Fig. 3).

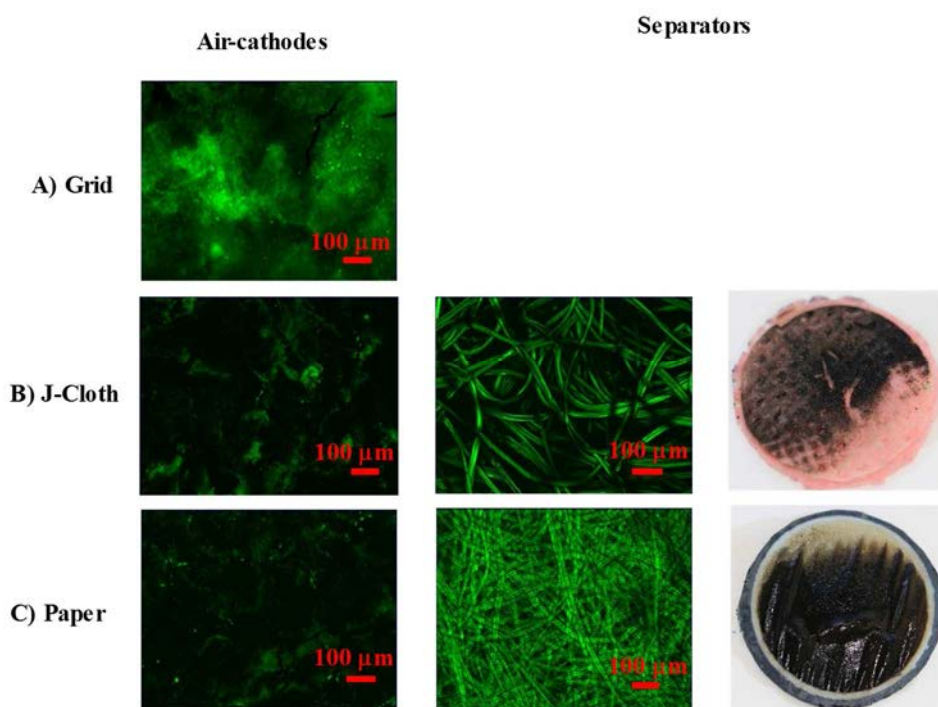


Figure 4. Epifluorescence images of air-cathodes at day 14 and separators at day 49.

From day 14 to day 36 (Table 1), the performance of Grid-SEAs decreased over time. The current-potential curves (data not shown) indicated that the performance loss was due to combined bioanode and air-cathode kinetics deterioration. The performance of JCloth-SEAs also fell over time but, in this case, the performance loss was mostly due to deterioration of the bioanode kinetics. The Paper-SEAs gave the most stable performance. The current-potential curves showed that, as observed from day 0 to day 2, the new air-cathodes firstly showed slightly lowered performance, which increased after a few days. This behaviour confirmed some hindrance of the electrolyte transfer through the paper, which delayed air-cathode wetting.

Air-cathodes were replaced a second time at day 36. All MFCs provided increased performance after having their air-cathodes changed (Table 1; power curves in Supplementary Data, Figure 3). As previously, the current-potential curves recorded just before and just after the air-cathode replacement (Supplementary Data, Figure 3) indicated that the bioanodes were not impacted by the operation. Just after the change of air-cathodes, the maximum power densities were 16 % and 31 % lower than the initial values (day 0) for the Grid-SEAs and the JCloth-SEAs, respectively, while the Paper-SEA reached its maximum power of 3.01 W.m^{-2} . At day 49, the air-cathodes were replaced once

again and the J-Cloth and paper separators were also replaced at the same time. The maximum power densities were 28 % and 30 % lower than the initial values (day 0) for the Grid-SEAs and the JCloth-SEAs. This slow performance loss that was not compensated by air-cathode replacement indicated a slow decrease of the bioanode performance. Changing the J-Cloth and paper separators did not have any clear impact, indicating that the transfer capacity of the separators was not affected by seven weeks of operation. J-cloths presented a brown aspect and imaging by epifluorescence microscopy showed full coverage of the fibres on both faces by bacteria. Papers also showed high microbial colonization, on either side (Fig. 4).

From a practical standpoint, it can be summarized that, with two successive air-cathode replacements, it was possible to obtain power densities ranging from 2.5 to 6.0 W.m⁻² with the Grid-SEAs, from 2.2 to 4.9 W.m⁻² with the JCloth-SEAs and from 1.7 to 3.0 W.m⁻² with the Paper-SEAs. The Paper-SEAs produced the lowest power but had the most stable performance.

The internal ionic resistance of the SEAs (R_s) was measured by galvanostatic electrochemical impedance spectroscopy measurements. The R_s parameter is the sum of all the resistances to ion motion between anode and cathode, i.e. the resistances to ion motion through the anodic biofilm, the electrolyte including the separator and the fouling layer of the cathode if there was one. Measurements were made on six different days including just before and just after replacement of the air-cathodes (day 36) and just before and just after replacement of the air-cathode and the separator (day 49). Whatever the separator type, SEA ionic resistance remained stable over time, with average values of 3.4 ± 0.3 , 2.5 ± 0.3 and 2.7 ± 0.3 Ω for the Grid-, JCloth- and Paper-SEAs, respectively. The ionic resistances of all the SEAs were of the same order of magnitude, slightly higher with the grid than the other two separators, probably because the plastic grids mechanically masked a part of the cross sectional area. The large opening of the J-cloth and paper pores (Fig. 4) explained these separators did not induce a higher resistance to ion transfer than that of the electrolyte. Consequently, the values of the internal ionic resistance did not explain the significantly higher performance obtained with the Grid-MFCs than with the other separators. Another cause had to be sought.

The SEA ionic resistance was never perturbed by biofouling. In particular, the resistances of the SEAs after 49 days of operation were similar to those measured after replacing the separators by new ones. The ion transfer rates, globally measured by the R_s parameter, were consequently not affected by the biofouling, although considerable biofilm development was observed on the separator and the air-cathode surfaces. It can be concluded that fouling or biofouling did not impact the air-cathode kinetics by decreasing the rate of ion transfers. The most likely explanation is that (bio-)fouling impacted the air-cathode kinetics by inhibiting the catalytic properties of the platinum catalyst [36]. This assumption explains why the inhibiting effect was so great right from the first days, as observed here between day 0 and day 2, and as already reported recently [29]. The inhibition of the air-cathode was not due to continuous clogging of the separator pores by microbial colonization but by fast inhibition of the platinum catalyst.

3.3. Microbial communities

After the 49 days of MFC operation, the bioanode microbial communities were identified (Fig. 5). Compared to the compost leachate medium that was used as the initial inoculum, a strong selection of microorganisms was observed whatever the separator type. For each sample, at least 60 % of the bacterial community was identified at the species level. The duplicates, which were fairly reproducible,

indicated that the nature of the separator impacted the microbial community. Grid-SEAs and JCloth-SEAs led to nicely reproducible duplicates that presented strong similarities, particularly with the dominance of *Proteiniphilum acetatigenes*. The Paper-SEA bioanodes presented a similar pattern but were less reproducible. Some species identified here have already been met in bioanodes. Several *Clostridium* species have been previously detected in MFCs [37,38] and some of them have been reported to be electroactive [39]. Nevertheless, in MFCs formed in forest soil *Clostridia* were found to colonize to a greater extent the anode surface of the MFCs that produced lower power [40]. The possible electroactivity of *Clostridia* cannot be absolutely ensured. In contrast, electroactivity of *Geobacter sulfurreducens* is well established and it was present here in all bioanodes, but always at a percentage not exceeding 6 %.

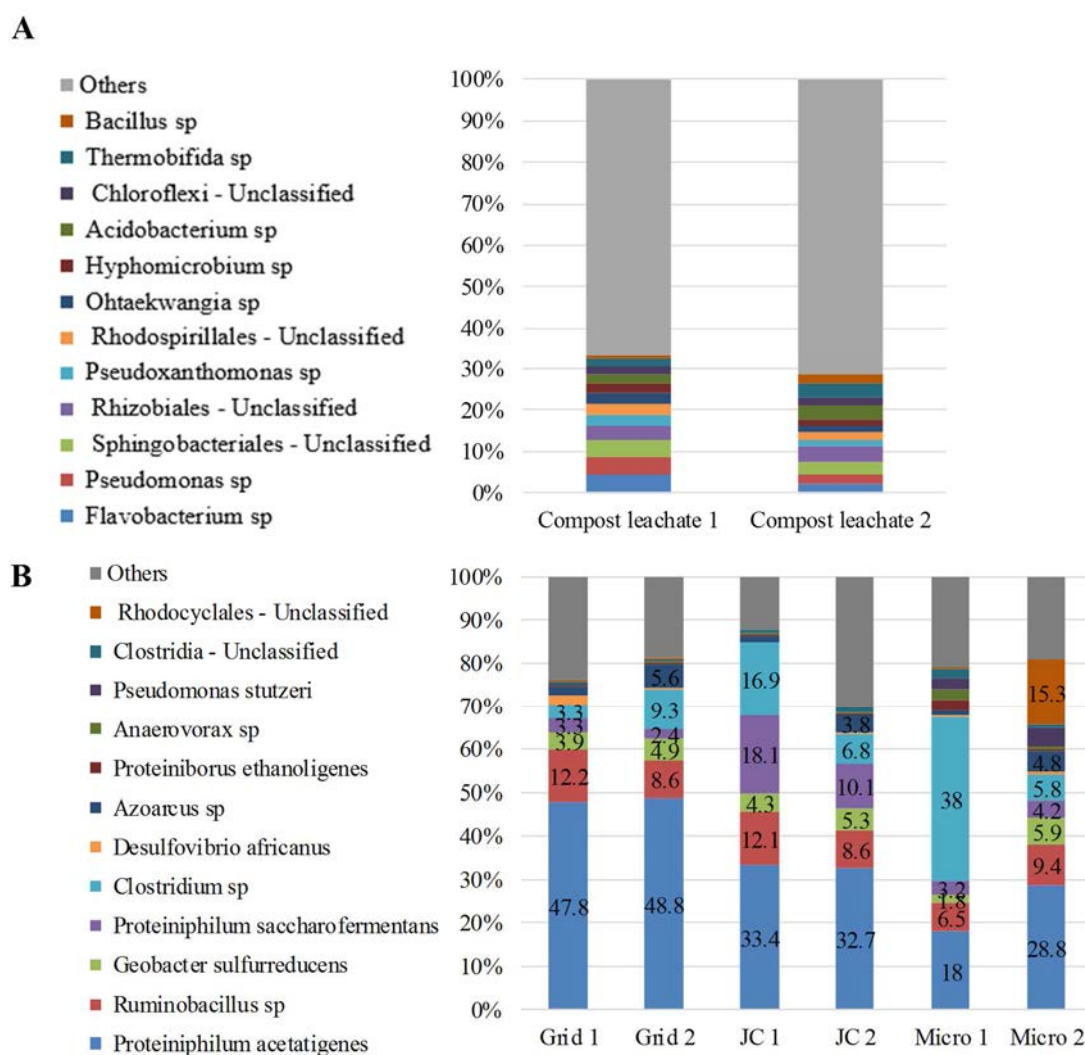


Figure 5. Major bacterial species in percentage of the total population of (A) compost leachate medium, (B) SEA bioanodes. Species detected at less than 2% in all bioanodes were classified as “Others”.

To the best of our knowledge, many species, which were present here at significant proportions, have not been detected so far among the major species of microbial anodes. The most surprising was the large proportion of *Proteiniphilum acetatigenes*, which made up a high percentage of the microorganisms present in all bioanodes and was the most abundant species for 5 bioanodes. Furthermore, neither the *Proteiniphilum acetatigenes* species nor the *Proteiniphilum* genus were

detected in the initial compost leachate. The same situation occurred for the *Ruminobacillus sp.*, which appeared as the second most abundant species in several bioanodes and was below the detection threshold in the initial compost leachate. The presence of such high proportions of *Proteiniphilum acetatigenes* and *Ruminobacillus sp* in the bioanode communities was consequently the result of strong selection. These species are not known for its anode-respiring capability. To the best of our knowledge, the *Proteiniphilum* genus has been detected in the microbial community of a biocathode that achieved reduction of p-nitrophenols [41] but not in microbial anodes, at least not in considerable proportions. In contrast, *Proteiniphilum acetatigenes* is well-known in the domain of waste water treatment as it can be used for bioaugmentation of sewage sludge to improve the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons [42,43] Finally, it should be noticed that all the species identified were anaerobic. Aerobic species might be present among unclassified species, but it can be concluded that all bioanodes were satisfactory protected from oxygen crossover, even in the Grid-SEAs.

3.4. Discussion

The main objective usually evoked when implementing SEA is to decrease the anode-cathode distance in order to reduce the internal resistance. Decreasing the distance that ions must cover to carry the current through the electrolyte is a major objective, particularly because MFCs and the other related electro-microbial technologies generally implement electrolytes with low ionic conductivity [23]. Nevertheless, it is commonly believed that the bioanode cannot be too close to an air-cathode because the flux of oxygen that passes through the air-cathode inhibits and/or deteriorates the bioanode. In the presence of oxygen, the strictly anaerobic electroactive bacteria are blocked and the electroactive bacteria able to work with oxygen are diverted from using the anode as the electron acceptor. In addition, the presence of oxygen favours the growth of non-electroactive bacteria in the bioanode microbial community. In all cases, the presence of oxygen on the bioanode is detrimental to its performance. It has been observed that an anode-cathode distance of 1-2 cm is optimal to ensure the shortest possible ionic path length while keeping the bioanode far enough away from the oxygen flux [8,19–21]. For this reason, it is commonly thought that a separator is needed in an SEA to reduce the anode-cathode distance to the millimetre scale while protecting the bioanode from oxygen crossover.

In this context, the high power densities obtained here by using the grid as the separator, which provided no protection against oxygen crossover, were surprising. The only role of the grid was to keep an anode-cathode distance of around 4 mm in order to avoid short-circuiting by small lengths of yarn that might dissociate from the carbon cloth weft. Such a problem has been observed with anode bristles [25] when too thin a carbon cloth was used as the separator. The distance of 4 mm for an SEA was consistent with those reported in the literature, which can reach 5.5 mm with glass fibre separator for instance [26].

The maximum power density reached here with the grid separator was 6.4 W.m^{-2} and the average was $6 \pm 0.5 \text{ W.m}^{-2}$ at day 0. It was 5.7 ± 0.4 and $5 \pm 0.5 \text{ W.m}^{-2}$ at days 14 and 36 respectively, after the air-cathode had been changed. These values were higher than the highest power densities reported so far, which are around 4.7 W.m^{-2} [10]. It has been claimed recently [44] that the highest power density reported with SEA was of the order of 4.3 W.m^{-2} [24]. The reasons why a grid used as the separator led to such high performance in comparison with the state of the art are discussed below.

It is noteworthy that the power density produced depended directly on the separator nature in the order Grid > Jcloth > Paper. The grid always led to significantly higher power density than J-cloth,

although they had similar ionic resistance (3.4 ± 0.3 and $2.5 \pm 0.3 \Omega$, respectively). Looking at the SEA internal resistance was consequently not a promising approach to explain the high performance of the Grid-SEAs.

J-cloth constituted a low, but significant, hindrance to OH^- mass transfer and the paper hindered OH^- mass transfer more strongly, as indicated by the k_{OH^-} measurements. Hindrance to OH^- diffusion was in the order Grid < J-cloth < Paper. The three SEA types consequently operated under different pH conditions. In all cases, OH^- ions were produced at the cathode:



and protons at the anode:



A bioanode tends to acidify locally, which is detrimental to its kinetics because electroactive bacteria are inhibited by pH slightly lower than neutrality [45]. In parallel, an air-cathode tends to alkalinize, which is thermodynamically detrimental and may also favour the precipitation of mineral hydroxides [35]. Avoiding bioanode acidification [45] and cathode alkalinisation [35] is a key issue in the optimization of MFC operation [44].

Here, between the anode that produced protons and the cathode that produced OH^- , it can be guessed easily that the pH gradient was the lowest in the Grid-SEAs, which permitted free diffusion and migration of the buffering species through the large grid mesh. The distance between anode and cathode was short and diffusion was not hampered between them. This was the best possible situation to balance the internal pH of the SEA and mitigate both bioanode acidification and cathode alkalinization. In contrast, the paper constituted a low but significant barrier to OH^- transfer. It was observed that this barrier hampered the cathode performance. The J-cloth had a median position on the scale of diffusion hindrance. The remarkably high performance achieved with the Grid-SEAs can be attributed to the optimal pH balance inside the SEA. The lower performance levels obtained with JCloth-SEAs and Paper-SEAs were probably related to the increasing barrier to diffusion of the buffering species. The different pH situations may also explain the difference in microbial communities depending on the nature of the separator.

The effects of migration and diffusion on pH balance can be assessed theoretically [23]. The electrolyte was mainly composed of KCl 60 mM, NaHCO_3 buffer 50 mM, NaH_2PO_4 20 mM and sodium acetate 20 mM, which corresponded, at pH 7.0, to the transport numbers reported in Table 2.

In the absence of diffusion and convection, when migration is the only motor of mass transfer, transport numbers give the contribution of each ion type to current transport through the electrolyte. Here the transport numbers indicate that, in the absence of diffusion, 86.3% of the current would be transported through the electrolyte by the motion of the K^+ , Na^+ and Cl^- ions. The buffering species were consequently weakly moved by migration. This assumption was confirmed by calculating the molecular flux of each ion. Molecular fluxes were obtained by dividing the transport numbers by the ion charge (for theoretical details see [23]).

Table 2. Concentration, transport numbers (t_i) and molecular fluxes of the major ions contained in the electrolyte (pH 7.0). The molecular fluxes were calculated on the basis of 100 electrons exchanged at the electrodes.

Species	Concentration (mol.L ⁻¹)	$t_i \times 100$ (percentage)	Molecular fluxes (molecule/100 electrons)
H ⁺	10 ⁻⁷	2.17×10 ⁻⁴	2.17×10 ⁻⁴
HO ⁻	10 ⁻⁷	1.23×10 ⁻⁴	1.23×10 ⁻⁴
HCO ₃ ⁻	0.048	0.28	0.28
K ⁺	0.06	27.38	27.38
Cl ⁻	0.06	28.43	28.43
H ₂ PO ₄ ⁻	0.012	2.68	2.68
HPO ₄ ²⁻	0.008	5.66	2.83
CH ₃ COO ⁻	0.02	5.08	5.08
Na ⁺	0.1	30.49	30.49

A balance can be drawn up on the basis of 100 electrons exchanged. For 100 electrons exchanged, 100 OH⁻ ions are produced at the cathode (Equation 3) and 112.5 protons are produced at the anode (Equation 4). In this context, migration inside the SEA contributed to pH balance only by the motion of 2.83 HPO₄²⁻ ions towards the anode. These fluxes were clearly not sufficient to balance the production of 112.5 protons. Migration did not ensure pH balance inside the SEA. Consequently, pH gradients were established inside the SEA by accumulation of the acidic form of the buffering (H₂CO₃, H₂PO₄⁻) close to the anode surface and the alkaline forms (HCO₃⁻, HPO₄²⁻) close to the cathode surface, and pH balance was mainly achieved by gradient-driven diffusion of the buffering species.

Local pH is the main parameter that controls the electrode kinetics. The present studies confirmed the main importance of pH balance in controlling MFC performance [23,44,46]. Here, migration helped to mitigate the bioanode acidification and the cathode alkalization only to a minor extent. pH balance was mainly ensured by the diffusion of buffering species. This situation explains why J-cloth had a detrimental effect on MFC performance with respect to the grids although both separators displayed similar internal resistance. The internal ionic resistance is related to migration, while diffusion was the key process ensuring pH balance inside the SEA.

This theoretical approach put in light the crucial role of the pH balance and how it can simply explain the better performance obtained with the grid separator. Controlling and improving pH balance between the bioanode and the cathode should be a major way to go ahead in increasing the performance of MFCs and particularly SEAs. In this way, implementing microelectrodes to measure the local pH values inside SEAs should be a helpful experimental support.

The grid separator was the most efficient in letting buffering compounds diffuse freely. This is an extremely simple and efficient solution to achieve pH balance inside the SEA. In return, it could be feared that the bioanode may not be protected against oxygen diffusion from the cathode. Actually, most bioanodes implemented with the grid and J-cloth separators presented a shift towards positive values (3 out of 4 after 14 days), while this was not observed with the Paper-SEAs. This shift may have

been due to oxygen crossover, which resulted in a mixed potential [33]. Nevertheless, identification of the microbial communities showed that all bioanodes without exception presented a large percentage of anaerobic species. It can be guessed that oxygen crossover was mitigated by the combination of three virtuous effects. Firstly, epifluorescence microscopy showed the presence of microorganisms on the cathode surface, with greater biofilm coverage in the case of the grid separator. These microorganisms most likely helped to consume the oxygen that crossed the air-cathode. Secondly, thanks to its 3-dimensional structure, the bioanode had a larger active surface area than the cathode. The cathode was thus forced to work at high current density and consequently to consume a large proportion of the oxygen flux that crossed it. Thirdly, the 3-dimensional structure of the bioanode should allow aerobic species to develop on small parts of the electrode against the separator. The aerobic patches remained restricted to a small percentage of the anode surface area, so aerobic species were not among the most abundant species of the bioanode community. Such growth of protective aerobic species has already been suspected when 3-dimensional brush bioanodes were set too close to air-cathodes [8]. In the case of flat 2-dimensional bioanodes, such a parasitic aerobic growth would severely hamper the MFC performance. Here, the 3-dimensional structure may have accepted minor aerobic patches.

These remarks suggest two possible ways to improve the Grid-SEA design by mitigating oxygen crossover. Favouring the formation of an aerobic biofilm as close as possible to the cathode surface could be a promising solution, and has already been proposed under the name of "microbial separator" [23]. The present data confirm the interest of this option by showing that the formation of a biofilm was not a cause of deterioration of the cathode kinetics. Secondly, cell design and operational strategy may be chosen in order to force the cathode to work at high current density and thus consume as much oxygen as possible, reducing the remaining flux to the bioanode. A 3-dimensional bioanode, as used here, is a suitable design for this purpose. It may also be advisable to work at high current rather than high voltage or maximum power. The commercial interest of working at high current to protect the bioanode against oxygen crossover, rather than working at maximum power, should be further investigated by comparing the efficiency of the whole system including the appropriate electronic control devices.

The paper separator led to modest performance, which never exceeded $3.2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ (day 16). The paper separator delayed cathode wetting and affected the cathode kinetics by hampering the pH balance. Nevertheless, the paper separator kept the bioanodes and air-cathodes fairly stable over time compared to the other two separators. Bioanodes were protected against oxygen crossover, so the shift towards positive potentials observed with most of the bioanodes used with the grid or J-cloth separators did not occur with paper. The paper separator also delayed the air-cathode inhibition, although it did not significantly impact the cathode biofouling in comparison to the J-cloth separator. Formation of the biofilm on the cathode surface was similar with J-cloth and paper separators. In contrast, the visual aspect of the silicon foils used during the bioanode preparation phase showed that the paper considerably protected the foil against fouling, to a greater extent than J-cloth did. It can consequently be assumed that the paper separator stabilized the cathode kinetics by mitigating fouling rather than biofouling. These data tend to confirm the higher impact of surface fouling rather than biofouling on cathode performance, which has been suggested from the analysis of cathode surface deposits [47].

The study also provided evidence of a stringent selection of *Proteiniphilum* species, which were heavily dominant in the more efficient MFCs, particularly *Proteiniphilum acetatigenes*. The ratio of this species depended on the kind of separator and increased with the MFC performance. This species would deserve further study to confirm its possible high electroactivity. The presence of a low percentage of *Geobacter sulfurreducens* in all the bioanodes makes us wonder whether *P. acetatigenes* is electroactive by itself or whether it works in synergy with *G. sulfurreducens*. *P. acetatigenes* is known for its capability to enhance the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment [42,43]. The strong selection observed here from an initial medium where this species was not detected is an additional point of interest of the study. It may open up a new avenue for the formation of bioanodes dedicated to wastewater treatment. It also points to the interest of the microbial richness of soils [40,48] as a source of efficient electroactive biofilms that is far from being fully exploited so far.

Finally, the original SEA design proposed here, which included a removable air-cathode, proved to be fully efficient. The 18 replacements of air-cathodes (at days 14, 36 and 49) were performed without draining the electrolyte or disturbing the bioanode kinetics. In each case, the air-cathode replacement was immediately followed by an increase in the MFC performance. This strategy allowed the bioanodes to be optimally exploited, e.g. by boosting the power density of Grid-MFCs to above 4 W.m⁻² after 7 weeks of operation.

4. Conclusion

Power densities higher than those reported so far, up to 6.4 W.m⁻², were produced with SEAs using an open grid as the separator. The sole function of this separator was to avoid electrical short-circuiting between anode and cathode while leaving the widest possible space for the free transport of all species. The excellent results obtained with such a simple configuration were explained by at least three reasons: i) The essential importance of pH balance; free diffusion of all species through the large-mesh grid was the best situation to mitigate acidification of the bioanode and alkalization of the air-cathode; ii) the grid did not hinder oxygen crossover but the 3-dimensional structure of the bioanode might accept the occurrence of aerobic patches, which consumed oxygen and protected the dominant anaerobic microbial species; moreover, oxygen crossover was probably mitigated by the development of an aerobic biofilm on the cathode surface; iii) using a removable cathode was the third major reason for the good performance obtained here. It allowed the early inhibition of the cathode kinetics to be overcome. Although it cannot be an economically-sustainable strategy, the removable cathode design succeeded in revealing the full performance of SEAs. Finally, the strong selection of *Proteiniphilum acetatigenes* is an intriguing issue. The high, and reproducible, ratios observed in the best performing SEAs cannot be fortuitous, and the mechanisms of its contribution to electroactivity deserves further basic studies, in particular because of its possible interest for wastewater treatment.

Acknowledgements

This work benefited from the 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). The authors acknowledge the LGC workshop for manufacturing the MFC and SEA devices under the guidance of Alain Müller and Vincent Loisel. The authors also greatly appreciated the help of Marie-Line De Solan (LGC-INPT) for SEM imaging, of Sophie Pecastaings (PhD) and Alexis Simons (PhD student) for ADN extraction.

References

- [1] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1533–43.
- [2] P. Pandey, VN. Shinde, RL. Deopurkar, SP. Kale, SA. Patil, D. Pant, Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery, *Appl. Energy*. 168 (2016) 706–723.
- [3] Y. Ye, X. Zhu, BE. Logan, Effect of buffer charge on performance of air-cathodes used in microbial fuel cells, *Electrochim. Acta*. 194 (2016) 441–447.
- [4] AP. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z-W. Wang, Y. Feng, BH. Kim, Electroactive biofilms: Current status and future research needs, *Energ. Environ. Sci.* 4 (2011) 4813–34.
- [5] D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M-L. Delia, A. Bergel, Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 13332–43.
- [6] M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable, A. Bergel, Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 16349–66.
- [7] FJ. Hernandez-Fernandez, A. Perez de los Rios, MJ. Salar-Garcia, VM. Ortiz-Martinez, LJ. Lozano-Blanco, C. Godinez, et al., Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment, *Fuel Process. Technol.* 138 (2015) 284–97.
- [8] BE. Logan, MJ. Wallack, K-Y. Kim, W. He, Y. Feng, PE. Saikaly, Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (2015) 206–14.
- [9] Y. Fan, E. Sharbrough, H. Liu, Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8101–7.
- [10] W. Yang, BE. Logan, Immobilization of a Metal-Nitrogen-Carbon Catalyst on Activated Carbon with Enhanced Cathode Performance in Microbial Fuel Cells, *Chemosuschem.* 9 (2016) 2226–32.
- [11] C. Santoro, S. Babanova, P. Atanassov, B. Li, I. Ieropoulos, P. Cristiani, High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode, *J. Electrochem. Soc.* 160 (2013) H720–6.
- [12] T. Ewing, PT. Ha, JT. Babauta, NT. Tang, D. Heo, H. Beyenal, Scale-up of sediment microbial fuel cells, *J. Power Sources* 272 (2014) 311–9.
- [13] W-W. Li, H-Q. Yu, Stimulating sediment bioremediation with benthic microbial fuel cells, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1–12.
- [14] R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M-L. Delia, A. Bergel, Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells, *Electrochem. Commun.* 33 (2013) 1–4.
- [15] R. Rousseau, C. Santaella, W. Achouak, J-J. Godon, A. Bonnafous, A. Bergel, et al., Correlation of the Electrochemical Kinetics of High-Salinity-Tolerant Bioanodes with the Structure and Microbial Composition of the Biofilm, *Chemelectrochem.* 1 (2014) 1966–75.
- [16] M. Grattieri, M. Suvira, K. Hasan, S.D. Minteer, Halotolerant extremophile bacteria from the Great Salt Lake for recycling pollutants in microbial fuel cells, *J. Power Sources* (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.11.090>.
- [17] R. Karthikeyan, A. Selvam, KY. Cheng, JW-C. Wong, Influence of ionic conductivity in bioelectricity production from saline domestic sewage sludge in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 845–52.
- [18] N. Jannelli, RA. Nastro, V. Cigolotti, M. Minutillo, G. Falucci, Low pH, high salinity: Too much for microbial fuel cells?, *Appl. Energy.* (2016) Available online 3 August 2016, ISSN 0306-2619, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.079>.

- [19] S. Cheng, H. Liu, B.E. Logan, Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2426–32.
- [20] Y. Fan, H. Hu, H. Liu, Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration, *J. Power Sources* 171 (2007) 348–54.
- [21] J.M. Moon, S. Kondaveeti, T.H. Lee, Y.C. Song, B. Min, Minimum interspatial electrode spacing to optimize air-cathode microbial fuel cell operation with a membrane electrode assembly. *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 263–7.
- [22] X. Zhang, S. Cheng, P. Liang, X. Huang, B.E. Logan, Scalable air cathode microbial fuel cells using glass fiber separators, plastic mesh supporters, and graphite fiber brush anodes, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 372–5.
- [23] M. Ollot, S. Galier, H. Roux de Balmain, A. Bergel, Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review, *Appl. Energy.* 183 (2016) 1682–704.
- [24] Y. Fan, S-K. Han, H. Liu, Improved performance of CEA microbial fuel cells with increased reactor size, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 8273–80.
- [25] Y. Ahn, B.E. Logan, A multi-electrode continuous flow microbial fuel cell with separator electrode assembly design, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 2241–8.
- [26] V. Yousefi, D. Mohebbi-Kalhari, A. Samimi, M. Salari, Effect of separator electrode assembly (SEA) design and mode of operation on the performance of continuous tubular microbial fuel cells (MFCs), *Int. J. Hydrog. Energy.* 41 (2016) 597–606.
- [27] S. Hays, F. Zhang, B.E. Logan, Performance of two different types of anodes in membrane electrode assembly microbial fuel cells for power generation from domestic wastewater, *J. Power Sources* 196 (2011) 8293–300.
- [28] F. Zhang, X. Xia, Y. Luo, D. Sun, D.F. Call, B.E. Logan, Improving startup performance with carbon mesh anodes in separator electrode assembly microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 133 (2013) 74–81.
- [29] M. Ollot, L. Etcheverry, A. Bergel, Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 691–6.
- [30] B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, et al., Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 276–84.
- [31] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 1006–11.
- [32] E. Blanchet, E. Desmond, B. Erable, A. Bridier, T. Bouchez, A. Bergel, Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment, *Bioresour. Technol.* 185 (2015) 106–15.
- [33] F. Harnisch, S. Wirth, U. Schroeder, Effects of substrate and metabolite crossover on the cathodic oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: Platinum vs. iron(II) phthalocyanine based electrodes, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 2253–6.
- [34] Y. Yuan, S. Zhou, J. Tang, In Situ Investigation of Cathode and Local Biofilm Microenvironments Reveals Important Roles of OH⁻ and Oxygen Transport in Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 4911–7.
- [35] S.C. Popat, D. Ki, B.E. Rittmann, C.I. Torres, Importance of OH⁻ Transport from Cathodes in Microbial Fuel Cells, *Chemoschem.* 5 (2012) 1071–9.
- [36] H. Liu, S. Cheng, L. Huang, B.E. Logan, Scale-Lip of membrane-free single-chamber microbial fuel cells, *J. Power Sources* 179 (2008) 274–9.
- [37] U. Michaelidou, A. ter Heijne, G.J.W. Euverink, H.V.M. Hamelers, A.J.M. Stams, J.S. Geelhoed, Microbial Communities and Electrochemical Performance of Titanium-Based Anodic Electrodes in a Microbial Fuel Cell, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1069–75.

- [38] K. Rabaey, N. Boon, SD. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete, Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5373–82.
- [39] HS. Park, BH. Kim, HS. Kim, HJ. Kim, GT. Kim, M. Kim, et al., A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell, *Anaerobe.* 7 (2001) 297–306.
- [40] SJ. Dunaj, JJ. Vallino, ME. Hines, M. Gay, C. Kobyljanec, JN. Rooney-Varga, Relationships between Soil Organic Matter, Nutrients, Bacterial Community Structure, And the Performance of Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 1914–22.
- [41] L. Zhang, X. Jiang, J. Shen, K. Xu, J. Li, X. Sun, et al., Enhanced bioelectrochemical reduction of p-nitrophenols in the cathode of self-driven microbial fuel cells, *Rsc. Adv.* 6 (2016) 29072–9.
- [42] SY. Chen, XZ. Dong, *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (2005) 2257–61.
- [43] SB. Larsen, D. Karakashev, I. Angelidaki, JE. Schmidt, Ex-situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge, *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 1568–72.
- [44] SC. Papat, CI. Torres, Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 265–73.
- [45] CI. Torres, AK. Marcus, BE. Rittmann, Proton Transport Inside the Biofilm Limits Electrical Current Generation by Anode-Respiring Bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 872–81.
- [46] SC. Papat, D. Ki, MN. Young, BE. Rittmann, CI. Torres, Buffer pK(a) and Transport Govern the Concentration Overpotential in Electrochemical Oxygen Reduction at Neutral Ph, *Chemelectrochem.* 1 (2014) 1909–15.
- [47] M. Santini, M. Guizzoni, M. Lorenzi, P. Atanassov, E. Marsili, S. Fest-Santini, et al., Three-dimensional X-ray microcomputed tomography of carbonates and biofilm on operated cathode in single chamber microbial fuel cell, *Biointerphases* 10 (2015) 31009.
- [48] RA. Barbato, KL. Foley, JA. Toro-Zapata, RM. Jones, CM. Reynolds, The power of soil microbes: Sustained power production in terrestrial microbial fuel cells under various temperature regimes, *Appl. Soil Ecol.* 109 (2017) 14–22.

4. Conclusions du Chapitre 5

Quatre architectures de piles à combustible microbiennes sont présentées dans ce Chapitre 5. Toutes ont été élaborées avec l'objectif principal de contourner le biofouling de la cathode à air sans porter atteinte à la bioanode.

Le prototype « PCM avec cathode à air amovible » a prouvé son efficacité en délivrant des puissances significativement plus élevées dès qu'une cathode encrassée est remplacée par une cathode neuve. Par ailleurs, grâce à cette architecture, la cathode peut être incorporée au réacteur uniquement lors du fonctionnement en pile. Il est ainsi possible d'éviter un fouling prématuré de l'électrode durant la phase préliminaire de préparation de la bioanode. Ce prototype a en outre révélé la dégradation rapide de la cinétique de la cathode dès sa mise en contact avec l'électrolyte, sans doute à cause du fouling de sa surface. L'importance de ce phénomène de fouling initial n'avait pas été décelée auparavant, parce qu'il est masqué par l'accroissement simultané de la cinétique de la bioanode. Le prototype a donc mis en lumière une cause sans doute très répandue de sous-estimation des puissances maximales que peuvent atteindre les PCMs. Toutefois, l'assemblage cathode-collecteur restait à améliorer pour ce prototype car le montage avec un joint silicone ne permet pas un contact électrique optimal, comme cela a été démontré dans le Chapitre 4.

L'un des objectifs des deux prototypes « Multiple Air-Cathodes » et « Cube » était de pallier la cinétique déficiente de la cathode à air par l'augmentation de sa surface. Les PCMs formées avec le prototype « MAC » voient leurs puissances augmenter avec l'ajout des cathodes à air. Cependant, le faible volume du réacteur et la configuration des cathodes insérées dans des fentes non hermétiques à l'air n'assurent pas des conditions optimales pour la stabilité de la bioanode. Par ailleurs, l'assemblage des cathodes avec le collecteur reste artisanal et de nombreuses pertes de la couche catalytique sont susceptibles de se produire au cours de la fabrication. La fixation des cathodes entre elles et sur le collecteur avec de la colle n'est certainement pas le protocole idéal. Améliorer le procédé d'élaboration des modules de cathodes à air serait donc un point clé pour progresser dans la conception de ce prototype. D'un point de vue technique, le prototype « Cube » a résolu le problème de connexion électrique entre cathode à air et collecteur. Expérimentalement, il a confirmé que la puissance délivrée augmente lorsque le nombre de cathodes connectées autour d'une même bioanode croît d'un à quatre. L'extrapolation numérique montre toutefois la limite de cette méthode. Au-delà de quatre cathodes, la puissance délivrée par une PCM tend à stagner voire même à légèrement diminuer avec huit cathodes, à cause de la chute ohmique qui croît à mesure que le nombre de cathodes disposées autour de la bioanode augmente. C'est là un verrou important pour les PCMs, en raison de la faible conductivité ionique des électrolytes imposés par les bioanodes microbiennes. Dernier point, mais pas le moindre, les expériences ont toutes révélé qu'une bioanode de configuration plane devient l'électrode limitante de la pile lorsque la surface de la cathode devient suffisamment importante. Une bioanode tridimensionnelle permet de surmonter ce verrou, mais l'expérience a encore une fois mis en évidence la difficulté de former des bioanodes efficaces de grande taille et le manque cruel de connaissances fondamentales pour avancer dans cette direction.

Finalement, le réacteur « Assemblage Séparateur-Electrode avec cathode amovible » réunit en quelque sorte toutes les solutions aux problématiques rencontrées dans ce chapitre 5. La configuration de cathode amovible a été transférée à l'ASE et permet toujours de remplacer la cathode à air encrassée sans perturber la bioanode, malgré sa proximité. Le contact cathode-collecteur est assuré par un système de couronne vissée mise au point avec le prototype Cube. La distance bioanode-

cathode est réduite à son minimum grâce à la configuration « ASE » afin de réduire la résistance ionique. Les possibles perturbations dues au crossover de l'oxygène vers la bioanode sont palliées par la structure tridimensionnelle de la bioanode. Les expériences montrent que toutes ces prévisions sont parfaitement réalisées par l'ASE qui permet d'atteindre des densités de puissance de 6.4 W.m^{-2} , c'est-à-dire au-delà des densités de puissance reportées jusqu'à présent pour toutes les PCMs qui utilisent l'oxygène comme oxydant. De plus, nous avons eu la surprise de constater qu'une simple grille utilisée comme séparateur assurait les densités de puissance les plus élevées. L'interprétation de ce résultat inattendu indique que c'est certainement l'équilibre des valeurs de pH entre bioanode et cathode qui est le phénomène limitant essentiel dans l'ASE. Ce sera donc un critère d'optimisation à privilégier pour la suite.

CHAPITRE 6 : Optimisation d'un assemblage de piles à combustible microbiennes

1. Connexion en série de piles à combustible microbiennes dans un électrolyte commun : des résultats mitigés (Publication 5).....	235
2. Prototype de démonstration « Bioelec »	260
2.1. Conception du prototype	260
2.2. Procédure expérimentale.....	261
2.3. Résultats expérimentaux	262
2.3.1. Détermination de la configuration optimale.....	262
2.3.2. Suivi des performances du prototype « Bioelec » au cours du temps.....	264
3. Conclusions du Chapitre 6	267

Le projet Bioelec vise à faire la démonstration de l'intérêt de la technologie pile à combustible microbienne (PCM) pour la production d'électricité autonome. Cependant, un verrou majeur supplémentaire, qui n'a pas encore été abordé dans ce manuscrit, est la faible tension délivrée par une PCM lorsque celle-ci opère à des puissances proches de la puissance maximale. Les expériences ont par exemple montré qu'une PCM, pourtant très performante, ne délivre qu'une tension de l'ordre de 0.3 V à une puissance maximale de 6.2 mW (partie 3 du Chapitre 5). On prend alors conscience de la difficulté d'utiliser ces systèmes pour alimenter quelque objet domestique que ce soit.

Deux possibilités s'offrent à nous pour tenter d'augmenter la tension délivrée. Il est possible d'utiliser en sortie de la PCM un convertisseur DC/DC, système électronique qui permet d'accroître la tension (H. Wang et coll., 2015; X. Zhang et coll., 2015). Toutefois, pour fonctionner, ce système consomme une partie de la puissance délivrée. Une alternative au convertisseur serait de connecter plusieurs PCMs en série, ce qui permet en théorie d'atteindre une tension globale égale à la somme des tensions individuelles de chaque PCM.

C'est autour de cette seconde option que s'articule ce dernier chapitre. Dans une première partie, il a paru intéressant d'étudier la possibilité de connecter plusieurs PCMs en série partageant un électrolyte commun. Cette architecture permettrait d'augmenter la tension de sortie tout en simplifiant les opérations de maintenance. La deuxième partie de ce chapitre porte sur la conception d'un prototype finalisant le projet Bioelec. Celui-ci est composé d'un stack optimal de PCMs combinant branchements électriques en série et en parallèle afin de maximiser la puissance délivrée. L'idée est de concevoir un système d'alimentation de petits appareils électroniques qui soit simple et puisse servir de démonstrateur de la technologie PCM pour le grand public. Dans ce chapitre, on se permet d'employer l'anglicisme « stack » pour qualifier un assemblage de plusieurs PCMs afin de le différencier du mot « Pile », utilisé pour un unique ensemble bioanode-cathode, et éviter toute confusion avec le terme « Assemblage » utilisé pour nommer la configuration « Assemblage Séparateur-Electrodes ».

1. Connexion en série de piles à combustible microbiennes dans un électrolyte commun : des résultats mitigés (Publication 5)

Il est complexe de maîtriser la configuration d'un stack de PCMs branchées en série. Chaque PCM individuelle peut fonctionner comme bon lui semble, voire même de façon anarchique jusqu'à entraîner des phénomènes d'inversion de tension (An et coll., 2015; An & Lee, 2014), c'est-à-dire que certaines piles en viennent à travailler en électrolyseur plutôt qu'en générateur. Pour éviter ce phénomène, il est possible de mettre en œuvre un système électronique de gestion de l'énergie qui impose au stack de PCMs de fonctionner à la puissance maximale (F. Khaled et coll., 2015; Salvin et coll., 2015). Cependant, ces systèmes consomment une partie de l'énergie produite. Par ailleurs, nous n'étions pas en mesure d'évaluer leur intérêt ou, le cas échéant, d'aller dans cette direction, car elle requerrait des compétences en électronique, voire en génie électrique, bien au-delà du cadre du projet Bioelec.

On peut espérer atténuer la dérive d'une ou plusieurs PCMs au sein du stack en faisant fonctionner toutes les piles dans un même électrolyte. Chaque pile fonctionne ainsi dans les mêmes conditions. Un électrolyte commun présenterait d'autres avantages. L'architecture du prototype serait plus compacte qu'un assemblage de piles indépendantes, les opérations de maintenance, comme par exemple le

remplacement du milieu nutritif, seraient simplifiées et l'approvisionnement en substrat facilité en alimentant toutes les PCM du stack par un seul ajout.

Plusieurs études ont cependant montré que la connexion en série de plusieurs PCM dans un électrolyte commun conduisait à de faibles performances, en particulier avec des tensions en sortie de stack bien inférieures à la somme des tensions de chaque pile (D. Kim et coll., 2012; Zhuang & S. Zhou, 2009). Par exemple, quatre PCM assurant chacune une tension de 0.34 V ne fournissent que 0.73 V une fois connectées en série (B. Kim et coll., 2013). Ces pertes de performance sont attribuées à des phénomènes de court-circuit ionique entre les cellules au sein de l'électrolyte (O'Hayre et coll., 2003; B. Wang & Han, 2009). Jusqu'à présent, augmenter la distance entre les PCM est la seule solution efficace qui ait été proposée pour atténuer ce phénomène (D. Kim et coll., 2012).

Etant donné que la problématique porte sur des phénomènes de conduction ionique, il a semblé pertinent de l'approcher par la modélisation de la distribution de potentiel au sein de l'électrolyte pour mieux comprendre les anomalies du système. C'est dans cette optique que s'inscrit l'article 5 intitulé « Microbial fuel cells connected in series in a common electrolyte underperform: Understanding why and in what context it can be applied » et soumis pour publication dans le journal *Electrochimica Acta*. Cette étude combine une approche expérimentale et un modèle numérique qui reproduit la géométrie de deux PCM connectées en série dans un même électrolyte. Le modèle est validé à l'aide des résultats expérimentaux, puis exploité pour explorer les améliorations envisageables de la configuration qui permettraient de se rapprocher des performances théoriques.

Le prototype expérimental élaboré pour cette étude est un parallélépipède creux de 26 x 7 x 10.5 cm³ (L x l x h) en plexiglass de volume 1.8 L. Il est conçu de sorte à disposer deux PCM l'une à côté de l'autre et partageant le même électrolyte (Figure 40). Il comporte deux ouvertures circulaires situées sur la même face et espacées d'une distance D de 8.5 cm. De la même façon que les prototypes présentés dans le chapitre 5, ces ouvertures sont conçues pour accueillir les cathodes à air et les collecteurs de courant, plaqués l'un contre l'autre par un système de couronnes vissées. Des joints toriques assurent l'étanchéité du système. Le couvercle du prototype comporte différents piquages permettant l'insertion d'une électrode de référence et les connexions électriques des bioanodes. La distance entre la bioanode et la cathode d'une même PCM, notée d , est de 5 cm.

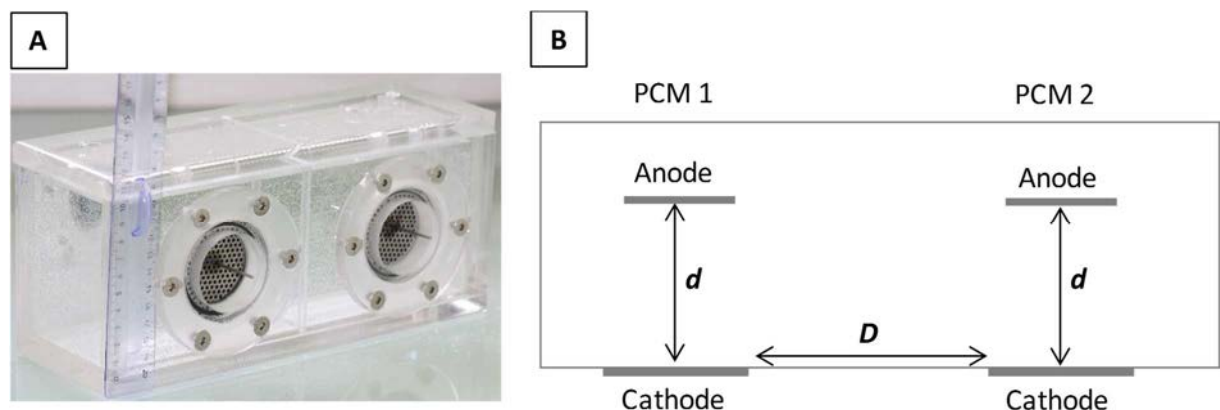


Figure 40. (A) Photographie et (B) schéma vu de dessus du prototype conçu pour l'étude de la connexion de deux PCM en série dans un électrolyte commun.

Dans l'article qui suit, deux PCM (PCM 1 et PCM 2) partageant le même électrolyte sont caractérisées par le tracé des courbes de puissance et des cinétiques des électrodes. Chaque PCM est constituée d'une bioanode en tissu de carbone de surface projetée 9 cm² connectée à la cathode à air située en face d'elle. Les deux bioanodes sont au préalable formées dans des réacteurs indépendants sous polarisation grâce à un montage électrochimique à trois électrodes (décrit au Chapitre 2). Une fois mures, les bioanodes sont transférées dans le prototype de l'étude et montées en pile. Deux positions de bioanodes sont testées pour vérifier la reproductibilité des résultats : la bioanode est placée soit parallèlement soit perpendiculairement à la cathode. Les conditions expérimentales de l'étude sont résumées dans le Tableau 28 et les dispositifs sont décrits en détail dans le Chapitre 2.

La procédure expérimentale est la suivante. Dans un premier temps, chaque PCM est caractérisée individuellement l'une après l'autre. Les deux PCM sont ensuite connectées en série, de sorte que la cathode de la PCM 1 est reliée à la bioanode de la PCM 2, et le stack est caractérisé. Aucun ajout d'acétate n'est effectué entre les trois mesures de courbe de puissance. Le modèle numérique est validé en reproduisant la courbe de puissance globale à partir de la cinétique expérimentale des électrodes.

Tableau 28. Conditions expérimentales utilisées dans l'article 5 « Microbial fuel cells connected in series in a common electrolyte underperform: Understanding why and in what context it can be applied ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile avec une résistance de 100 Ω		
Réacteur : « PCM dans un électrolyte commun » - S _{cathode} = 14 cm ²		
2 PCM : analyse de chaque PCM individuelle puis des deux PCM connectées en série		
Bioanode : plane, tissu de carbone, S _{projetée} = 9 cm ² , formée par procédure « polarisation complète », inoculum « lixiviat de terreau »		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	
Spectroscopie d'impédance électrochimique à potentiel imposé pour mesurer la chute ohmique		
Modèle numérique		
Distribution secondaire de potentiel		
Equations utilisées pour lisser les cinétiques expérimentales :		
Bioanode :	Contre-électrode :	
Butler-Volmer-Monod	Butler-Volmer	
$j = j_{max} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right)}{K_1 \exp\left(-\frac{(1-\alpha)n_e F}{RT} \eta\right) + K_2 \exp\left(-\frac{n_e F}{RT} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right)$		$j = -j_0 \exp\left[\frac{-\alpha n_e F}{RT} \eta\right]$

Les principaux résultats présentés dans la publication sont les suivants :

- Les deux PCM caractérisées individuellement présentent des performances du même ordre de grandeur, chacune délivrant une puissance maximale d'environ 1 mW à une tension autour de 0.24 V. La densité de puissance maximale calculée par rapport à la surface de la cathode, de 0.7 W.m⁻², est d'un ordre de grandeur respectable par rapport à l'état de l'art. Pour mémoire, rappelons que le maximum atteint en 2016 pour une pile de 28 mL est de 4.7 W.m⁻² (W. Yang & Logan, 2016).
- Théoriquement, la connexion en série de ces deux PCM devrait fournir une puissance de 1.7 mW à une tension de sortie de 0.47 V. Or, expérimentalement, seulement 0.7 mW de

puissance maximale sont produits à une tension de 0.21 V. Ces résultats confirment que la configuration des deux PCMs dans électrolyte commun diminue considérablement les performances du stack. Ce phénomène est observé quelle que soit la position de la bioanode par rapport à la cathode (parallèle ou perpendiculaire).

- Le modèle numérique retrouve les résultats obtenus expérimentalement pour la connexion en série des deux PCMs. Il permet, grâce à l'analyse des potentiels électrostatiques au sein de l'électrolyte, de valider que la perte considérable de puissance est causée par un court-circuit ionique entre la bioanode et la cathode qui sont connectées électriquement (cathode de la PCM 1 et bioanode de la PCM 2).
- Comme suggéré dans la littérature, le phénomène de court-circuit ionique est atténué en augmentant la distance entre les deux PCMs. Seulement, une extrapolation réalisée grâce au modèle numérique indique qu'une distance de 3 m serait nécessaire pour atteindre une puissance égale à 90% de la valeur théorique. Ce résultat est difficilement acceptable pour une configuration de prototype, qu'elle soit destinée à des applications de laboratoire, domestiques ou industrielles.
- La configuration « ASE » (« Assemblage Séparateur-Electrodes »), avec une distance bioanode-cathode réduite à 1 mm, prouve une fois de plus son efficacité. Cette configuration permet d'améliorer la puissance et la tension délivrées en diminuant la chute ohmique du système.
- Lorsque la conductivité du système est augmentée à 5.3 S.m^{-1} (conductivité de l'eau de mer à 25°C), deux phénomènes se contrebalancent : la résistance interne de chaque PCM est certes diminuée, mais le phénomène de court-circuit ionique entre les deux PCMs est accentué. Dans ces conditions, même une configuration de type « ASE » ne permettrait pas une augmentation considérable des performances. A cette conductivité, une distance de 6 mètre entre les deux PCMs serait nécessaire pour atteindre 86% de la puissance théorique. Dans ce cas également, une telle distance n'est pas plausible pour un prototype de laboratoire mais peut-être envisageable pour un dispositif en mer. Il est cependant à craindre que les pertes par effet Joule le long des longues connexions électriques n'altèrent l'intérêt du système.
- Le modèle permet d'étudier l'impact de chicanes disposées entre les deux PCMs afin d'allonger le chemin ionique entre les deux piles, tout en conservant la compacité du prototype. Cette configuration représente cependant un frein considérable à la diffusion du substrat d'un compartiment à l'autre et revient pratiquement à isoler les compartiments. En effet, le chemin nécessaire pour augmenter la puissance produite est tellement long qu'il ne permet plus d'éviter la formation de fortes différences de concentrations entre les deux compartiments. Il devient donc à nouveau possible que les piles divergent vers des comportements singuliers. Cette solution va alors à l'encontre de l'objectif initial qu'est l'homogénéité de l'électrolyte commun.



Microbial fuel cells connected in series in a common electrolyte underperform: Understanding why and in what context such a set-up can be applied



Manon Oliot^{a,*}, Luc Etcheverry^a, Renaud Mosdale^b, Alain Bergel^a

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

^b PaxiTech SAS, 32 rue de Comboire, 38130 Echirolles, France

Abstract

Microbial fuel cells (MFCs) have the outstanding ability to transform the chemical energy contained in organic matter directly to electrical energy. Unfortunately, they give only low cell voltage at maximum power. Connecting several MFCs electrically in series inside the same reactor may be a way to increase the cell voltage, but experimental attempts have shown poor efficiency for such single-electrolyte stacks. The present study uses numerical modelling to understand the behaviour of single-electrolyte MFC stacks and to assess possible ways to improve it. The numerical model was validated by comparison with two experimental MFCs that produced 0.85 ± 0.05 mW each at 0.23 V cell voltage. Connected in series in a common electrolyte, the stack produced only 0.7 mW at 0.21 V, while, in theory, 1.7 mW could be reached at 0.47 V. The model showed that the drastic power loss was due to ionic short-circuiting, which may, however, be an interesting phenomenon to be exploited for designing an electro-microbial snorkel. The model also showed that decreasing the anode-cathode distance, increasing the distance between the MFCs or using baffles between them could optimize the single-electrolyte stack to produce up to 80 % of the theoretical maximum power. Nevertheless, such designs are appropriate only for specific applications, e.g. biosensing. The model further suggests that benthic MFCs could be effectively connected in series.

Keywords : Numerical modelling; potential distribution; current line; bioelectrochemical system.

Glossary

Parameter	Meaning	Unit
B	distance between the reactor wall and MFCs	cm
d	anode-cathode distance	cm
D	distance between MFCs	cm
e	width between the baffles	cm
E	Nernst potential	mV
i_{\max}	anodic maximum current	mA
i_0	cathodic exchange current	mA
K_M	substrate affinity constant	mol.L ⁻¹
K_1, K_2	Kinetic parameters	-
S	substrate concentration	mol.L ⁻¹
U_{cell}	cell voltage	V
W	reactor depth	cm
α	charge transfer coefficient	-
σ	electrolyte ionic conductivity	S.m ⁻¹
ϕ	electrostatic potential	mV
Subscript	Meaning	
A	Anode	
C	Cathode	
M	Electrode material	
S	Solution	

1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) have the outstanding capacity to transform the chemical energy contained in low-cost, renewable organic matter directly into electrical energy. Their global performance remains limited; 6.4 W.m⁻² has recently been claimed to be the highest power density supplied so far by a laboratory prototype [1]. Nevertheless, the low power supplied is not an unsurmountable obstacle for some future applications [2]. Actually, impressive demonstrations of the capacity of MFCs to satisfy the requirements of low-power-consuming devices started to be made more than a decade ago [3].

Various sensors and telecommunication systems have been powered by MFCs [4–6] and, in this framework, sediment MFCs have shown interesting capabilities [7–9]. Fun applications such as feeding a micro-robot with insect material [10] and powering a mobile phone with urine [11,12] have also helped to enlarge the possible application fields. Recently, an MFC designed as a “floating garden” that supplied LED-lights and a data transmission device [13] was presented at the 2015 Universal Exposition. Nevertheless, a few stumbling blocks still have to be overcome before the real potential of the technology can be clearly assessed. A major concern in MFC development is the low cell voltage that is produced when they operate at maximum power [9,14].

The cell voltage of a single MFC unit can be increased by using dedicated electronic harvesting systems [9,15,16] but a part of the power produced by the cell is consumed by the electronic power management system. Another option is to connect several individual MFCs electrically in series. In theory, the voltage provided by the MFC stack is the sum of the voltages of the individual cells but, in practice, tricky control problems arise [17]. As each MFC is allowed to evolve in its own way, the cells can drift to different behaviours, which often results in some MFCs working in electrolysis mode rather than power producing mode (voltage reversal) [18,19]. In practice, the cell voltage provided by MFC stacks can be much lower than the sum of the voltages of the individual cells. A power management unit must consequently be implemented to avoid voltage reversal and boost the stack towards the theoretical maximum power [20,21].

Immersing all the MFCs that are electrically connected in series in a common reactor may be an interesting way to mitigate the deviations of individual cells, as all the cells would thus be exposed to the same electrolyte under the same conditions. Moreover, a single-electrolyte reactor would allow compact devices to be designed, in which the risk of liquid leaks would be limited, maintenance simplified, and the MFCs supplied with fuel in an easier way than with individual cells. In spite of these obvious advantages, only a few experimental attempts concerning MFC stacks in a single reactor have been reported [22–24], likely because such a design has shown poor efficiency. Connecting several MFC units in series inside the same reactor has resulted in severe voltage loss. The voltage of the stack is generally considerably lower than the sum of the voltages of the individual cells. For example, four MFCs, each ensuring a cell voltage of 0.34 V, resulted in only 0.73 V when connected in series in the same reactor [23]. Similarly, four MFCs, each producing $6.5 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$, resulted in $14.7 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ [24]. The energy loss has been attributed to lateral ion cross-conduction between the cells [24], by analogy with what has been observed in arrays of chemical fuel cells [25]. Increasing the distance between the MFC units has been proposed to mitigate the voltage loss. For instance, when the distance between two MFC units was increased from 1 to 8 cm, the percentage voltage loss decreased from around 46.5 % to 44 % [22].

An intermediate way has consequently often been used by connecting individual MFCs through a hydraulic network. When the hydraulic connection is in parallel, the different MFCs are supplied with the same electrolyte and, when the hydraulic connection is in series, the different MFCs are supplied with almost the same electrolyte, if depletion of the substrate(s) and accumulation of metabolite(s) are not too important. Even in this case, the voltage of the MFCs connected in series is generally considerably lower than the sum of the voltages of the individual cells [22,26]. Seven miniature MFCs hydraulically linked produced ten times less current when electrically connected in series instead of parallel [27]. As observed with MFC units inside the same reactor, increasing the distance between MFCs has also been reported as a possible solution in this case [28]. The connection of individual MFCs

through a hydraulic network was not considered here because the motion of the electrolyte through the different MFC cells consumes a lot of power, which limits the field of possible application types. In this context, the first self-sustained stack, achieved recently, required the connection of 40 MFC units to power the pump and the electronic control device [29]. The present study deals with the electrical connection of MFC units inside the same reactor without a hydraulic network.

As the problem is related to ionic conduction inside the stack, modelling the potential distribution should provide the most appropriate tool to address it in a comprehensive manner. The purpose of this work was to develop MFC numerical modelling to understand the cause of the voltage loss when several MFC units were set inside the same reactor, to determine whether some benefit may be gained, and in what conditions. With this objective, MFCs were designed with an abiotic air-cathode associated with a bioanode formed from compost leachate [30,31]. MFCs were fed with acetate, which was oxidized at the bioanode:



and oxygen was reduced at the cathode:



A numerical model was developed to map the electrostatic potential distribution inside the cells. The model was first validated by comparison with the experimental data and was then used to predict the performance of a single-electrolyte MFC stack by varying the architecture of the stack. The model allowed different stack architectures and large ranges of parameter values to be explored very fast so as to guide further experimental confirmation with the most appropriate designs and conditions.

3. Results and discussion

3.1. Experimental results

Two bioanodes were formed in parallel in 3-electrode set-ups under constant polarization at -0.2 V/SCE with successive batches of 20 mM acetate and then transferred into the MFC stack, each in front of an air-cathode (Fig. 1.A). Two MFC units (MFC1 and MFC2) were thus designed inside a common electrolyte.

MFC1 and MFC2 were first characterized independently. The power curves (Fig. 2.A and B) showed maximum powers of the same order of magnitude (0.9 and 0.8 mW). Open circuit voltages were 0.67 V and 0.66 V and the cell voltages measured at the maximum power also showed similar values (0.24 and 0.23 V, for MFC1 and MFC2 respectively). Power densities calculated with respect to the anode geometric surface area, of 1 W.m⁻², were modest compared to the maximum of 7 W.m⁻² previously obtained with a similar system [35]. Nevertheless, in the previous work, the MFC was designed to maximize the power density by using a cathode with a surface area 19 times larger than that of the anode and a small solution volume of 75 mL. Here, the geometrical parameters were far from the values required to maximize power density. The anode and cathode surface areas were 9 cm² and 14 cm², respectively, and the solution volume was 1.8 L. It is known that power density decreases dramatically when the electrode areas or the solution volume are increased [36,37]. For instance, it was recently claimed that 2 W.m⁻² was the highest power density achieved using an air-cathode MFC with a volume greater than 100 mL [38]. The power densities of 1 W.m⁻² obtained here in cells of 1.8 L volume were consequently consistent with the current performance of the state of the art.

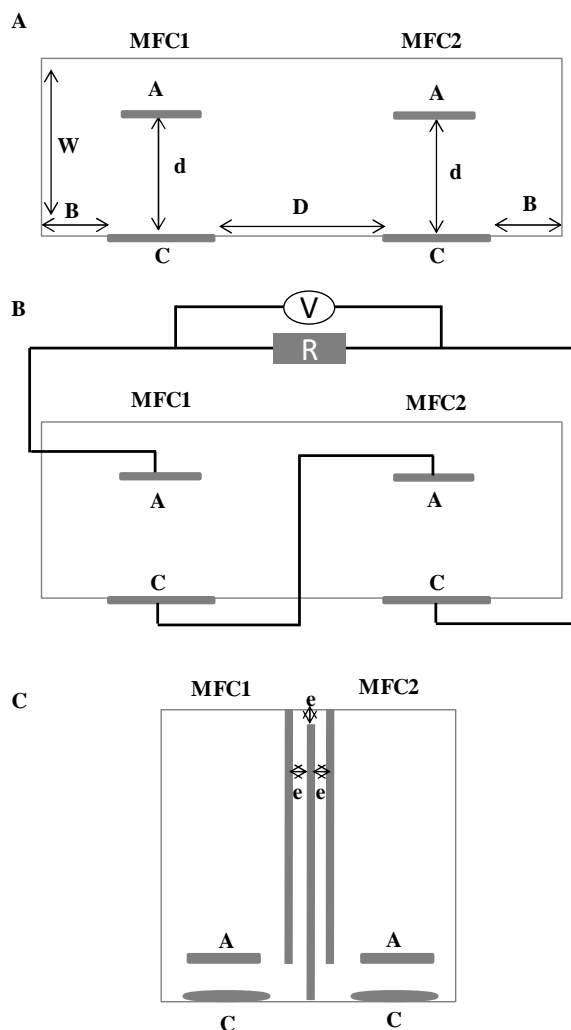


Fig. 1. Scheme of the single-electrolyte MFC stack composed of two MFCs. A : anode. B : distance between the reactor wall and MFCs. C : cathode. d : anode-cathode distance. D : distance between MFCs. e : width between the baffles. W : reactor depth. (A) Experimental device: each MFC has an anode-cathode distance, d , = 5 cm, MFCs are separated by a distance, D , = 8.5 cm. The reactor depth, W , is 7 cm, MFCs are 4 cm away from the reactor wall. (B) Scheme of the series connections of the two MFCs. (C) Optimal device given by the model; MFCs are separated by three baffles that form a path of width e = 5 mm.

MFC1 and MFC2 were then electrically connected in series. In theory, if two individual cells are connected in series, the same current intensity flows through the two modules and the two cell voltages add up. The theoretical power curve of a stack composed of MFC1 and MFC1 connected as individual cells is obtained by multiplying the values of current intensity by the sum of the MFC1 and MFC2 cell voltages. A maximum theoretical power of 1.7 mW is thus expected, with a theoretical stack voltage of 0.47 V at the maximum power point.

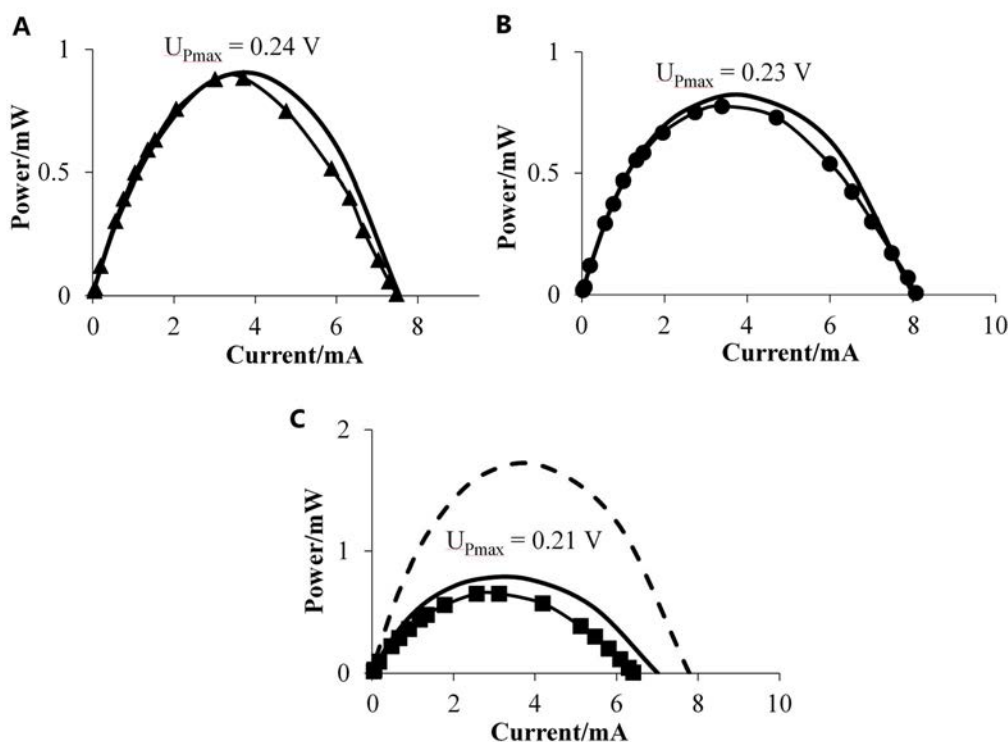


Fig. 2. Experimental (marked line) and modeled (solid line) power curves of (A) single MFC1; (B) single MFC2; (C) MFC1 and MFC2 connected in series in the same electrolyte; The dotted line represents the theoretical curve for two individual MFCs connected in series. According to this curve, MFC1 and MFC2 connected in series as individual cells could theoretically produce a maximum of 1.7 mW under 0.47 V.

In contrast, the experimental power curve in Fig. 2.C displayed drastically lower performance when MFC1 and MFC2 were connected in series in the same electrolyte. The maximum power measured experimentally was only 0.7 mW and the corresponding stack voltage was 0.21 V. This experiment fully confirmed that connecting two MFCs in series in a common electrolyte results in a considerably lower voltage than the sum of the cell voltages of the individual cells. This was consequently a suitable experimental basis to validate the numerical model.

The whole experimental procedure was reproduced with fresh inoculum. Two other bioanodes were prepared but, in this case, the position of the bioanodes in the stack was changed, each was placed perpendicularly to the air cathode. This configuration led to identical general behaviours, with maximum powers of 0.89 and 0.69 mW for MFC1 and MFC2 respectively, and 0.9 mW for the two MFCs connected in series in the same electrolyte.

3.2. Numerical modelling

3.2.1. Numerical model design

The numerical model was based on the calculation of the secondary potential distribution in the electrolyte by solving the Laplace equation. The electrochemical kinetics of the electrodes were used as the boundary conditions. The theoretical basis and the numerical procedure have already been described in detail for the case of a microbial electrolysis cell [39]. They were similar here for an MFC.

The anodic and cathodic current-potential curves (*i*-*E*) were recorded at the same time as the power curves thanks to a reference electrode set in the MFC (Fig. 3). The experimental (*i*-*E*) curves were corrected of the ohmic drop by removing the product $R \cdot i$ from each *E* value, where *R* is the ohmic

resistance between the anode and the reference electrode, or the cathode and the reference electrode. These ionic resistances measured by electrochemical impedance spectroscopy were 4 and 9 Ω, respectively. The higher value of ohmic drop for the cathode was logical because the reference electrode was closer to the anode. They were corrected for the ohmic drop.

For the bioanodes, the corrected (i-E) curves were fitted numerically using the Butler-Volmer-Monod equation [40], which expresses the current (i) as a function of the overpotential η as:

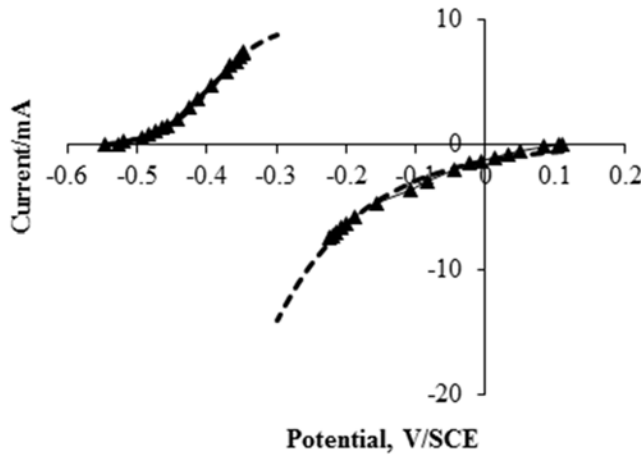
$$i = i_{max} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n.F}{R.T}.\eta\right)}{K_1.\exp\left(-\frac{(1-\alpha).n.F}{R.T}.\eta\right) + K_2.\exp\left(\frac{n.F}{R.T}.\eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right) \quad (3)$$

where i_{max} (mA) is the maximum current, $n = 8$ is the number of electrons produced per mole of acetate (Equation 1), $F = 96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$ is the Faraday constant, $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ is the universal gas constant, $T = 313 \text{ K}$ is the temperature, α is the charge transfer coefficient, $S = 0.02 \text{ mol.L}^{-1}$ is the substrate concentration, $K_M (\text{mol.L}^{-1})$ is the substrate affinity constant and K_1 and K_2 are dimensionless parameters.

For the abiotic cathodes, the (i-E) experimental curves were fitted with a Butler-Volmer equation, which expressed the current as a function of the overpotential η (the anodic branch was neglected):

$$i = -i_0 \exp\left[\frac{-\alpha n F}{RT} \eta\right] \quad (4)$$

where i_0 (mA) is the exchange current and $n = 4$ is the number of electrons consumed per mole of oxygen (Equation 2).



Parameters		
	i_{max}/mA	12
	α_{anode}	0.3
Anode	K_1	70
	K_2	0
	$K_M/\text{mol.L}^{-1}$	0.005
Cathode	i_0/mA	0.55
	$\alpha_{cathode}$	0.8

Fig. 3. Experimental (marked line) anode and cathode kinetics of MFC1 after correction from the ohmic drop and their numerical fittings (dashed line). The table gives the values of the five parameters of the Butler-Volmer-Monod equation (bioanode) and the two parameters of the Butler-Volmer equation (cathode) that are adjusted numerically to fit the bioanode kinetics. In both cases the overpotential was measured from the open circuit potential of the electrode.

After correction of the ohmic drop, the experimental (i-E) curves of the bioanode and the cathode were fitted numerically by a conventional least squares procedure. For the bioanodes, the experimental value of the i_{max} parameter was used and the four parameters α , K_M , K_1 and K_2 were numerically adjusted. For the abiotic cathodes, i_0 and α were the adjustable parameters. In each case it was checked that the numerical curve matched the experimental i-E curve perfectly (Fig. 3).

It is important to mention that parameters were adjusted numerically only to transform the experimental i-E points into equations that could be used by the model. In this context, the objective was not to give a physical meaning to the parameter values in order to model the electrode kinetics, but only to have an accurate mathematical representation of the experimental kinetics. From a purely mathematical standpoint, the experimental kinetics can be fitted by any form of equation: polynomial equations for instance. Nevertheless, our experience has shown that polynomial equations are unsafe because they can give unrealistic values, e.g. oscillating values, when they are used outside the restricted range of numerical fitting. A kinetic law is consequently more appropriate to avoid mathematical unrealistic deviation.

3.2.2. Experimental validation of the numerical model

The numerical model was provided with the geometry of the experimental cell, the numerical form of the bioanode and cathode kinetics, and the value of the ionic conductivity of the electrolyte (1.2 S.m^{-1}). All calculations were performed for an acetate concentration of 20 mM. The model gave the potential and current distributions in the MFC electrolyte. The current was then calculated by integrating the current distribution over the electrode surface. The power curve was plotted by calculating the current for cell voltages ranging from the open circuit voltage to zero. Parameters were adjusted numerically only to transform the experimental kinetics into equations that could be used by the model. Then, no parameter was numerically adjusted during the modelling phase.

The power curves provided by the numerical model for MFC1 and MFC2 (solid lines on Fig. 2.A and B) matched the experimental data well. The calculated maximum powers were 0.88 and 0.82 mW, respectively, for MFC1 alone and MFC2 alone. The corresponding cell voltages were 0.2 V for both MFC1 and MFC2. The consistency of the numerical curves with the experimental data confirmed the validity of the numerical approach.

For MFC1 and MFC2 connected in series in the same electrolyte (solid line on Fig. 2.C), the model displayed a maximum power of 0.79 mW at 0.25 V cell voltage. These values are slightly higher than the experimental measurements. Nevertheless, the slight difference is acceptable, considering that several hours elapsed between the initial recording of the electrode kinetics and the recording of the final power curve of the stack. The bioanode and/or the cathode performance may have decreased during that time, which can explain why the stack performance was slightly lower than predicted using the initial electrode kinetics. In any case, the model confirmed that the stack was extremely far from providing the theoretical performance that would be expected for two individual cells connected in series.

The experimental data resulting from the second experimental run with the bioanodes positioned at right angles to the cathodes confirmed the validity of the model.

3.2.3. Stack of independent MFCs vs. common electrolyte

Fig. 4 compares the distribution of electrostatic potential (ϕ) and the current lines in the electrolyte of MFC1 and MFC2 when they are electrically connected in series:

- as two individual cells (Fig. 4.A),
- as two cells in a common electrolyte (Fig. 4.B).

In each case, the cathode of MFC1 is electrically connected with the anode of MFC2 and the stack voltage is 0.4 V.

In the configuration of two individual cells (Fig. 4.A), potential and current distributions are similar in both cells. These distributions have the conventional pattern produced by two electrodes face-to-face. The potential distribution is mainly parallel to the electrode surfaces except close to the electrode limits, where edge effects are observed. The current lines, which are perpendicular to the potential lines, show the same symmetrical shape. In each individual cell, the current is carried in the electrolyte bulk by the motion towards the anode of the anions that are produced at the cathode and the motion towards the cathode of the cations that are produced at the anode.

In contrast, in the common electrolyte configuration (Fig. 4.B), potential and current distributions are strongly asymmetrical. The current lines show clear interferences between the MFC1 cathode and the MFC2 bioanode, so intensive ion transport occurs between these two electrodes. A significant proportion of the anions that are produced at the MFC1 cathode move towards the MFC2 anode and a significant proportion of the cations that are produced at the MFC2 anode move towards the MFC1 cathode. This ionic short-circuiting between MFC1 cathode and MFC2 anode does not help to increase the stack voltage between the two electrodes because they are electrically connected. This ionic short-circuiting between MFC1 and MFC2 diverts a part of the ion flux that should ensure the transport of electrical current between the anode and cathode of each MFC to a useless motion between the two electrically connected electrodes. The part of the ion fluxes lost in this short-circuiting does not contribute to power production.

The detail of this explanation can be increased by analysing the values of the electrostatic potential of the electrolyte against the electrode surface for each configuration. Fig.4.A and 4.B present a scheme of the electrostatic potential distribution with values of potential of the electrolyte in contact with the electrode surface at the middle of each electrode.

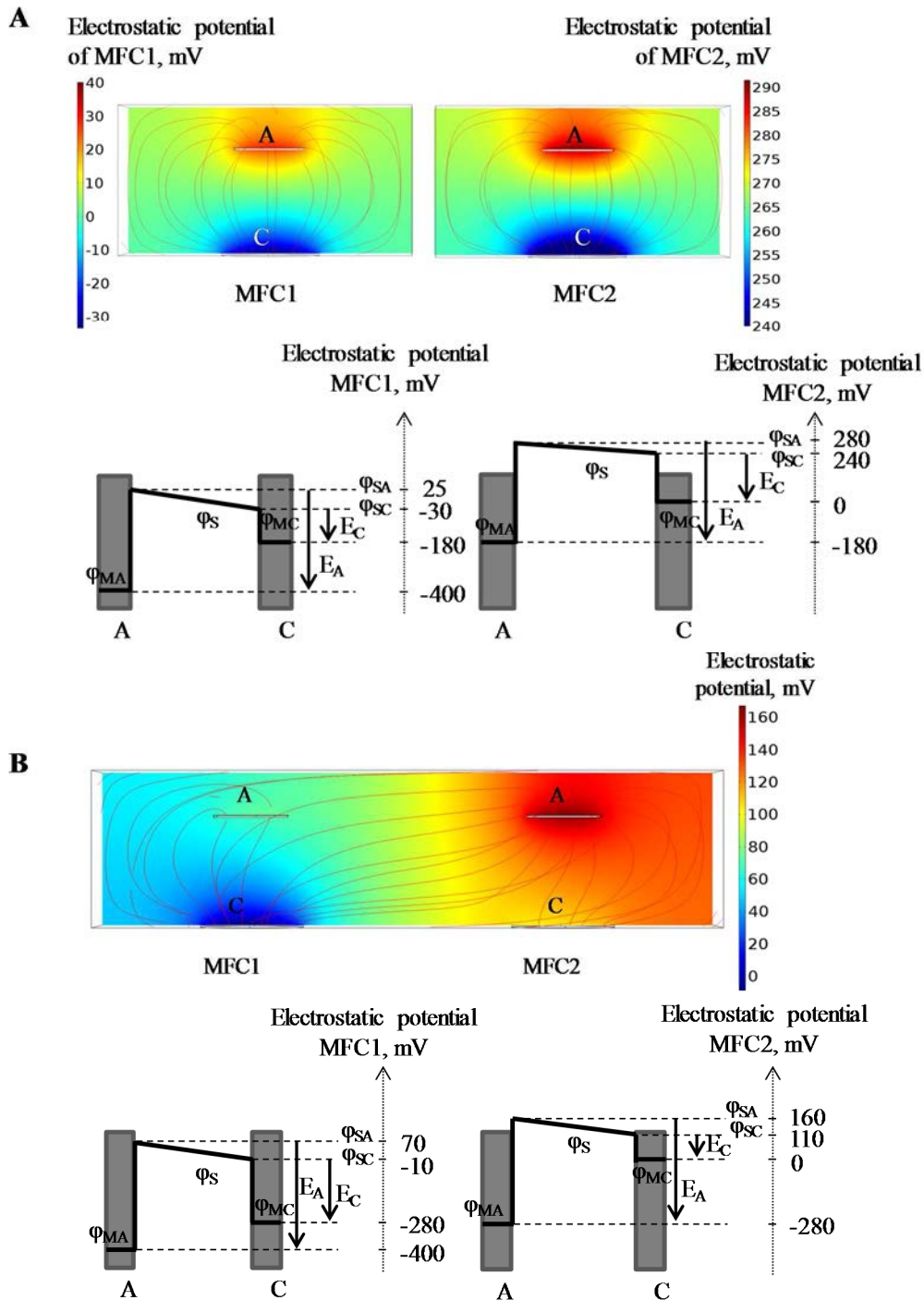


Fig. 4. Potential and current distributions in the electrolyte for a stack voltage of 0.4 V. **A)** Two individual MFCs connected in series; **B)** two MFCs connected in series in a common electrolyte. The color scale gives the potential values and current lines are represented in red. $U_{\text{cell}} = 0.4 \text{ V}$, anode-cathode distance 5 cm, MFC distance 8.5 cm, electrolyte conductivity $1.2 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$.

The cell voltage U_{cell} produced by two MFCs connected in series is defined as:

$$U_{\text{cell}} = \phi_{\text{MC2}} - \phi_{\text{MA1}} \quad (5)$$

where ϕ_{MC2} and ϕ_{MA1} are the electrostatic potentials in the electrode material of the MFC2 cathode and the MFC1 anode, respectively. In the present work, the value of the electrostatic potential of the

MFC2 cathode material (ϕ_{MC2}) is arbitrarily chosen as the origin of electrostatic potential and consequently taken to be equal to zero.

The potential/current maps are plotted for the value $U_{cell} = 0.4$ V, so:

$$U_{cell} = -\phi_{MA1} = 0.4 \text{ V} \quad (6)$$

The values ϕ_{MA2} and ϕ_{MC1} , which correspond to the MFC2 anode and MFC1 cathode materials, are extracted from the model and are always equal because the two electrodes are connected electrically.

The Nernst potential of an electrode is defined as the difference between the electrostatic potential of the electrode material (ϕ_M) and the electrostatic potential of the solution in contact with the electrode surface (ϕ_s):

$$E = \phi_M - \phi_s \quad (7)$$

The Nernst potential of each electrode is calculated by extracting the values ϕ_{SA1} , ϕ_{SC1} , ϕ_{SA2} , ϕ_{SC2} from the model.

When the two MFCs are connected as individual cells:

- MFC1 Nernst potentials are -0.425 and -0.150 V/SCE at the anode and cathode, respectively,
- for MFC2 Nernst potentials are -0.460 and -0.240 V/SCE at the anode and cathode, respectively.

In this case, obviously, ions cannot move from one cell to the other. Anions produced at a cathode can only migrate to the anode of the same cell, and similarly for cations. All the ions in motion contribute to the transport of electricity from the anode to the cathode inside each MFC.

When the two MFCs are in a single electrolyte, the MFC1 cathode is pushed towards negative Nernst potential (-0.270 V/SCE instead of -0.150 V/SCE with individual cells) while the MFC2 anode is pushed towards higher Nernst potential (-0.440 V/SCE instead of -0.460 V/SCE with individual cells). The MFC1 cathode works at the lowest Nernst potential of the stack and the MFC2 anode works at the highest Nernst potential of the stack, i.e. in the worst conditions for both.

On the other hand, because they are electrically connected, the MFC1 cathode and the MFC2 anode drive intense ion fluxes, which do not help to increase the stack voltage. For example, the anions that are produced at the MFC1 cathode and flow towards the MFC2 anode do not carry current to the MFC1 anode. The MFC1 anode is consequently limited by the low ion transport and is pushed towards low Nernst potential (-0.470 V/SCE instead of -0.425 V/SCE with individual cells). The same situation results in the MFC2 cathode being pushed towards higher Nernst potential (-0.110 V/SCE instead of -0.240 V/SCE with individual cells). The internal current between the MFC1 cathode and the MFC2 anode is consequently high, 7.75 mA, while the electrical current delivered by the stack is only 1.64 mA.

The internal ionic short-circuiting leads the two electrically connected electrodes to overwork, while the anode and cathode connected to the external electrical circuit are underexploited because part of the ion transport is diverted by the ionic short-circuiting.

As a first element of an answer to the title, it can be said that the single-electrolyte configuration leads to ionic short-circuiting between the connected cells, which can result in a drastic loss of power production. Nevertheless, the single-electrolyte configuration boosts the connected anode and cathode to optimal Nernst-potential values; the anode is driven to the highest potential and the

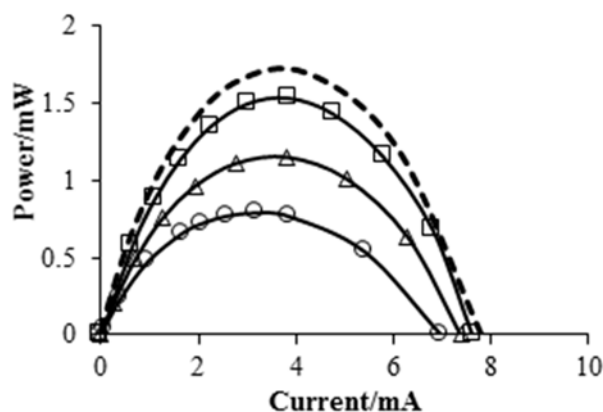
cathode to the lowest. This situation results in maximum electric current between the electrically connected electrodes, meaning that they work at high electrochemical reaction rates and consequently consume a large amount of substrate. The single electrolyte configuration can consequently be of interest when the objective is not to produce power but to oxidize substrate, as is the case for effluent treatment, for instance. When the objective is to oxidize the largest possible amount of organic matter, a single-electrolyte stack with MFCs connected in series using a design that ensures strong internal ionic short-circuiting may be an interesting solution. Actually, this design consists in implementing a so-called electrochemical snorkel inside the stack. An electrochemical microbial snorkel consists in short-circuiting an anode with a cathode, so that the current and the rate of consumption of the organic matter are at maximum [41]. This is an extremely simplified system, with low-cost and low maintenance, which should have a promising future in wastewater treatment [42] and environmental depollution [43,44]. Here, a new architecture of electrochemical microbial snorkel is proposed with several short-circuited anode-cathode units. Such a stack provides an easy way of scaling up a snorkel in and, in addition, the last cathode at one end and the last anode at the other give current, which depends directly on the behaviour of the internal electrodes. The internal short-circuited units consume organic matter at the highest possible rate, while the last anode and cathode connected to the external circuit could be used to monitor the process.

3.2.4. Numerical optimization of the single-electrolyte stack configuration

The model was used to assess the extent to which the geometry of the single-electrolyte stack could be improved to obtain performance closer to the theoretical maximum attainable with two MFCs connected as individual cells. The impact of the ionic conductivity of the electrolyte on the optimal stack design was also investigated.

3.2.4.1. Influence of the distance between two MFCs (D)

Increasing the distance between the MFC units set inside the same reactor is a way to mitigate the ionic short-circuit in order to enhance the performance of the single-electrolyte stack [22]. The same strategy has been successfully implemented when connecting individual MFC cells through a hydraulic network [28]. Power curves are plotted for increasing values of the distance D between MFC1 and MFC2 in Fig. 5. A distance of 50 cm ensures a significant improvement of the single-electrolyte stack, which thus provides a maximum power of 1.15 mW. Nevertheless, a distance of 3 m is required for the single-electrolyte stack to provide 1.54 mW, i.e. around 90 % of the theoretical maximum power (1.7 mW). Moving the two MFCs away from each other clearly mitigates the internal ion short-circuiting. However, in the present case, separating MFC1 and MFC2 by a distance of 3 m would be hardly acceptable from a practical point of view for common laboratory, domestic or industrial applications. This section also illustrates the interest of numerical modelling, which allows a large range of values to be explored and thus takes only a few minutes to give results that would have required a long and cumbersome experimental approach.



D/cm	Power losses %
8.5	55
50	32
300	9

Fig. 5. Power curves for various distances, D , between two MFCs connected in series in a common electrolyte (marked line, circle: $D = 8.5$ cm, triangle: $D = 50$ cm, rectangle: $D = 300$ cm); anode-cathode distance 5 cm, electrolyte conductivity 1.2 S.m^{-1} . The upper curve (dashed line) corresponds to the theoretical power that should be provided if MFC1 and MFC2 were connected in series as individual cells. The table gives the power loss at the maximum of the power curve vs. the theoretical maximum (1.7 mW under 0.47 V).

3.2.4.2. Influence of the anode-cathode distance (d)

Another way to force each MFC to operate more like an individual cell is to reduce the anode-cathode distance. Many recent studies have investigated the so-called Membrane-Electrode Assembly (MEA) configuration, in which a membrane is sandwiched between the anode and the cathode [45,46]. This configuration allows the anode-cathode distance be reduced to a minimum, i.e. to the membrane thickness.

The model was run with an anode-cathode distance $d = 1$ mm, which is representative of an MEA, for comparison with the experimental anode-cathode distance used in this work, $d = 5$ cm. In this section, the power supply is illustrated in the form of voltage-current ($U_{\text{cell}}-i$) curves (Fig. 6). At any point of the ($U_{\text{cell}}-i$) curve, U_{cell} is higher with the single-electrolyte MEA stack. The model predicts a maximum power of the single-electrolyte stack of 1.33 mW with the MEA (it was 0.79 mW with $d = 5$ cm) and the maximum stack voltage increases to around 0.35 V (vs. 0.25 V with $d = 5$ cm). It can be concluded that reducing the anode-cathode distance clearly improves the power and the voltage produced by a single-electrolyte stack.

The theoretical curve that should be obtained with the two MEAs connected as individual cells is also plotted in Fig. 6. It shows that using two MEAs, while keeping the distance between them at 8.5 cm, is not sufficient to push the performance close to the theoretical maximum that could be obtained with individual cells. Reducing the anode-cathode distance has a significant positive impact but is not sufficient to cause the stack to deliver all the power possible.

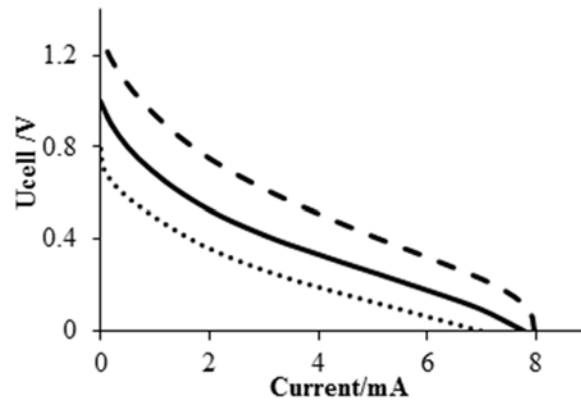


Fig. 6. Cell voltage-current curves of MFC1 and MFC2 connected in series in a common electrolyte (conductivity 1.2 S.m^{-1}) with two different anode-cathode distances, d , of 5 cm (dotted line) or 1 mm (MEA, solid line). The two MFCs are separated by a distance of 8.5 cm. The theoretical curve (dashed line) corresponds to the two MEAs connected as individual cells.

3.2.4.3. Influence of the electrolyte ionic conductivity

The evolution of the maximum power delivered by the single-electrolyte stack was plotted for three different electrolyte conductivities:

- 0.5 S.m^{-1} , a value representative of many culture media reported in the literature for MFCs [47,48],
- 1.2 S.m^{-1} , the conductivity of the synthetic medium used in this study,
- 5.3 S.m^{-1} , the conductivity of seawater at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, which is relevant for benthic MFCs.

The results are presented in Fig. 7 versus the distance, D , between MFC1 and MFC2.

For a conventional anode-cathode configuration (anode and cathode 5 cm apart, Fig. 7.A), the effect of the ionic conductivity on the single-electrolyte stack is not significant. In any case, MFC1 and MFC2 must be separated by a considerable distance to mitigate ionic short-circuiting. With MFC1 and MFC2 2 m away from each other, increasing the ionic conductivity by one order of magnitude (from 0.5 to 5.3 S.m^{-1}) increases the maximum power only from 1.23 to 1.43 mW (16 % increase).

In theory, with individual cells, the same increase in ionic conductivity should increase the power from 1.35 to 2.04 mW (51 %). Actually, increasing the ionic conductivity has a beneficial effect as it decreases the internal resistance of each MFC but, in return, it also increases the efficiency of ionic short-circuiting in the single-electrolyte stack. The two phenomena counterbalance each other.

For an MEA (anode and cathode separated by a distance $d = 1 \text{ mm}$, Fig. 7.B), the power that would be theoretically supplied by MFC1 and MFC2 connected in series as individual cells does not depend significantly on the conductivity. The theoretical power does not decrease when the conductivity decreases. In an MEA, the ohmic drop is reduced to its minimum because of the small anode-cathode distance, and the influence of ionic conductivity is consequently reduced. MEA confirms that it is an appropriate solution to operate in low conductivity media.

The single-electrolyte stack shows similar behaviour for the two modest conductivities 0.5 and 1.2 S.m^{-1} . With MFC1 and MFC2 50 cm apart, around 80 % of the theoretical maximum power is achieved, and this percentage reaches 88 % when the cells are 1 m apart. The performance falls at the conductivity of seawater (5.3 S.m^{-1}). A distance of 6 m between the two cells is required in seawater to obtain 86 % (1.84 mW) of the theoretical maximum power (2.14 mW). In MEA configuration, because of the very small anode-cathode distance, the high conductivity of seawater does not have

any great beneficial effect on the internal resistance but, in contrast, the high conductivity has a significant detrimental effect by favouring ionic short-circuiting between MFC1 and MFC2.

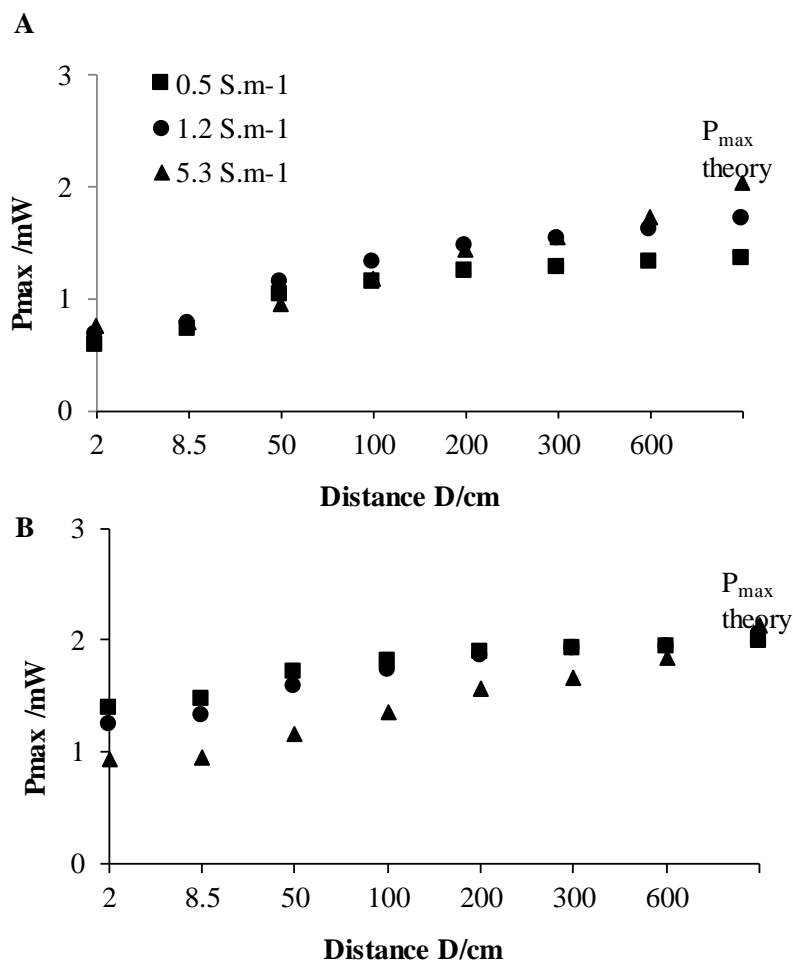


Fig. 7. Maximum delivered power versus the distance between MFC1 and MFC2 in a single-electrolyte stack with an anode-cathode distance d of (A) 5 cm and (B) 1 mm. On each graph, calculations were carried out at three electrolyte conductivities: 0.5 (rectangle), 1.2 (circle) and 5.3 (triangle) $S.m^{-1}$. The maximum power that could be reached with MFC1 and MFC2 connected as individual cells (or infinite distance in a single-electrolyte stack) is also indicated on each graph.

In conclusion, in a low-conductivity electrolyte, using MEAs connected in series allows the distance between MFC1 and MFC2 to be decreased to 1 m in order to obtain 88 % of the theoretical power. For comparison, 3 m distance is required to reach 90 % of the theoretical power with a conventional anode-cathode distance of 5 cm. Using MEAs is confirmed to have a clear positive effect by allowing the distance between the two cells to be reduced. Nevertheless, a distance of the order of 50 cm to 1 m remains poorly realistic when the aim is to design a practical stack in laboratory conditions or for portable devices.

In contrast, the model indicates that implementing MFCs connected in series in the sea would be possible, even with a conventional anode-cathode configuration. The distance between MFC1 and MFC2 should be around 6 m, which may be feasible in the sea. Obviously, possible technical constraints, such as power loss due to the Joule effect in the long electrical circuit, remain to be checked.

This preliminary work opens up the interesting possibility that a stack of benthic MFCs connected in series may be a worthwhile solution to increase the power produced, provided that the MFCs are far

enough from each other. However, it should be mentioned that the present study was not carried out in the context of benthic MFCs. In particular, the electrochemical kinetics used to validate the numerical model did not correspond to benthic conditions. A dedicated study, which should associate benthic experiments with numerical modelling, will be needed to investigate in depth the research direction, which is suggested here.

3.2.4.4. Geometry optimization

One way to reduce the ionic short-circuiting while keeping a reasonably compact prototype is to place baffles between the two cells. This configuration was modelled with a single baffle or three baffles, which determined a path 5 mm wide (e) and were 5 mm from the reactor wall (Fig. 1.B). MFC1 and MFC2 were assumed to have an anode-cathode distance of 1 mm (MEA) and were 8.5 cm apart in the farthest cases. In this configuration, the theoretical maximum power was 2.08 mW at 0.45 V.

Figure 8 shows that a single baffle increases the power delivered slightly but the difference is not significant. Three baffles considerably increase the stack performance, with a maximum power of up to 1.92 mW and a stack voltage of 0.4 V. The power curve is close to the theoretical curve that should be obtained if MFC1 and MFC2 were connected as individual cells, showing the maximum theoretical power of 2.08 mW at 0.45 V. A configuration with five baffles does not improve the maximum delivered power significantly (1.97 mW), so the optimum number of baffles can be fixed at three.

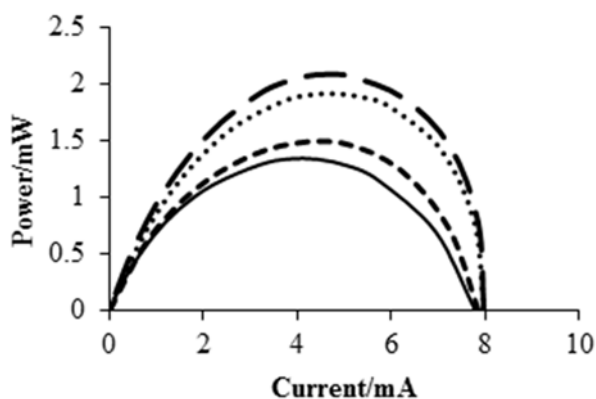


Fig. 8. Power curves without (solid line) and with baffles (big dotted line: single baffle, small dotted line: three baffles) placed between two MFCs connected in series in a common electrolyte; MFCs distance 8.5 cm, anode-cathode distance 1 mm, electrolyte conductivity $1.2 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$. The upper curve (dashed line) corresponds to the theoretical power that should be provided if MFC1 and MFC2 were connected in series as individual cells.

The presence of three baffles allows a more compact reactor. Decreasing the distance, D , between MFC1 and MFC2 from 8.5 to 2 cm no longer influences the stack performance. In contrast, the reactor depth does influence the performance. Stack depths of 7, 12 and 20 cm lead to maximum powers of 1.92, 1.98 and 2 mW. This dependence on reactor depth is explained by the elongation of the path imposed on ion motion by the baffles. The greater the depth, the longer the baffle path. Longer baffles efficiently mitigate the ionic short-circuit.

Finally, it was observed that decreasing the distance B between the reactor wall and MFCs from 4 to 1 cm had no influence on delivered power. In conclusion, an efficient stack configuration can be assumed to be composed of two MFCs in MEA configuration (anode-cathode distance 1 mm), 2 cm apart with three baffles in between, and 1 cm from the reactor wall, in a reactor 12 cm deep. With such a configuration, MFCs could be efficiently connected in series in a single electrolyte.

A major advantage of a single-electrolyte stack is to ensure that all MFCs are exposed to the same solution composition. The stack can thus be managed as a single reactor and, in particular, only one inlet is necessary to feed the cell with fuel. In order to check whether this advantage was kept in the presence of baffles, the diffusion rate of acetate along the baffle path was evaluated by the model. The reactor with the geometrical parameters described just above, was taken to be initially fed with a concentration of 50 mM acetate only in MFC1, while the baffle path and MFC2 did not contain any acetate. Ideally, this situation should evolve towards a final uniform concentration of 24 mM in the whole stack at the end of the diffusion process (the MFC1 volume is 720 mL, while the total volume is 1500 mL). The model indicated that, in the absence of stirring, 300 days would be necessary to obtain acetate concentrations of 1.8 mM in MFC2, while 45.7 mM remained in MFC1 (23.7 mM in the middle of the baffle path). The quantitative value of this result should be qualified because, in reality, the complete absence of any parasite source of stirring (hydrodynamic motion when introducing acetate into the electrolyte, vibrations, temperature gradient, etc.) would be very difficult to achieve. The real diffusion process should consequently be faster than the theoretical rate determined by the model. Nevertheless, the numerical data indicate that diffusion is very slow. In conclusion, the diffusion of the substrate from MFC1 to MFC2 was drastically slowed down by the baffles, and the advantages related to uniform composition inside the stack would be lost.

The presence of a baffled path between the MFCs ensures that all MFCs have the same solution height. In individual MFCs, water evaporation rates may be different from one unit to the other, resulting in MFCs working with different solution levels. Here, this drawback is avoided in the single-electrolyte stack, even when it is equipped with baffles. However, the presence of baffles no longer allows a uniform composition of the electrolyte to be ensured, which makes it necessary to provide an individual substrate inlet for each MFC.

The problem can be solved by using individual MFC cells that are hydraulically connected and forcing the solution to flow along the baffle path, from one MFC to the other. Some large-scale systems have been reported with individual cells connected through a hydraulic network [11] in some cases air gaps were used to isolate different modules that were connected electrically in series [49]. In this case, the pumps needed to achieve the solution flow would consume a lot of power, particularly to move the solution along the long baffle path, or to move the air gaps, probably more energy than the MFC stack can provide in most cases. For instance, the first self-sustained stack, achieved recently, required connecting 40 MFC units to be connected to power the pump and the electronic control device [29]. In the current state of the art, this option is not satisfactory if the main objective is to produce power. Nevertheless, it can have some interest for other applications, for example if a second objective is coupled to power production or is more important than power production, such as sanitation [49] and designing MFC-based biosensors [50]. In this context, a single-electrolyte device equipped with baffles would allow the stack voltage to be increased, thus increasing the sensor sensitivity in terms of biosensing. Increasing the sensitivity of a microbial electrochemical sensor with a single-electrolyte stack could be of great interest, and the pumping energy required would no longer be a decisive criterion.

4. Conclusion

Firstly, numerical modelling shows that strong internal ionic short-circuiting between the anode and the cathode that are electrically connected together is responsible for the drastic loss of power production and cell voltage when MFCs are connected in series in a single electrolyte. However, the

electrically connected anode and cathode are pushed to operate at maximum electrochemical rates, which can be of interest when the objective is organic matter abatement for instance.

The model shows that the ionic short-circuiting can be mitigated by distancing MFC1 from MFC2, which allows the theoretical power production to be approached. The model is used to approach an optimal stack configuration by including internal baffles in order to keep the system reasonably compact. This solution diminishes the practical advantages related to uniform concentration inside the stack, but it can be of some interest for specific applications, such as biosensing.

In summary, it can be claimed that connecting MFCs in series in a single electrolyte is possible but requires specific implementation conditions that make the system interesting for specific applications only. In contrast, the model suggests that connecting benthic MFCs in series may be effective. In this context, a dedicated experimental and modelling study is necessary to confirm this interesting possibility.

Acknowledgements

This work benefited from the 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). The MFC prototypes were built by the LGC workshop under the guidance of Alain Müller and Vincent Loisel. The authors thank one of the reviewers in particular for careful reading and providing numerous references about actual applications of MFCs.

References

- [1] M. Olliot, L. Etcheverry, A. Mosdale, R. Basseguy, M.-L. Délia, and A. Bergel, Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance, *J. Power Sources* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.016>
- [2] S. Shleev, A. Bergel, and L. Gorton, Biological fuel cells: Divergence of opinion, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 1–2.
- [3] A. Shantaram, H. Beyenal, R. R. A. Veluchamy, and Z. Lewandowski, Wireless Sensors Powered by Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5037–5042.
- [4] A. Dewan, C. Donovan, D. Heo, and H. Beyenal, Evaluating the performance of microbial fuel cells powering electronic devices, *J. Power Sources* 195 (2010) 90–96.
- [5] J. Winfield, L. D. Chambers, A. Stinchcombe, J. Rossiter, and I. Ieropoulos, The power of glove: Soft microbial fuel cell for low-power electronics, *J. Power Sources* 249 (2014) 327–332.
- [6] F. Khaled, O. Ondel, and B. Allard, Microbial fuel cells as power supply of a low-power temperature sensor, *J. Power Sources* 306 (2016) 354–360.
- [7] L. M. Tender et al., The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy, *J. Power Sources* 179 (2008) 571–575.
- [8] C. Donovan, A. Dewan, D. Heo, and H. Beyenal, Batteryless, Wireless Sensor Powered by a Sediment Microbial Fuel Cell, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8591–8596.
- [9] Y. R. J. Thomas, M. Picot, A. Carer, O. Berder, O. Sentieys, and F. Barriere, A single sediment-microbial fuel cell powering a wireless telecommunication system, *J. Power Sources* 241 (2013) 703–708.

- [10] C. Melhuish, I. Ieropoulos, J. Greenman, and I. Horsfield, Energetically autonomous robots: Food for thought, *Auton. Robots* 21 (2006) 187–198.
- [11] I. A. Ieropoulos, P. Ledezma, A. Stinchcombe, G. Papaharalabos, C. Melhuish, and J. Greenman, Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 15312–15316.
- [12] X. A. Walter, A. Stinchcombe, J. Greenman, and I. Ieropoulos, Urine transduction to usable energy: A modular MFC approach for smartphone and remote system charging, *Appl. Energy* 192 (2017) 575–581.
- [13] A. Schievano et al., Floating microbial fuel cells as energy harvesters for signal transmission from natural water bodies, *J. Power Sources* 340 (2017) 80–88.
- [14] B. E. Logan, M. J. Wallack, K.-Y. Kim, W. He, Y. Feng, and P. E. Saikaly, Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (2015) 206–214.
- [15] H. Wang, J.-D. Park, and Z. J. Ren, Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 3267–3277.
- [16] X. Zhang, H. Ren, S. Pyo, J.-I. Lee, J. Kim, and J. Chae, A High-Efficiency DC-DC Boost Converter for a Miniaturized Microbial Fuel Cell, *Ieee Trans. Power Electron.* 30 (2015) 2041–2049.
- [17] P. Aelterman, K. Rabaey, H. T. Pham, N. Boon, and W. Verstraete, Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3388–3394.
- [18] J. An, B. Kim, I. S. Chang, and H.-S. Lee, Shift of voltage reversal in stacked microbial fuel cells, *J. Power Sources* 278 (2015) 534–539.
- [19] J. An and H.-S. Lee, Occurrence and Implications of Voltage Reversal in Stacked Microbial Fuel Cells, *Chemosuschem* 7 (2014) 1689–1695.
- [20] P. Salvin, O. Ondel, C. Roos, and F. Robert, Energy harvest with mangrove benthic microbial fuel cells, *Int. J. Energy Res.* 39 (2015) 543–556.
- [21] F. Khaled, O. Ondel, and B. Allard, Optimal Energy Harvesting From Serially Connected Microbial Fuel Cells, *Ieee Trans. Ind. Electron.* 62 (2015) 3508–3515.
- [22] D. Kim, J. An, B. Kim, J. K. Jang, B. H. Kim, and I. S. Chang, Scaling-Up Microbial Fuel Cells: Configuration and Potential Drop Phenomenon at Series Connection of Unit Cells in Shared Anolyte, *Chemosuschem* 5 (2012) 1086–1091.
- [23] B. Kim et al., Voltage increase of microbial fuel cells with multiple membrane electrode assemblies by in series connection, *Electrochem. Commun.* 28 (2013) 131–134.
- [24] B. Wang and J.-I. Han, A single chamber stackable microbial fuel cell with air cathode, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 387–393.
- [25] R. O'Hayre, T. Fabian, S. J. Lee, and F. B. Prinz, Lateral ionic conduction in planar array fuel cells, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) A430–A438.
- [26] L. Zhuang and S. Zhou, Substrate cross-conduction effect on the performance of serially connected microbial fuel cell stack, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 937–940.
- [27] J. Winfield, I. Ieropoulos, and J. Greenman, Investigating a cascade of seven hydraulically connected microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 110 (2012) 245–250.
- [28] J. Winfield, I. Ieropoulos, J. Greenman, and J. Dennis, Investigating the effects of fluidic connection between microbial fuel cells, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34 (2011) 477–484.

- [29] P. Ledezma, A. Stinchcombe, J. Greenman, and I. Ieropoulos, The first self-sustainable microbial fuel cell stack, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 2278–2281.
- [30] B. Cercado et al., Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 276–284.
- [31] S. Parot, M.-L. Delia, and A. Bergel, Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4809–4816.
- [32] B. Cercado-Quezada, M.-L. Delia, and A. Bergel, Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost, *J. Appl. Electrochem.* 40 (2010) 225–232.
- [33] B. Cercado-Quezada, M.-L. Délia, and A. Bergel, Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 440–443.
- [34] M. Oliot, L. Etcheverry, and A. Bergel, Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 691–696.
- [35] D. Pocaznoi, B. Erable, L. Etcheverry, M.-L. Delia, and A. Bergel, Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 13332–13343.
- [36] I. A. Ieropoulos, J. Greenman, and C. Melhuish, Miniature microbial fuel cells and stacks for urine utilisation, *Int. J. Hydrog. Energy* 38 (2013) 492–496.
- [37] I. Ieropoulos, J. Greenman, and C. Melhuish, Microbial fuel cells based on carbon veil electrodes: Stack configuration and scalability, *Int. J. Energy Res.* 32 (2008) 1228–1240.
- [38] C. Santoro, S. Babanova, P. Atanassov, B. Li, I. Ieropoulos, and P. Cristiani, High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode, *J. Electrochem. Soc.* 160 (2013) H720–H726.
- [39] R. Lacroix, S. Da Silva, M. V. Gaig, R. Rousseau, M.-L. Delia, and A. Bergel, “Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 22892–22902.
- [40] H. V. M. Hamelers, A. ter Heijne, N. Stein, R. A. Rozendal, and C. J. N. Buisman, Butler-Volmer-Monod model for describing bio-anode polarization curves, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 381–387.
- [41] B. Erable, L. Etcheverry, and A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling* 27 (2011) 319–326.
- [42] Q. Yang, H. Zhao, and H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 512–514.
- [43] D. R. Lovley, Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 4896–4906.
- [44] C. C. Viggì et al., The ‘Oil-Spill Snorkel’: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 881.
- [45] J. M. Moon, S. Kondaveeti, T. H. Lee, Y. C. Song, and B. Min, Minimum interspatial electrode spacing to optimize air-cathode microbial fuel cell operation with a membrane electrode assembly, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 263–267.
- [46] W.-W. Li, G.-P. Sheng, X.-W. Liu, and H.-Q. Yu, Recent advances in the separators for microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 244–252.

[47] D. Aaron, C. Tsouris, C. Y. Hamilton, and A. P. Borole, Assessment of the effects of flow rate and ionic strength on the performance of an air-cathode microbial fuel cell using electrochemical impedance spectroscopy, *Energies* 3 (2010) 592–606.

[48] Y. Feng, X. Wang, B. E. Logan, and H. Lee, Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 873–880.

[49] I. A. Ieropoulos et al., Pee power urinal – microbial fuel cell technology field trials in the context of sanitation, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 336–343.

[50] D. Davila, J. P. Esquivel, N. Sabate, and J. Mas, Silicon-based microfabricated microbial fuel cell toxicity sensor, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2426–2430.

2. Prototype de démonstration « Bioelec »

Le cahier des charges rédigé au début de projet Bioelec visait à concevoir un prototype de démonstration qui fournisse une puissance de 1 W sous une tension de 5 V. Les performances atteintes par les PCMs, bien qu'elles aient progressé tout au long de ces travaux de thèse jusqu'à dépasser le maximum de l'état de l'art antérieur, nous fait prendre conscience que l'élaboration d'un tel prototype serait irréalisable à l'échelle de temps d'une thèse.

Un prototype de démonstration nommé « Bioelec » a tout de même été conçu afin d'évaluer les performances que pourrait délivrer un système de laboratoire abouti. Les valeurs de puissance et de tension nominale ont été raisonnablement revues à la baisse. Le challenge est passé à la conception d'un prototype délivrant la puissance la plus élevée possible mais assurant au minimum une tension de 1 V. Avec l'architecture développée dans le cadre de ces travaux de thèse, un nombre de neuf PCMs a paru suffisant pour atteindre les nouveaux objectifs.

2.1. Conception du prototype

Pour mettre toutes les chances de notre côté, les PCMs du prototype sont élaborées avec la configuration qui a assuré les performances les plus élevées, c'est-à-dire l'« Assemblage Séparateur-Electrodes » en utilisant une grille en plastique comme séparateur. L'assemblage des trois éléments Anode-Séparateur-Cathode à air est décrit en détails dans la partie 3 du Chapitre 5. Un électrolyte commun à toutes les PCMs était inscrit dans le cahier des charges initial, mais les résultats obtenus par l'étude présentée dans la première partie de ce chapitre ont amené à abandonner cette configuration. Le prototype final se compose donc de neuf PCMs indépendantes (Figure 41).



Figure 41. Photographie du prototype de démonstration « Bioelec » composé de neuf PCMs indépendantes connectées électriquement en combinant branchements en série et en parallèle.

Pour chaque PCM, la bioanode est formée par chronoampérométrie à partir d'une bioanode primaire selon la procédure décrite dans la partie 3.3.2 du Chapitre 4. Les deux électrodes primaire et secondaire sont polarisées. La bioanode primaire, en forme de U de hauteur 5 cm et de largeur 5 cm ($S_{\text{projetée}} = 25 \text{ cm}^2$), est au préalable développée dans un montage à trois électrodes (décrit dans le Chapitre 2) dans du lixiviat de terreau puis du milieu synthétique, et est insérée dans le réacteur « ASE » une fois mature.

Assurer le développement simultané des neuf bioanodes du prototype est une étape délicate qui n'a pas abouti à des résultats totalement reproductibles. A l'issue de la chronoampérométrie (CA), trois catégories se sont distinguées selon les courants délivrés:

- Bloc 1 : 3 bioanodes ASE délivrant des courants élevés (21.5 ± 3.4 mA).
- Bloc 2 : 3 bioanodes ASE délivrant des courants moyens (16.4 ± 2.2 mA).
- Bloc 3 : 3 bioanodes ASE délivrant des courants relativement faibles (10.8 ± 2.5 mA).

Au cours de la phase de formation de la bioanode en chronoampérométrie au sein de l'ASE, une feuille de caoutchouc inerte remplace la cathode à air afin d'éviter le biofouling prématuré de l'électrode avant même le fonctionnement en pile. Lorsque les bioanodes de l'ASE délivrent des densités de courant stables, la feuille de caoutchouc est remplacée par une cathode à air (procédure décrite dans la partie 3 du Chapitre 5).

Deux types de cathodes à air sont testés dans cette étude : des cathodes fabriquées à la main suivant un protocole issu du projet antérieur Agrielec qui contiennent 2.5 mg.cm^{-2} de catalyseur platine et 60% de PTFE, et des cathodes issues d'une ligne de fabrication automatisée mise en place dans le cadre du projet actuel Bioelec qui contiennent 0.5 mg.cm^{-2} de platine et 10 % de PTFE. La fabrication manuelle des cathodes engendre des coûts élevés à cause de la teneur en platine plus importante et de la grande charge de travail nécessaire. La fabrication automatisée a permis de réduire la concentration de platine, de diminuer drastiquement le temps de fabrication et de standardiser les propriétés des cathodes produites. Toutefois, les cathodes produites manuellement démontraient lors du projet antérieur Agrielec des performances supérieures aux cathodes issues de la fabrication automatisée et une meilleure tenue mécanique de la couche active. Nous avons donc exceptionnellement demandé au partenaire PaxiTech de nous livrer un lot de six cathodes élaborées manuellement afin de les tester exclusivement sur ce prototype de démonstration. Les PCMs dont les bioanodes de l'ASE délivraient les densités de courants les plus élevées en fin de chronoampérométrie (blocs 1 et 2) sont montées avec ces cathodes artisanales. Les trois bioanodes du bloc 3 sont en revanche mises en œuvre avec des cathodes issues de la fabrication automatisée.

2.2. Procédure expérimentale

Dans un premier temps, l'étude a pour objectif de définir la configuration optimale du prototype permettant de maximiser la puissance en combinant les connexions en série et en parallèle des neufs PCMs. Rappelons que l'association en série permet d'additionner les tensions et l'association en parallèle d'additionner les courants. Chaque configuration est étudiée par la mesure d'une courbe de puissance.

Une fois la configuration optimale déterminée, celle-ci est appliquée de façon définitive au prototype et les performances délivrées sont suivies au cours du temps. Des PCMs sont caractérisées individuellement par mesure de courbes de puissance et des cinétiques des électrodes afin d'observer si la position dans le prototype a une influence sur leur comportement individuel. La caractérisation de chacune des neufs PCMs du prototype nécessitant un temps trop important, il est choisi de ne caractériser qu'une PCM par bloc. De petits appareils électroniques sont alimentés par le prototype afin d'avoir des preuves de l'énergie produite susceptibles de sensibiliser le grand public : une mini éolienne, un petit robot et une calculatrice.

Les conditions expérimentales de l'étude sont résumées dans le Tableau 29. Les dispositifs expérimentaux sont décrits dans le Chapitre 2.

Tableau 29. Conditions expérimentales de l'étude du prototype de démonstration « Bioelec ».

Montage expérimental		
Montage électrochimique en fonctionnement pile avec une résistance 100 Ω		
Prototype de démonstration « Bioelec » : stack de 9 PCMs connectées électriquement en série et/ou en parallèle		
Pour chaque PCM :		
- Réacteur : « ASE » - $S_{\text{Cathode}} = 9.6 \text{ cm}^2$		
- Bioanode : tridimensionnelle, tissu de carbone replié sur une grille en acier, $S_{\text{projetée}} = 9.6 \text{ cm}^2$, formée à partir d'une bioanode primaire ($S_{\text{projetée}} = 25 \text{ cm}^2$), inoculum « lixiviat de terreau »		
- Séparateur : grille en plastique, $\varnothing_{\text{pores}} = 5 \text{ mm}$, 2 couches (4 mm d'épaisseur au total)		
Paramètres expérimentaux		
Electrolyte : Milieu synthétique	Température : 40°C	Substrat : Acétate maintenu 20 mM
Techniques électrochimiques		
Courbes de puissance : R = 33 000 à 0 Ω	Cinétiques des électrodes vs. électrode au calomel saturée (ECS)	

2.3. Résultats expérimentaux

2.3.1. Détermination de la configuration optimale

Trois configurations assemblant les PCMs du prototype en série ou en parallèle sont présentées dans la Figure 42. Les courbes de puissance ne sont pas présentées ici, mais les valeurs de la puissance maximale ainsi que de la tension et du courant associés sont reportées dans le Tableau 30.

Tableau 30. Valeurs mesurées des puissances maximales et des tensions et courants associés selon les configurations du prototype « Bioelec » présentées dans la Figure 42.

	Configuration A	Configuration B	Configuration C
P_{max} (mW)	15.2	16.1	25.6
U à P_{max} (V)	0.39	1.7	1.6
I à P_{max} (mA)	39	9.4	16

La première configuration étudiée est parfaitement symétrique (configuration A, Figure 42). Elle est composée de trois blocs connectés en série. Chaque bloc est lui-même constitué de trois PCMs branchées en parallèle. L'intention ici est double :

- Les trois blocs assemblés en série assurent l'augmentation de la tension du stack en additionnant les tensions de chaque bloc.
- Les PCMs montées en parallèle dans chaque bloc permettent d'augmenter le courant d'un bloc en additionnant les courants de chaque PCM.

Dans cette configuration A, un courant relativement élevé de 39 mA est atteint grâce à l'association des PCMs en parallèle dans chaque bloc. En revanche, la tension délivrée ne dépasse pas 0.39 V. Cette valeur, éloignée de l'objectif initial de 1 V, se rapproche de la tension délivrée par une PCM individuelle qui est de l'ordre de 0.3 V. Le prototype ne délivre donc qu'une puissance maximale de 15.2 mW. Si l'on compare cette valeur à celle obtenue par une PCM individuelle élaborée avec l'architecture

« ASE » (6.2 mW, partie 3 du Chapitre 5), l'augmentation des performances n'est clairement pas considérable pour neuf PCMs associées dans le prototype.

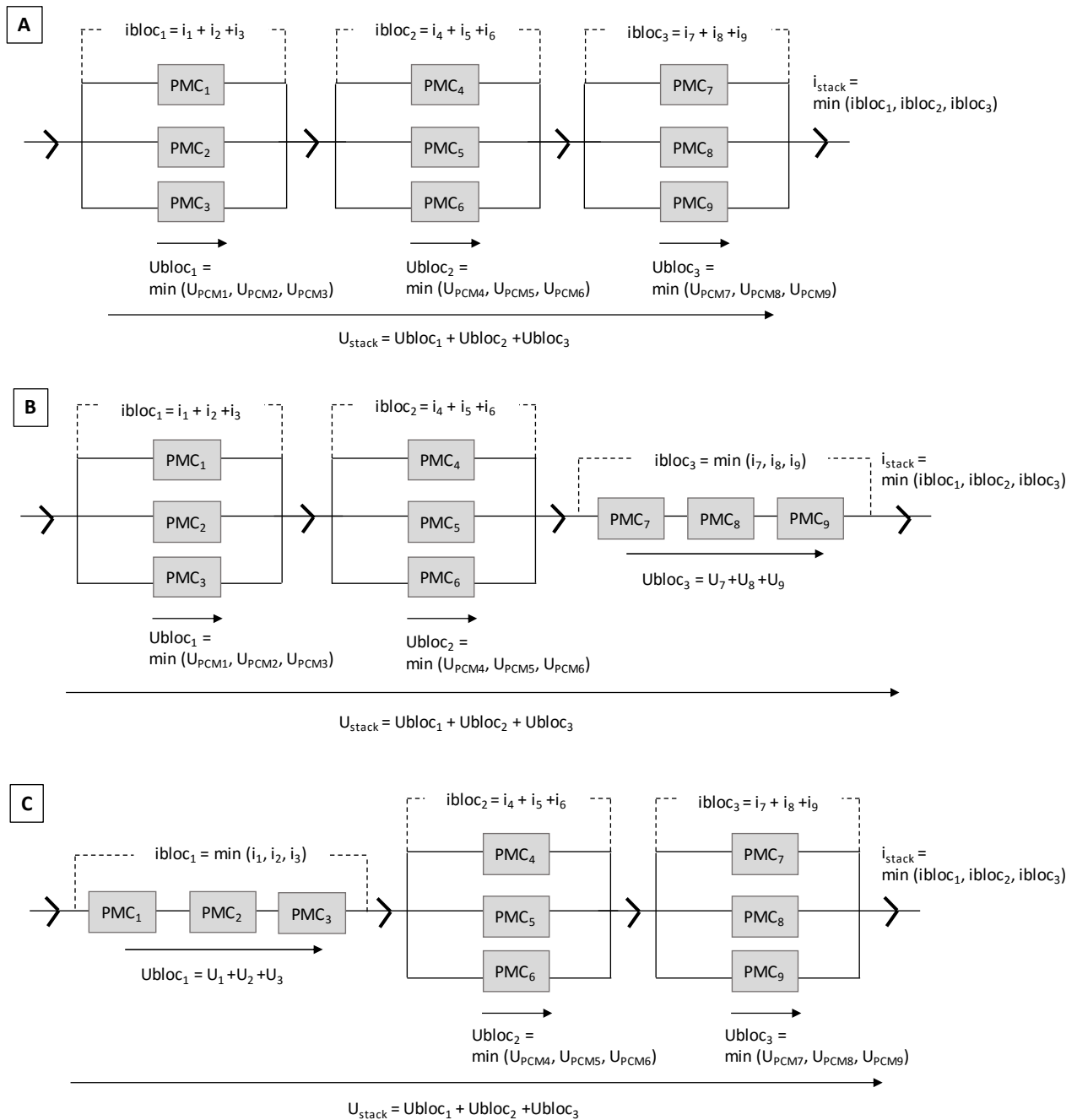


Figure 42. Schémas des trois configurations testées du prototype « Bioelec ». Chaque configuration est structurée en trois blocs de trois PCMs chacun.

Pour tenter d'augmenter la tension du stack, la configuration B dissocie le bloc 3 et connecte les trois PCMs en série plutôt qu'en parallèle (Figure 42.B). La tension du bloc 3 devrait ainsi être la somme des tensions des PCMs 7, 8 et 9. C'est ce qui est confirmé expérimentalement puisque la tension du prototype augmente considérablement passant de 0.39 V à 1.7 V. Elle est alors supérieure à l'objectif de 1 V. En revanche, le courant chute de 39 mA à 9.4 mA. Ceci s'explique logiquement par le fait que

le courant du bloc 3 n'est plus l'addition des courants des PCM 7, 8 et 9 mais est alors limité par le courant de la PCM la moins performante du bloc. La puissance maximale délivrée par le prototype n'augmente alors que très légèrement par rapport à la configuration A, de 15.2 mW à 16.1 mW.

Cette deuxième configuration met en lumière un point primordial concernant la disposition des PCM au sein du prototype. Placer trois PCM de « mauvaise qualité » en série n'est pas un choix judicieux puisque le courant du stack entier est limité par le courant délivré par la PCM la moins performante. L'analyse de la PCM la plus performante montre qu'elle délivre un courant d'environ 15 mA à la puissance maximale. Un courant de cet ordre de grandeur pourrait donc être atteint par le prototype en modifiant la configuration.

En conséquence, la configuration C échange les PCM branchées en série (Figure 42.C). Le bloc 3 reprend sa structure initiale (trois PCM branchées en parallèle) tandis que c'est le bloc 1 qui est éclaté en trois PCM connectées en série. Ce sont ainsi les PCM produisant les courants les plus élevés qui, placées en série, conditionnent le courant délivré par le stack. Les résultats confirment les prévisions. Alors que la tension à la puissance maximale reste presque inchangée par rapport à la configuration précédente (1.6 V), le courant augmente passant de 9.4 mA à 16 mA. La puissance maximale augmente alors considérablement de 16.1 à 25.6 mW.

L'association tension élevée et fort courant de la configuration C permet au prototype d'atteindre la puissance la plus élevée en comparaison des deux autres configurations A et B. C'est donc celle qui a été retenue pour la suite de l'étude.

2.3.2. Suivi des performances du prototype « Bioelec » au cours du temps

Les performances du prototype sont suivies au cours du temps pendant 20 jours (Figure 42). Les courbes de puissance du prototype sont présentées dans la Figure 44. Les valeurs de la puissance maximale et de la tension et du courant associés sont reportées dans le Tableau 31.

Tableau 31. Valeurs expérimentales des puissances maximales et des tensions et courants associés délivrés par le prototype « Bioelec » au cours du temps.

	P_{\max} (mW)	U à P_{\max} (V)	I à P_{\max} (mA)
Jour 0	25.6	1.6	16
Jour 5	22.5	1.5	15
Jour 8	9.5	1.6	5.9
Jour 8 - Echange PCM du bloc 1 par PCM du bloc 3	16.9	1.3	13
Jour 19	13.3	0.95	14

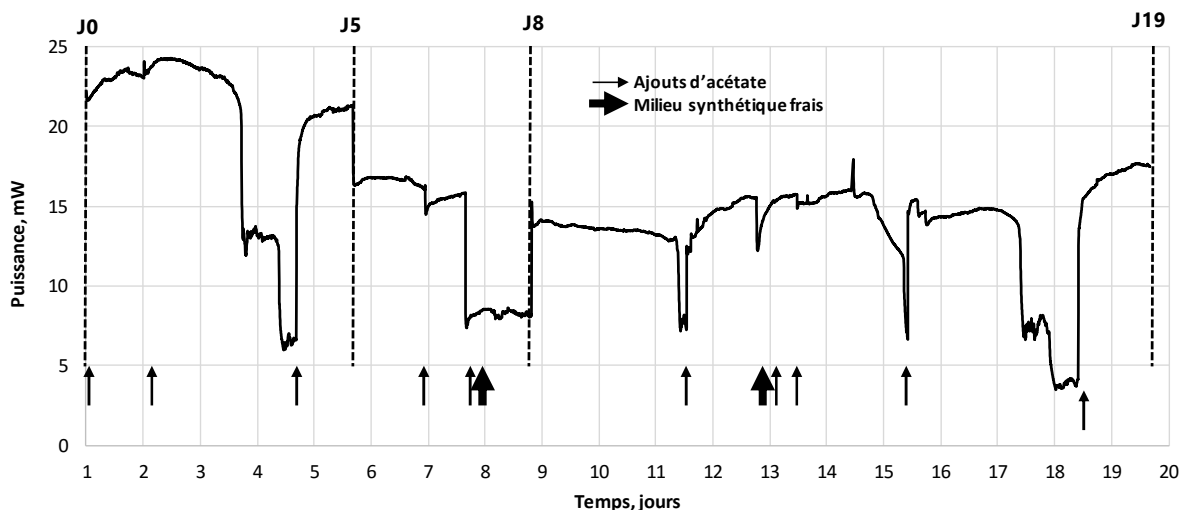


Figure 43. Puissance délivrée par le prototype « Bioelec » au cours du temps. Entre les mesures de courbe de puissance indiquées par les traits pointillés noirs, le prototype délivre une puissance en continu dans une résistance électrique égale à 100Ω . Les flèches vertes correspondent aux ajouts d'acétate dans chaque PCM du prototype et les flèches bleues au remplacement du milieu synthétique usé pour du milieu synthétique frais.

La caractérisation au premier jour a montré que la meilleure PCM du prototype délivrait une puissance maximale de 4.5 mW (soit 4.7 W.m^{-2}). Ces performances sont plus qu'acceptables, puisqu'égale au maximum reporté dans la bibliographie avant ce travail de thèse (W. Yang & Logan, 2016), mais elles se trouvent en-dessous de celles obtenues avec les PCMs élaborées avec la configuration « ASE » qui atteignent 6.2 mW soit 6.4 W.m^{-2} (partie 3 du Chapitre 5). On s'aperçoit alors de la difficulté de développer des PCMs reproductibles malgré un protocole d'élaboration qui reste identique.

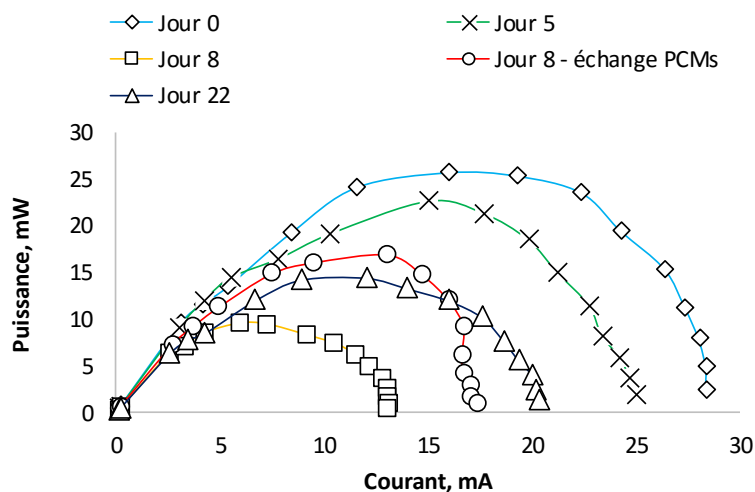


Figure 44. Courbes de puissance du prototype « Bioelec » mesurée expérimentalement au cours du temps.

Entre le jour de lancement du prototype et le cinquième jour de fonctionnement, les performances délivrées restent relativement stables. La puissance maximale varie entre 22.5 et 25.6 mW , la tension se maintient à une valeur de 1.6 V , donc supérieure au 1 V souhaité, et l'intensité atteint 16 mA . C'est à partir du cinquième jour que la perte des performances devient significative. La puissance maximale chute à 9.5 mW , principalement en raison de la diminution considérable du courant qui passe de 15 à 5.9 mA , alors que la tension du prototype ne baisse que légèrement (1.3 V). Au regard de la multiplicité des composants du prototype, il est difficile de déterminer les phénomènes à l'origine de cette chute de performance puisque chaque PCM n'est pas analysée individuellement. On ne peut avoir ici qu'une

vision globale du comportement du prototype à travers la caractérisation de seulement trois PCM sur neuf. Les courbes de puissance au jour 8 des trois PCM caractérisées (une PCM par bloc, Figure 45) donnent toutefois quelques informations.

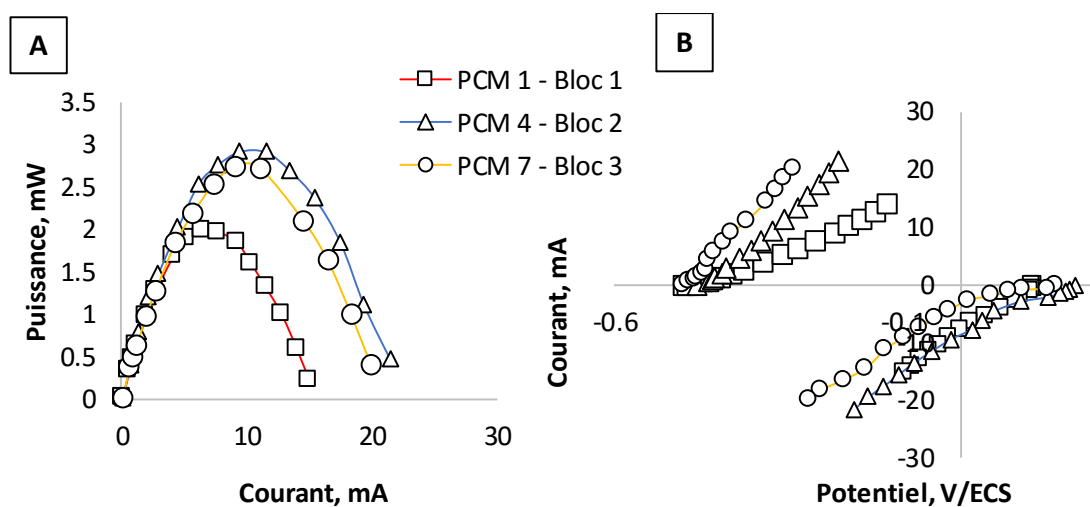


Figure 45. Courbes de puissance (A) et cinétiques des électrodes (B) de trois PCM du prototype « Bioelec ». Rouge : PCM 1 du bloc 1, branchement en série. Jaune : PCM 4 du bloc 2, branchement en parallèle. Bleu : PCM 7 du bloc 3, branchement en parallèle.

Les PCM des blocs 2 et 3 branchées en parallèle au sein de leur bloc respectif, assurent des performances équivalentes avec une puissance maximale de 2,9 et 2,7 mW respectivement. Les cinétiques des électrodes montrent que la bioanode de la PCM du bloc 2 est de moins bonne qualité que celle du bloc 3, mais il est surtout intéressant de constater que la cathode issue de la fabrication manuelle (bloc 2, marqueurs triangulaires) est plus performante que celle issue de la fabrication automatisée (bloc 3, marqueurs ronds). Dans cette étude, et comme cela avait été constaté au cours du projet antérieur Agrielec, cette tendance est systématiquement observée. Les cathodes fabriquées manuellement présentent une meilleure résistance au biofouling dans le temps. Ce résultat va dans le même sens que ceux développés dans la partie 2.2 du Chapitre 4 et confirme que des améliorations au niveau des cathodes à air issues de la fabrication automatisée peuvent encore être apportées pour accroître la tenue des électrodes dans le temps.

Au jour 8, la PCM du bloc 1 branchée en série donne les performances les plus faibles ($P_{\max} = 2 \text{ mW}$), alors que cette PCM surpassait initialement toutes les autres ($P_{\max} = 4,5 \text{ mW}$ au jour 0). Cette chute n'est pas causée par la cathode à air, puisque la cinétique est identique celle de la PCM du bloc 2. Ce comportement s'explique plutôt par le fait que cette PCM placée en série, travaille à un courant plus élevé que celles placées en parallèle, et consomme donc l'acétate plus rapidement, ce qui se répercute sur les performances de la bioanode. La dégradation de la bioanode n'est cependant pas un phénomène irréversible dans ce cas, puisqu'un nouvel ajout d'acétate a permis de retrouver une cinétique anodique optimale (courbe non présentée). Il est donc nécessaire d'être vigilant à alimenter en acétate chaque PCM du prototype à des fréquences différentes en fonction de leurs conditions de fonctionnement propres.

Juste après la première mesure de courbe de puissance au jour 8, la PCM assurant les performances les plus faibles dans le bloc 1 est remplacée par la PCM la plus performante provenant du bloc 2. Une nouvelle courbe de puissance est mesurée. Cet échange a un impact considérable sur le courant délivré

par le prototype, qui augmente immédiatement de 5.9 à 13 mA. La puissance maximale atteint 16.9 mW. Une nouvelle fois, placer une PCM de meilleure qualité en série permet de retrouver de bonnes performances, certes plus faibles, probablement en raison de la légère dégradation des bioanodes et du fouling progressif des cathodes, mais tout de même honorables comparées au premier jour de fonctionnement.

Enfin, les performances du prototype continuent à diminuer jusqu'au jour 19 où la tension passe en dessous du critère de réussite de 1 V (0.95 V). La puissance maximale de 13.3 mW reste toutefois raisonnable ainsi que le courant (13 mA). L'étude de l'architecture « ASE » du Chapitre 5 a montré que le remplacement d'une cathode encrassée par une cathode neuve relance les performances des PCMs. Il aurait donc été intéressant à ce stade d'observer l'effet du remplacement des cathodes à air sur les performances délivrées par le prototype, ce qui n'a malheureusement pas pu être effectué en respectant les contraintes de temps imparties pour la thèse. Par ailleurs, la caractérisation plus approfondie des cathodes à air permettrait d'évaluer les différences de structure ou de développement du biofouling en surface entre les cathodes élaborées manuellement et celles issues de la ligne automatisée. Ceci permettrait de dégager d'éventuelles pistes d'amélioration de la conception des cathodes à air.

3. Conclusions du Chapitre 6

Ce chapitre est dédié à l'optimisation d'un assemblage de PCMs en envisageant de multiples options : en série, en parallèle, de manière indépendante ou dans un électrolyte commun.

La première partie étudie les possibilités de connexion en série de deux PCMs partageant un même électrolyte. Plusieurs raisons nous ont poussés à ne pas poursuivre cette voie. D'une part, les performances atteintes expérimentalement sont loin des maxima théoriquement possibles. Par ailleurs, les pistes d'optimisation testées grâce à la modélisation des distributions secondaires de potentiel n'aboutissent qu'à des configurations inappropriées pour un prototype de laboratoire.

Ce choix a conditionné l'architecture du prototype de démonstration « Bioelec » présenté dans la seconde partie. Il est constitué de neuf PCMs indépendantes conçues avec la configuration « ASE ». L'objectif premier était de réaliser un démonstrateur de la technologie PCM qui permette d'évaluer les performances que peut atteindre un système de laboratoire abouti. Une puissance suffisante pour faire fonctionner de petits appareils électroniques a été produite pendant une vingtaine de jours. L'étude a par ailleurs mis en avant que la position des PCMs est un facteur important qui conditionne les performances du système.

Enfin, comme nous l'avons déjà abordé dans la publication 3 « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells » du chapitre 5, il est difficile de déterminer les causes de pertes ou de gains de performance sans caractériser individuellement chaque électrode de la PCM. Plusieurs phénomènes peuvent se produire concomitamment et se masquer l'un l'autre dans l'analyse globale de la pile. Cette réflexion peut être étendue à un stack de PCMs, dont la compréhension du comportement devient difficile sans avoir les caractéristiques de chacune des PCMs qui le composent. Force est de constater que les données recueillies pour seulement trois PCMs (une par bloc) sur les neuf qui constituent le prototype entier ne sont pas suffisantes pour interpréter avec précision l'évolution des performances. Elles ont tout de même permis d'expliquer certaines défaillances.

Conclusions générales

L'idée que des microorganismes puissent catalyser des réactions électrochimiques semble avoir émergé il y a une centaine d'année (Potter, 1911), puis a été sporadiquement reprise, en particulier dans la cadre de la biocorrosion (Erable et coll., 2012). Mais le concept n'a trouvé son engouement actuel que depuis le début des années 2000. La technologie des piles à combustible microbiennes (PCMs) est donc encore relativement jeune. Des progrès considérables ont été accomplis et les PCMs se positionnent aujourd'hui comme l'archétype des technologies électro-microbiennes, mais elles ne parviennent cependant pas à dépasser l'échelle du laboratoire. De nombreux défis restent encore à relever pour évaluer la possibilité de réelles applications domestiques ou industrielles.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du projet Bioelec. Ce projet vise à développer une nouvelle génération de PCMs en s'affranchissant de toute contrainte applicative. L'objectif est de concevoir une PCM dans des conditions optimales, même si elles ne sont réalisables qu'en laboratoire, dans l'unique but d'assurer des densités de puissances maximales. La démarche novatrice du projet Bioelec consiste à analyser le fonctionnement global de la PCM afin de concevoir une anode microbienne et une cathode abiotique capables de fonctionner ensemble dans les meilleures conditions possibles.

Le travail de thèse repose en partie sur le développement d'une approche numérique en parallèle des expérimentations. Le LGC avait initié une telle démarche de modélisation dans le but concevoir un électrolyseur microbien. En s'inspirant de ce travail, j'ai développé au cours de ces travaux de thèse un outil de modélisation maîtrisé, permettant de calculer les distributions de potentiel et de courant au sein de l'électrolyte d'une PCM. Il s'agit là d'un axe de recherche original, rarement rencontré dans la bibliographie actuelle sur les PCMs.

La PCM a été conçue avec un seul compartiment muni d'une cathode à air abiotique qui assure la réduction de l'oxygène et d'une anode microbienne qui catalyse l'oxydation de l'acétate. L'inoculum choisi pour former la bioanode est issu de terreau de jardin, parce qu'il avait déjà donné des résultats prometteurs au cours d'une thèse antérieure réalisée au LGC.

Dans la première partie des travaux, des essais préliminaires ont été effectués afin de modifier la composition du lixiviat de terreau, utilisé jusqu'alors comme électrolyte de la pile. Une solution aussi riche que ce lixiviat provoque l'encrassement rapide de la cathode à air, phénomène qui limite fortement les performances du système. Plusieurs méthodes ont été testées pour préparer un lixiviat plus « propre » susceptible de retarder le plus possible l'encrassement de la cathode. Les résultats infructueux obtenus avec ces différentes méthodes nous ont poussé à conserver le lixiviat de terreau comme inoculum initial, puis à mettre en œuvre la bioanode dans un électrolyte synthétique. Nos efforts se sont alors focalisés sur la mise au point d'une stratégie de formation de la bioanode en deux étapes : la bioanode est dans un premier temps formée dans l'inoculum lixiviat de terreau puis transférée en milieu synthétique. La polarisation tout au long de l'expérience s'est avérée nécessaire pour assurer la formation de bioanodes reproductibles. Des densités de courant élevées, jusqu'à 30 A.m^{-2} , ont été obtenues avec du tissu de carbone comme matériau d'anode. Ces densités de courant sont calculées par rapport à la surface projetée de la bioanode (9 cm^2), comme couramment rencontré dans la bibliographie. L'approche numérique démontre toutefois qu'il est plus légitime d'exprimer les densités de courant par rapport à la surface totale de l'électrode. Il est alors important de prendre en compte la tranche de l'électrode, y compris si celle-ci n'est épaisse que de quelques millimètres. Par exemple, une bioanode délivrant 30 A.m^{-2} par rapport à la surface projetée de $3 \times 3 \text{ cm}^2$, ne délivre plus que 14.1 A.m^{-2} par rapport à la surface totale incluant une tranche de 1 mm. Nous insistons ici,

d'une façon peut-être surprenante, sur un détail de calcul car il peut devenir une source d'erreur importante lors de la comparaison des résultats numériques et expérimentaux.

La bibliographie indique qu'une bioanode déjà formée, dite anode primaire, peut être utilisée comme source d'inoculum pour former une nouvelle génération d'anode secondaire. Cette méthode adaptée à notre inoculum a permis la préparation en seulement quelques jours de bioanodes secondaires qui produisent des densités de courant égales à celles des bioanodes primaires. Il a ensuite été mis en évidence que maintenir la concentration en acétate plutôt que d'alimenter le réacteur en fed-batch et porter la température 40°C, même si la bioanode doit être finalement utilisée à température ambiante, étaient deux options efficaces pour réduire le temps de formation des bioanodes. Ainsi, en regroupant l'ensemble de ces conditions optimales, le temps de formation d'une bioanode performante, qui pouvait atteindre jusqu'à 20 jours en début de thèse, a été réduit à 5 jours à l'issue de ces travaux.

Un aspect moins brillant, mais pourtant important, concerne le développement à grande échelle des bioanodes. Augmenter la surface de 9 cm² à 50 cm² entraîne une nette diminution des performances de l'électrode. Cette chute a été attribuée, grâce au calcul des distributions secondaires de potentiel par le modèle numérique, à la non-uniformité du potentiel local de Nernst le long de la surface de la bioanode. Cette hétérogénéité du potentiel local engendre par ailleurs une modification des caractéristiques du biofilm, ce qui serait une cause supplémentaire de baisse des performances. Ce constat met l'accent sur un axe de recherche dont nous n'avons pas encore saisi toute l'importance. Etablir des corrélations entre les caractéristiques électrochimiques d'un biofilm et le potentiel auquel il travaille se révèle être absolument nécessaire pour établir des lois d'extrapolation. L'étude de l'influence du potentiel sur le biofilm ne doit plus être considéré comme du seul domaine des études fondamentales, mais comme un axe majeur de l'ingénierie des systèmes électro-microbiens. Vu la faible conductivité des électrolytes utilisés dans les PCM, les distributions de potentiel le long de l'électrode peuvent devenir importantes. Lors de l'extrapolation à grande échelle, si la géométrie du réacteur n'est pas adéquate, l'impact de la distribution du potentiel local sur l'électroactivité du biofilm peut être rédhibitoire. Il faut d'ailleurs noter que la conception des dispositifs expérimentaux doit prendre garde à vérifier l'uniformité du potentiel sur l'ensemble de l'électrode de travail, afin de recueillir des informations bien corrélées à une valeur de potentiel donnée et non pas à des moyennes sur une gamme de potentiels locaux.

Apporter le concept de nombres de transport dans le domaine des PCM a permis de développer un outil simple et original, qui permet de prédire certains aspects du fonctionnement d'une PCM et certaines de ses limites à partir de l'analyse de la composition ionique de l'électrolyte. Cette étude théorique a notamment permis de lever le voile sur un des points primordiaux concernant l'équilibre des pH au sein d'une PCM : ni les protons ni les ions hydroxydes ne participent au transport du courant dans l'électrolyte, comme cela a souvent été écrit par analogie avec les piles à combustible à hydrogène. Il est important de garder en mémoire que les conditions de fonctionnement d'une PCM, régies par la présence d'organismes vivants, sont bien différentes de celles des systèmes électrochimiques abiotiques. Dans ce cadre, l'équilibre des pH au sein de la pile, entre l'anode qui acidifie le milieu et la cathode qui l'alcalinise, est une condition essentielle. Par ailleurs, l'approche théorique simple du transport ionique, couplée à l'analyse bibliographique, suggère que l'utilisation de séparateurs sophistiqués telles que les membranes échangeuses d'ions, coûteuses et ajoutant une résistance non négligeable au système, n'est pas justifiée en particulier parce qu'elles nuisent à l'équilibre des pH. L'idée d'un séparateur microbien qui pourrait remplacer un séparateur classique

dans une PCM est proposée, pour assurer la fonction essentielle de protection de l'anode contre le transport parasite de l'oxygène non consommé à la cathode. Il permettrait également de consommer une partie de la matière organique contenue dans l'électrolyte et de diminuer ainsi le biofouling de la cathode à air. En fait, un tel séparateur microbien, se développant spontanément sur des surfaces initialement non destinées à cet objectif, a déjà été observé dans la bibliographie. C'est là un autre axe de recherche qui serait à poursuivre pour développer les PCMs.

La seconde partie de ce travail de thèse a porté sur l'optimisation de la configuration d'une PCM. La combinaison de l'« Assemblage Séparateur-Electrode (ASE) » avec une cathode amovible a permis d'atteindre des densités de puissances jusqu'à 6.4 W.m^{-2} . Ces performances se hissent au-delà de celles reportées jusqu'à présent dans la bibliographie pour les PCMs qui utilisent l'oxygène comme oxydant. Cette architecture réunit les caractéristiques qui permettent de lever une partie des verrous identifiés dans cette thèse. Le dispositif dit « de cathode amovible » permet de remplacer la cathode à air sans perturber la bioanode, malgré la proximité des deux électrodes. Ce dispositif met également en œuvre une couronne vissée qui améliore significativement le contact électrique entre cathode et collecteur. La distance anode-cathode est réduite à quelques millimètres grâce à la configuration « ASE » afin de minimiser la résistance ionique. Les possibles perturbations dues au crossover de l'oxygène vers la bioanode sont palliées par la structure tridimensionnelle de l'anode. Cette architecture de PCM constitue un réel aboutissement dans cette deuxième phase du travail de thèse. Nous avons constaté avec surprise que la configuration « ASE » munie d'une simple grille utilisée comme séparateur permet d'obtenir les densités de puissance les plus élevées. Sur la base de l'approche théorique développée au début de ce mémoire, il a été supposé que cette configuration assurait un meilleur équilibre des pH entre bioanode et cathode parce qu'elle n'oppose aucune barrière au transport des espèces tampon entre la bioanode, qui acidifie l'électrolyte, et la cathode, qui l'alcalinise. La gestion du pH entre bioanode et cathode serait donc un axe à considérer en priorité pour concevoir une architecture de PCM. Cette démarche, qui pourrait peut-être faire gagner encore quelques W.m^{-2} , devrait être le sujet des prochaines expériences à entreprendre dans le futur.

Le dernier objectif de mes travaux a été d'élaborer un démonstrateur pour finaliser le projet Bioelec en réalisant une démonstration concrète de l'intérêt de la technologie PCM pour la production d'électricité autonome. Pour une application concrète, il était nécessaire d'augmenter la tension délivrée par la pile. Une valeur de 1 V a été choisie comme cible. Dans cet objectif, connecter un ensemble de PCMs en série au sein d'un électrolyte commun s'est avéré totalement inapproprié. Le modèle numérique calculant les distributions secondaires de potentiel au sein de l'électrolyte sur la base des cinétiques expérimentales des deux électrodes a permis d'explorer une large gamme de paramètres architecturaux. Cette approche numérique a permis de conclure de manière sûre que les configurations qui permettraient une connexion en série de plusieurs PCMs partageant un électrolyte unique ne sont pas réalisables pour un prototype destiné à la production d'énergie pour des applications de laboratoire, domestiques ou industrielles. Nous avons alors opté pour une configuration intégrant plusieurs PCMs indépendantes, conçues avec la configuration « ASE ». Les résultats ont été satisfaisants puisque la tension de 1 V a été assurée avec une puissance suffisante pour faire fonctionner de petits appareils électroniques pendant une vingtaine de jours. L'analyse en détail du prototype n'a pas été poursuivie après ces vingt jours, mais il est tout de même intéressant de noter que ce démonstrateur, lancé au courant du mois de novembre 2016, fournissait encore du courant au mois de janvier 2017.

Enfin, il n'est pas inutile de rappeler que les analyses des populations microbiennes constituant les bioanodes formées à partir de lixiviat de terreau ont révélé à plusieurs reprises la présence, souvent majoritaire, des espèces *Proteiniphilum acetatigenes* et *Ruminobacillus sp.* Ces espèces ne sont pourtant pas connues pour leur électroactivité et n'ont pas été souvent identifiées dans la bibliographie parmi les espèces dominantes de biofilms électroactifs. Il serait donc judicieux d'approfondir les recherches dans cette direction afin de confirmer leur possible électroactivité et, le cas échéant, de déterminer leurs conditions optimales de développement. Par ailleurs, des PCM dont les performances dépassent celles reportées dans la bibliographie ne présentent sur leurs bioanodes qu'une très faible proportion de l'espèce *Geobacter sulfurreducens* (inférieure à 6 %). Ce résultat est surprenant car *Geobacter sulfurreducens* est une espèce modèle connue pour de remarquables propriétés électroactives. Il est donc possible de concevoir des PCM très performantes avec des consortiums bactériens différents de ceux rencontrés généralement dans la bibliographie. Peut-être la présence ubiquitaire du genre *Geobacter* dans la bibliographie sur les PCM est-il dû à l'utilisation quasi-exclusive de sédiments et de boues de stations d'épuration comme source d'inoculum. Nos résultats tendraient à confirmer que la capacité à former des biofilms électroactifs s'étend bien au-delà des écosystèmes étudiés jusqu'à présent. L'électrochimie microbienne aurait donc encore de larges champs d'études à défricher.

Au-delà des perspectives évoquées ci-dessus, qui sont le fruit des résultats de cette thèse ou sont issues d'observations faites dans le cours des travaux, d'autres axes de recherches sont également à développer pour tenter de faire sortir les PCM des laboratoires.

La tâche du projet Bioelec consacrée à l'amélioration des bioanodes comporte un volet destiné au développement de biofilms électroactifs sur des matériaux différents du tissu de carbone utilisé dans cette thèse. L'acier est par exemple un bon candidat comme support du biofilm anodique car il présente de grands avantages mécaniques pour sa mise en forme et sa tenue et une meilleure conductivité électrique que le tissu de carbone. Toutefois, la présence d'oxydes de surface complexifie grandement la formation des bioanodes et exige un travail de recherche spécifique pour comprendre et exploiter les mécanismes mis en jeu. Le LAMBE, partenaire du projet Bioelec, s'est engagé dans cette voie prometteuse.

Les études présentées dans ce manuscrit ont une fois de plus montré que la faible durée de vie du catalyseur platine utilisé dans la cathode à air constitue un frein majeur au développement de la PCM. De meilleures performances ont été atteintes avec les cathodes à air fabriquées à la main comparées à celles issues de la fabrication automatisée, sans doute parce que la charge de platine est plus importante pour les premières. La cathode à air abiotique reste un des verrous majeurs de la PCM. La bibliographie reporte de nombreuses études consacrées à la conception de catalyseurs minéraux ou organiques qui seraient plus efficaces que le platine aux valeurs de pH proches de la neutralité, mais sans grand succès à notre connaissance. Un des axes du projet Bioelec vise à remplacer la cathode abiotique par une cathode microbienne à air. L'idée est de développer le biofilm cathodique à l'intérieur d'une structure directement ouverte à l'air, ce qui permettrait de pallier la faible solubilité de l'oxygène en solution aqueuse. C'est un axe prometteur qui est actuellement en cours de développement en étroite collaboration avec le partenaire LEMiRE expert en écologie microbienne.

Enfin, tous les résultats présentés dans ce mémoire ont mis en évidence la difficulté de reproduire des expériences dès lors que des organismes vivants sont impliqués, y compris dans des conditions électrochimiques bien contrôlées. Développer des biofilms électroactifs de composition similaire, de

performances identiques, qui soient tous valorisables en un temps imparti est un réel défi tant les mécanismes biologiques mis en jeu sont complexes. Là réside toute la complexité de la technologie PCM. Cette thèse s'inscrit à la frontière entre les domaines des bioprocédés, de l'électrochimie et de la microbiologie. Elle a représenté ma première incursion dans le domaine microbien, moi qui suis issue d'une formation axée sur le génie des procédés. Ce fut donc pour moi un réel challenge d'appréhender et de tenter de maîtriser cette sphère microbienne. Je souhaite que les résultats obtenus tout au long de cette thèse et au cours du projet Bioelec apportent quelques pierres utiles pour paver la longue voie qui transformera la passionnante aventure scientifique des PCMs en une technologie durable.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abourached, C., Lesnik, K. L., & Liu, H. (2014). Enhanced power generation and energy conversion of sewage sludge by CEA-microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, *166*, 229–234.
- An, J., & Lee, H.-S. (2014). Occurrence and Implications of Voltage Reversal in Stacked Microbial Fuel Cells. *Chemosuschem*, *7*(6), 1689–1695.
- An, J., Kim, B., Chang, I. S., & Lee, H.-S. (2015). Shift of voltage reversal in stacked microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, *278*, 534–539.
- Ben Liew, K., Daud, W. R. W., Ghasemi, M., Leong, J. X., Lim, W. S., & Ismail, M. (2014). Non-Pt catalyst as oxygen reduction reaction in microbial fuel cells: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(10), 4870–4883.
- Bennetto, H. P. (1981). Rates of reduction of phenothiazine 'redox' dyes by *E. coli*. *Chem. Ind.*, 770–778.
- Bergel, A., & Feron, D. (2002). Pile à combustible utilisant des biofilms en tant que catalyseur de la réaction cathodique et/ou anodique, France, FR 02.10009, *Extension Internationale 2003*.
- Bergel, A., Feron, D., & Mollica, A. (2005). Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications*, *7*(9), 900–904.
- Blanchet Belkhodja, E. (2016). Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne. *Toulouse, INPT*.
- Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., & Lovley, D. R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science*, *295*, 483–485.
- Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1548–1555.
- Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., & Bergel, A. (2013a). Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresource Technology*, *134*, 276–284.
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, *21*(10), 1229–1232.
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., ... Schröder, U. (2012). Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy and Environmental Science*, *5*, 9769–9772.
- Chen, S. Y., & Dong, X. Z. (2005). *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*, 2257–2261.
- Cheng, Q., & Call, D. F. (2016). Hardwiring microbes via direct interspecies electron transfer: mechanisms and applications. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *18*(8), 968–980.
- Cheng, S., Liu, H., & Logan, B. E. (2006). Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environmental Science & Technology*, *40*(7), 2426–2432.
- Choi, S. (2015). Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosensors & Bioelectronics*, *69*, 8–25.
- Cohen, B. (1931). The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol.*, *21*(1), 18–19.
- Daud, S. M., Kim, B. H., Ghasemi, M., & Daud, W. R. W. (2015). Separators used in microbial electrochemical technologies: Current status and future prospects. *Bioresource Technology*, *195*, 170–179.
- Debuy, S., Pecastaings, S., Bergel, A., & Erable, B. (2015). Oxygen-reducing biocathodes designed with pure cultures of microbial strains isolated from seawater biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *103*, 16–22.
- Desmond-Le Quéméner, E., Rimboud, M., Bridier, A., Madigou, C., Erable, B., Bergel, A., & Bouchez, T. (2016). Biocathodes reducing oxygen at high potential select biofilms dominated by

- Ecotiorhodospiraceae populations harboring a specific association of genes. *Bioresource Technology*, 214, 55–62.
- Dewan, A., Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2008). Scaling up Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 42(20), 7643–7648.
- Dhar, B. R., & Lee, H.-S. (2013). Membranes for bioelectrochemical systems: challenges and research advances. *Environmental Technology*, 34(13–14), 1751–1764.
- Erable, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Delia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., & Bergel, A. (2010). Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 51–56.
- Erable, B., Feron, D., & Bergel, A. (2012). Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review. *Chemosuschem*, 5(6), 975–987.
- Fan, Y., Hu, H., & Liu, H. (2007). Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration. *Journal of Power Sources*, 171(2), 348–354.
- Fan, Y., Sharbrough, E., & Liu, H. (2008). Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 42(21), 8101–8107.
- Fan, Y., Han, S.-K., & Liu, H. (2012). Improved performance of CEA microbial fuel cells with increased reactor size. *Energy & Environmental Science*, 5(8), 8273–8280.
- Ferreira Mercuri, E. G., Jakubiak Kumata, A. Y., Amaral, E. B., & Simoes Vitule, J. R. (2016). Energy by Microbial Fuel Cells: Scientometric global synthesis and challenges. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 65, 832–840.
- Ghasemi, M., Daud, W. R. W., Hassan, S. H. A., Oh, S.-E., Ismail, M., Rahimnejad, M., & Jahim, J. M. (2013). Nano-structured carbon as electrode material in microbial fuel cells: A comprehensive review. *Journal of Alloys and Compounds*, 580, 245–255.
- Gil, G. C., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, M., Jang, J. K., Park, H. S., & Kim, H. J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(4), 327–334.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., ... Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11358–11363.
- Hamelers, H. V. M., Ter Heijne, A., Stein, N., Rozendal, R. A., & Buisman, C. J. N. (2011). Butler-Volmer-Monod model for describing bio-anode polarisation curves. *Bioresource Technology*, 102, 381–387.
- Harnisch, F., & Schroeder, U. (2009). Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in Microbial Bioelectrochemical Systems. *Chemosuschem*, 2(10), 921–926.
- Harnisch, F., Warmbier, R., Schneider, R., & Schroeder, U. (2009). Modeling the ion transfer and polarization of ion exchange membranes in bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemistry*, 75(2), 136–141.
- He, L., Du, P., Chen, Y., Lu, H., Cheng, X., Chang, B., & Wang, Z. (2017). Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 388–403.
- Hernandez-Fernandez, F. J., Perez de los Rios, A., Salar-Garcia, M. J., Ortiz-Martinez, V. M., Lozano-Blanco, L. J., Godinez, C., ... Quesada-Medina, J. (2015). Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. *Fuel Processing Technology*, 138, 284–297.
- Huang, L., Regan, J. M., & Quan, X. (2011). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102, 316–323.
- Kato Marcus, A., Torres, C. I., & Rittmann, B. E. (2007). Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(6), 1171–1182.
- Katuri, K. P., & Scott, K. (2011). On the dynamic response of the anode in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4–5), 351–358.
- Ketep, S. F. (2012). Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière. *Toulouse, INPT*.

- Khaled, F., Ondel, O., & Allard, B. (2015). Optimal Energy Harvesting From Serially Connected Microbial Fuel Cells. *Ieee Transactions on Industrial Electronics*, 62(6), 3508–3515.
- Kim, B., An, J., Kim, D., Kim, T., Jang, J. K., Lee, B.-G., & Chang, I. S. (2013). Voltage increase of microbial fuel cells with multiple membrane electrode assemblies by in series connection. *Electrochemistry Communications*, 28, 131–134.
- Kim, B. H., Kim, H. J., Hyun, M. S., & Park, D. H. (1999). Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 127–131.
- Kim, D., An, J., Kim, B., Jang, J. K., Kim, B. H., & Chang, I. S. (2012). Scaling-Up Microbial Fuel Cells: Configuration and Potential Drop Phenomenon at Series Connection of Unit Cells in Shared Analyte. *Chemosuschem*, 5(6), 1086–1091.
- Kimura, Z., & Okabe, S. (2013). *Hydrogenophaga electricum* sp nov., isolated from anodic biofilms of an acetate-fed microbial fuel cell. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59(4), 261–266.
- Koch, C., & Harnisch, F. (2016). Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *Chemelectrochem*, 3(9), 1282–1295.
- Kouzuma, A., Kato, S., & Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Krieg, T., Sydow, A., Schroeder, U., Schrader, J., & Holtmann, D. (2014). Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 645–655.
- Kumar, R., Singh, L., Wahid, Z. A., & Din, M. F. M. (2015). Exoelectrogens in microbial fuel cells toward bioelectricity generation: a review. *International Journal of Energy Research*, 39(8), 1048–1067.
- Lacroix, R., Da Silva, S., Gaig, M. V., Rousseau, R., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2014). Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(41), 22892–22902.
- Larsen, S. B., Karakashev, D., Angelidaki, I., & Schmidt, J. E. (2009). Ex-situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2–3), 1568–1572.
- Leang, C., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2003). OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2096–2103.
- Leong, J. X., Daud, W. R. W., Ghasemi, M., Ben Liew, K., & Ismail, M. (2013). Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 28, 575–587.
- Li, L. H., Sun, Y. M., Yuan, Z. H., Kong, X. Y., & Li, Y. (2013). Effect of temperature change on power generation of microbial fuel cell. *Environmental Technology*, 34(13–14), 1929–1934.
- Li, W.-W., Yu, H.-Q., & He, Z. (2014). Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy & Environmental Science*, 7(3), 911–924.
- Li, W.-W. & Yu, H.-Q. (2015). Stimulating sediment bioremediation with benthic microbial fuel cells. *Biotechnology Advances*, 33(1), 1-12.
- Li, W.-W., Sheng, G.-P., Liu, X.-W., & Yu, H.-Q. (2011). Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(1), 244–252.
- Liu, H., Cheng, S. A., & Logan, B. E. (2005). Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environmental Science & Technology*, 39(14), 5488–5493.
- Liu, W., & Cheng, S. (2014). Microbial fuel cells for energy production from wastewaters: the way toward practical application. *Journal of Zhejiang University-Science A*, 15(11), 841–861.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., & Schröder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1006–1011.

- Liu, Y., Climent, V., Berna, A., & Miguel Feliu, J. (2011). Effect of Temperature on the Catalytic Ability of Electrochemically Active Biofilm as Anode Catalyst in Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis*, 23(2), 387–394.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R. A., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., ... Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5181–5192.
- Logan, B. E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1665–1671.
- Logan, B. E., Wallack, M. J., Kim, K.-Y., He, W., Feng, Y., & Saikaly, P. E. (2015). Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities. *Environmental Science & Technology Letters*, 2(8), 206–214.
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms (vol 4, pg 497, 2006). *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 797–797.
- Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B.-C., ... Lovley, D. R. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature Nanotechnology*, 6(9), 573–579.
- Malvankar, N. S., Yalcin, S. E., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2014). Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy. *Nature Nanotechnology*, 9(12), 1012–1017.
- Michaelidou, U., ter Heijne, A., Euverink, G. J. W., Hamelers, H. V. M., Stams, A. J. M., & Geelhoed, J. S. (2011). Microbial Communities and Electrochemical Performance of Titanium-Based Anodic Electrodes in a Microbial Fuel Cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1069–1075.
- Min, B., Román, Ó. B., & Angelidaki, I. (2008). Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance. *Biotechnology Letters*, 30(7), 1213–1218.
- Moon, J. M., Kondaveeti, S., Lee, T. H., Song, Y. C., & Min, B. (2015). Minimum interspatial electrode spacing to optimize air-cathode microbial fuel cell operation with a membrane electrode assembly. *Bioelectrochemistry*, 106, 263–267.
- Morozan, A., Stamatina, I., Stamatina, L., Dumitru, A., & Scott, K. (2007). Carbon electrodes for microbial fuel cells. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9(1), 221–224.
- Niessen, J., Harnisch, F., Rosenbaum, M., Schröder, U., & Scholz, F. (2006). Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochemistry Communications*, 8, 869–873.
- Oh, S. T., Kim, J. R., Premier, G. C., Lee, T. H., Kim, C., & Sloan, W. T. (2010). Sustainable wastewater treatment: How might microbial fuel cells contribute. *Biotechnology Advances*, 28(6), 871–881.
- O'Hayre, R., Fabian, T., Lee, S. J., & Prinz, F. B. (2003). Lateral ionic conduction in planar array fuel cells. *Journal of the Electrochemical Society*, 150(4), A430–A438.
- Oliot, M., Galier, S., Roux de Balmain, H., & Bergel, A. (2016). Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review. *Applied Energy*, 183, 1682–1704.
- Pandey, P., Shinde, V. N., Deopurkar, R. L., Kale, S. P., Patil, S. A., & Pant, D. (2016). Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy*, 168, 706–723.
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*, 101(6), 1533–1543.
- Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Gallego, Y. A., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2011). An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(2), 1305–1313.

- Park, H. S., Kim, B. H., Kim, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Kim, M., ... Chang, H. I. (2001). A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe*, 7(6), 297–306.
- Parot, S., Délia, M.-L., & Bergel, A. (2008). Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochimica Acta*, 53, 2737–2742.
- 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., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2012). Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(38), 13332–13343.
- Popat, S. C., Ki, D., Young, M. N., Rittmann, B. E., & Torres, C. I. (2014). Buffer pK(a) and Transport Govern the Concentration Overpotential in Electrochemical Oxygen Reduction at Neutral pH. *Chemelectrochem*, 1(11), 1909–1915.
- Popat, S. C., & Torres, C. I. (2016). Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresource Technology*, 215, 265–273.
- Potter, M. C. (1911). Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 84(571), 260–276.
- Pu, L., Li, K., Chen, Z., Zhang, P., Zhang, X., & Fu, Z. (2014). Silver electrodeposition on the activated carbon air cathode for performance improvement in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 268, 476–481.
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S. D., Verhaege, M., & Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5373–5382.
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., & Verstraete, W. (2005). Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 39(9), 3401–3408.
- Ramachandran, R., Chen, S.-M., & Kumar, G. peter G. (2015). Enhancement of Different Fabricated Electrode Materials for Microbial Fuel cell Applications: An Overview. *International Journal of Electrochemical Science*, 10(9), 7111–7137.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098–1101.
- Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2006). Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7345–7348.
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., & Bergel, A. (2014). Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 16(31), 16349–66.
- Rimboud, M., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bouchez, T., & Bergel, A. (2015). The current provided by oxygen-reducing microbial cathodes is related to the composition of their bacterial community. *Bioelectrochemistry*, 102, 42–49.
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2013). Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochemistry Communications*, 33, 1–4.
- 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 (Amsterdam, Netherlands)*, 112, 24–32.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J., & Buisman, C. J. N. (2008). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 450–459.
- Salvin, P., Ondel, O., Roos, C., & Robert, F. (2015). Energy harvest with mangrove benthic microbial fuel cells. *International Journal of Energy Research*, 39(4), 543–556.

- Santoro, C., Babanova, S., Atanassov, P., Li, B., Ieropoulos, I., & Cristiani, P. (2013). High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode. *Journal of the Electrochemical Society*, *160*(10), H720–H726.
- Santoro, C., Artyushkova, K., Babanova, S., Atanassov, P., Ieropoulos, I., Grattieri, M., ... Schuler, A. J. (2014). Parameters characterization and optimization of activated carbon (AC) cathodes for microbial fuel cell application. *Bioresource Technology*, *163*, 54–63.
- Santoro, C., Serov, A., Villarrubia, C. W. N., Stariha, S., Babanova, S., Artyushkova, K., ... Atanassov, P. (2015). High catalytic activity and pollutants resistivity using Fe-AAPyr cathode catalyst for microbial fuel cell application. *Scientific Reports*, *5*, 16596.
- Santoro, C., Serov, A., Gokhale, R., Rojas-Carbonell, S., Stariha, L., Gordon, J., ... Atanassov, P. (2017). A family of Fe-N-C oxygen reduction electrocatalysts for microbial fuel cell (MFC) application: Relationships between surface chemistry and performances. *Applied Catalysis B: Environmental*, *205*, 24–33.
- Schaetzle, O., Barriere, F., & Baronian, K. (2008). Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy & Environmental Science*, *1*(6), 607–620.
- Schroeder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *9*(21), 2619–2629.
- Schroeder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, *8*(2), 513–519.
- Shi, L., Squier, T. C., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2007). Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. *Molecular Microbiology*, *65*(1), 12–20.
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., ... Fredrickson, J. K. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(10), 651–662.
- Sonawane, J. M., Yadav, A., Ghosh, P. C., & Adeloju, S. B. (2017). Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, *90*, 558–576.
- Song, J., Liu, L., Yang, Q., Liu, J., Yu, T., Yang, F., & Crittenden, J. (2015). PVDF layer as a separator on the solution-side of air-cathodes: the electricity generation, fouling and regeneration. *Rsc Advances*, *5*(65), 52361–52368.
- Strycharz, S. M., Malanoski, A. P., Snider, R. M., Yi, H., Lovley, D. R., & Tender, L. M. (2011). Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400. *Energy & Environmental Science*, *4*(3), 896–913.
- Strycharz-Glaven, S. M., Snider, R. M., Guiseppi-Elie, A., & Tender, L. M. (2011). On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy & Environmental Science*, *4*(11), 4366–4379.
- Torres, C. I., Marcus, A. K., Parameswaran, P., & Rittman, B. E. (2008). Kinetic Experiments for Evaluating the Nernst-Monod Model for Anode-Respiring Bacteria (ARB) in a Biofilm Anode. *Environmental Science and Technology*, *42*, 6593–6597.
- Torres, C. I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A. K., Wanger, G., Gorby, Y. A., & Rittman, B. E. (2009). Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization. *Environmental Science and Technology*, *43*, 9519–9524.
- Tremouli, A., Intzes, A., Intzes, P., Bebelis, S., & Lyberatos, G. (2015). Effect of periodic complete anolyte replacement on the long term performance of a four air cathodes single chamber microbial fuel cell. *Journal of Applied Electrochemistry*, *45*(7), 755–763.

- Tremouli, A., Martinos, M., Bebelis, S., & Lyberatos, G. (2016). Performance assessment of a four-air cathode single-chamber microbial fuel cell under conditions of synthetic and municipal wastewater treatments. *Journal of Applied Electrochemistry*, 46(4), 515–525.
- Wang, B., & Han, J.-I. (2009). A single chamber stackable microbial fuel cell with air cathode. *Biotechnology Letters*, 31(3), 387–393.
- Wang, H., & Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1796–1807.
- Wang, H., Park, J.-D., & Ren, Z. J. (2015). Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3267–3277. <https://doi.org/10.1021/es5047765>
- Wang, X., Feng, C., Ding, N., Zhang, Q., Li, N., Li, X., ... Zhou, Q. (2014). Accelerated OH⁻ Transport in Activated Carbon Air Cathode by Modification of Quaternary Ammonium for Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 4191–4198.
- Wang, Z., Cao, C., Zheng, Y., Chen, S., & Zhao, F. (2014). Abiotic Oxygen Reduction Reaction Catalysts Used in Microbial Fuel Cells. *Chemelectrochem*, 1(11), 1813–1821.
- Watson, V. J., & Logan, B. E. (2011). Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 13(1), 54–56.
- Wei, J., Liang, P., & Huang, X. (2011). Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(20), 9335–9344.
- Xie, X., Criddle, C., & Cui, Y. (2015). Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 8(12), 3418–3441.
- Yang, W., & Logan, B. E. (2016). Immobilization of a Metal-Nitrogen-Carbon Catalyst on Activated Carbon with Enhanced Cathode Performance in Microbial Fuel Cells. *Chemsuschem*, 9(16), 2226–2232.
- Yousefi, V., Mohebbi-Kalhor, D., Samimi, A., & Salari, M. (2016). Effect of separator electrode assembly (SEA) design and mode of operation on the performance of continuous tubular microbial fuel cells (MFCs). *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(1), 597–606.
- Zhang, L., Jiang, X., Shen, J., Xu, K., Li, J., Sun, X., ... Wang, L. (2016). Enhanced bioelectrochemical reduction of p-nitrophenols in the cathode of self-driven microbial fuel cells. *Rsc Advances*, 6(35), 29072–29079.
- Zhang, X., Cheng, S., Wang, X., Huang, X., & Logan, B. E. (2009). Separator Characteristics for Increasing Performance of Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, 43(21), 8456–8461.
- Zhang, X., Cheng, S., Huang, X., & Logan, B. E. (2010). The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 659–664.
- Zhang, X., Ren, H., Pyo, S., Lee, J.-I., Kim, J., & Chae, J. (2015). A High-Efficiency DC-DC Boost Converter for a Miniaturized Microbial Fuel Cell. *Ieee Transactions on Power Electronics*, 30(4), 2041–2049.
- Zhi, W., Ge, Z., He, Z., & Zhang, H. (2014). Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresource Technology*, 171(0), 461–468.
- Zhou, L., Fu, P., Cai, X., Zhou, S., & Yuan, Y. (2016). Naturally derived carbon nanofibers as sustainable electrocatalysts for microbial energy harvesting: A new application of spider silk. *Applied Catalysis B-Environmental*, 188, 31–38.
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., & Jin, T. (2011). An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(10), 4427–4435.
- Zhuang, L., & Zhou, S. (2009). Substrate cross-conduction effect on the performance of serially connected microbial fuel cell stack. *Electrochemistry Communications*, 11(5), 937–940.

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Supplementary data de la publication 2 « Influence of the electrode size on microbial anode performance »

Annexe 2 : Supplementary data de la publication 3 « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells »

Annexe 3 : Supplementary data de la publication 4 « Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boots microbial fuel cell performance »

Annexe 1 : Supplementary data de la publication 2 « Influence of the electrode size on microbial anode performance »

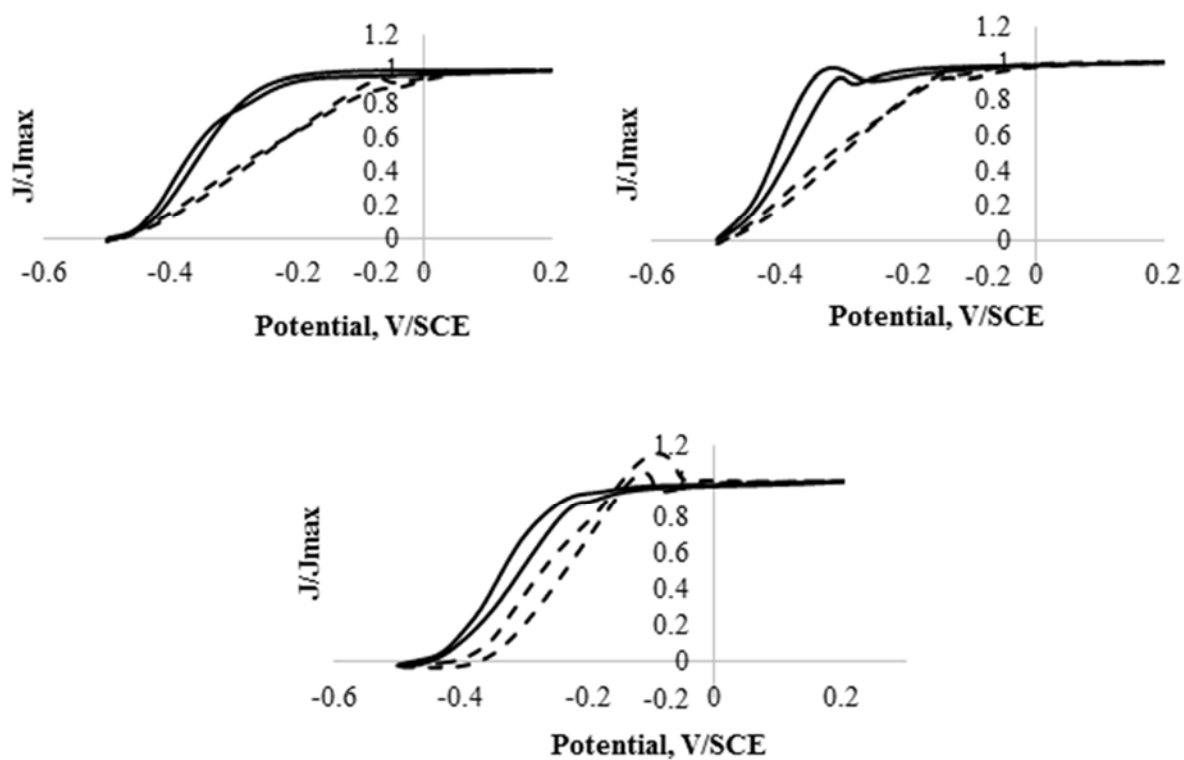


Figure 1. Experimental cyclic voltammeteries of the triplicate microbial anodes corresponding to Fig. 1 after 10 days' polarization at -0.2 V/SCE in a synthetic medium ($1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$). The continuous lines corresponds to the 9-cm² microbial anodes and the dotted lines to the 50-cm² microbial anodes.

Annexe 2 : Supplementary data de la publication 3 « Removable air-cathode to overcome cathode biofouling in microbial fuel cells »

Air-cathode imaging

At the end of the experiments, air-cathode surfaces were imaged by epifluorescence microscopy to characterize the microbial deposit. Samples were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 minutes, then washed with bicarbonate buffer and dried at ambient temperature. The samples were imaged with a Carl Zeiss Axiomager 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.

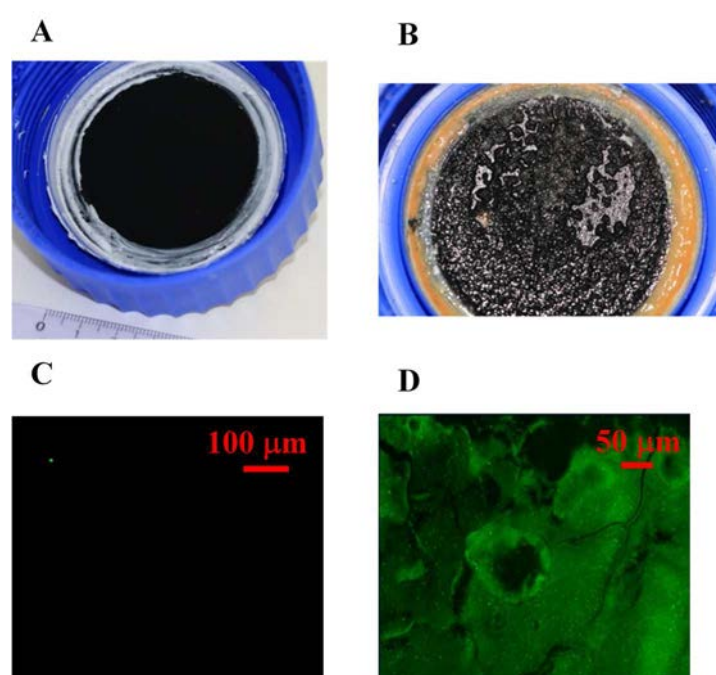


Figure 1. Photographs of air-cathodes (A) clean, (B) with biofouling after 10 days' MFC operation. Epifluorescence imaging of air-cathode: (C) clean, (D) after 10 days' MFC operation.

Numerical modelling

The model was fed with the cell geometry, the conductivity of the electrolyte and the experimental kinetic (i-E) curves of the bioanode and the air-cathode, which were used as the boundary conditions on the electrode surfaces.

The (i-E) curves were recorded simultaneously with power curve recording. The experimental curves were corrected numerically from the ohmic drop using the ohmic resistance measured by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). EIS was performed in potentiostatic mode by applying several anode and cathode potentials to span the range of anode and cathode potentials during MFC operation. The potential was set for 2 minutes and then the frequency ranged from 100 kHz to 10 mHz with an amplitude of 10 mV.

The ohmic drop values are reported in Table A. In each case, the ohmic drop was higher for the cathode (ranging from 9 to 12 Ω) than for the bioanode (ranging from 1 to 4 Ω) because the reference electrode was closer to the bioanode.

Table A. Ohmic resistances measured by EIS between the anode and the reference electrode and the cathode and the reference electrode. The conductivities increased due to the additions of sodium acetate.

Day	Conductivity [S.m ⁻¹]	Ohmic resistance Anode/Reference [Ω]	Ohmic resistance Cathode/Reference [Ω]
0	1.2	4	12
10	1.4	2.7	11
18	1.6	1	9

The corrected (i-E) curves of the bioanodes were fitted using the Butler-Volmer-Monod equation (Hamelers et coll. 2011) :

$$i = i_{max} \left(\frac{1 - \exp\left(-\frac{n.F}{R.T} \eta\right)}{K_1 \cdot \exp\left(-\frac{(1-\alpha).n.F}{R.T} \eta\right) + K_2 \cdot \exp\left(-\frac{n.F}{R.T} \eta\right) + \left(\frac{K_M}{S} + 1\right)} \right) \quad (1)$$

where i_{max} (mA) is the maximum current, $F = 96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$ is the Faraday constant, $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ is the universal gas constant, $T = 313 \text{ K}$ is the temperature, α is the charge transfer coefficient, $S = 0.02 \text{ mol.L}^{-1}$ is the substrate concentration, K_M (mol.L^{-1}) is the substrate affinity constant, K_1 and K_2 are dimensionless parameters and $n = 8$ is the number of electrons produced per mole of acetate oxidized (Equation 2). The four parameters α , K_M , K_1 and K_2 were adjusted numerically in order to make the numerical curve match the experimental (i-E) curve (Fig. A).

The (i-E) curves of the air-cathodes were fitted with a Butler-Volmer equation where the anodic branch was neglected:

$$i = -i_0 \exp\left[\frac{-\alpha n F}{RT} \eta\right] \quad (2)$$

where i_0 (mA) is the exchange current and $n = 4$ is the number of electrons consumed per mole of oxygen reduced.

Parameters were adjusted numerically only to transform the experimental kinetics into equations that could be processed numerically. It is important to mention that no parameter was numerically adjusted during the modelling phase.

On the basis of the experimental kinetics, the reactor geometry and the ionic conductivity of the medium, the model gave the distribution of the electrostatic potential, the current distribution on the surfaces of the electrodes. The current flowing through the electrical circuit was calculated by integrating the current distribution on the electrode surface. Finally, power curves were plotted by calculating the current for cell voltages ranging from the open circuit voltage to zero.

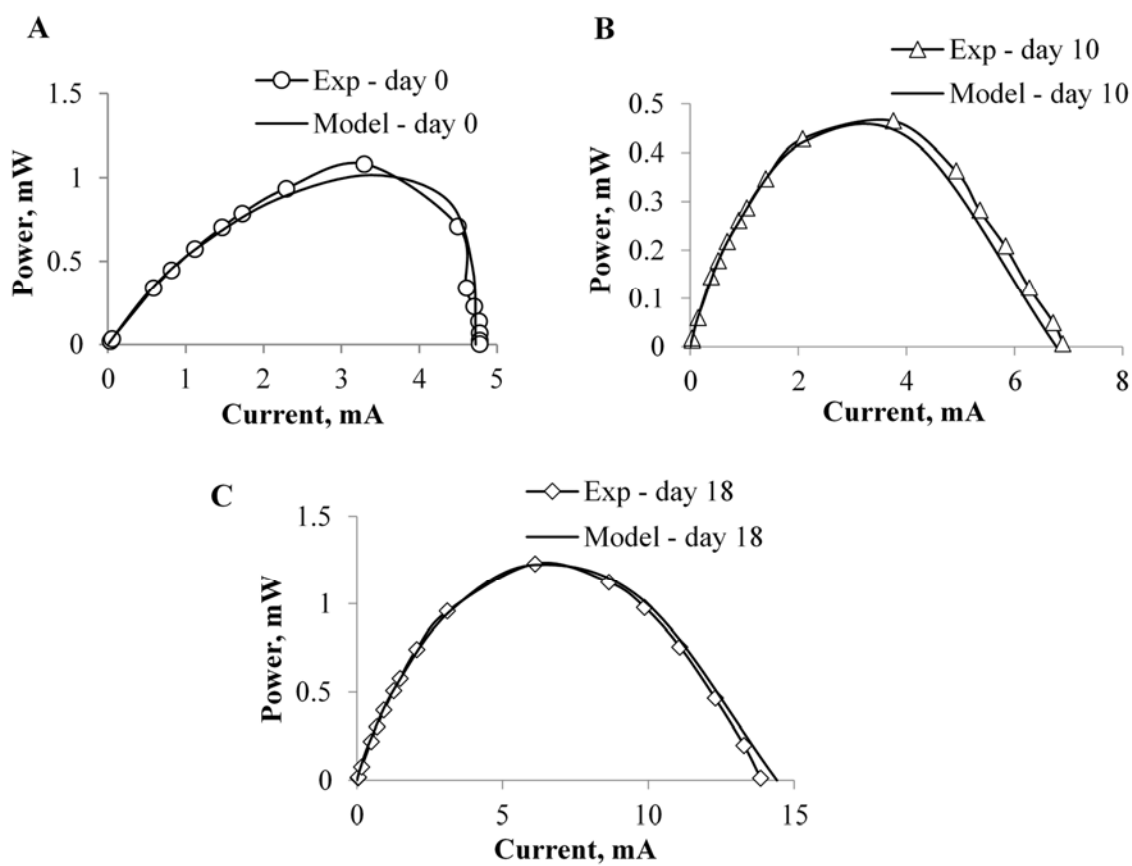


Figure. 2. Experimental and modelled power curves of MFCs: (A) 9-cm² bioanode at day 0, B) 9-cm² bioanode at day 10 just before changing the air-cathode, (C) 50 cm² bioanode at day 18 just before changing the air-cathode.

Annexe 3 : Supplementary data de la publication 4 « Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensionnal bioanode and removable air-cathode boots microbial fuel cell performance »

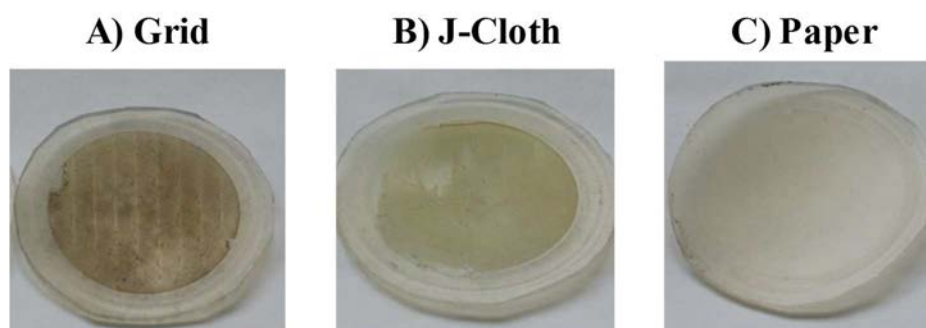


Figure 1. Biofouled silicon foils removed at the end of the phase of anode preparation.

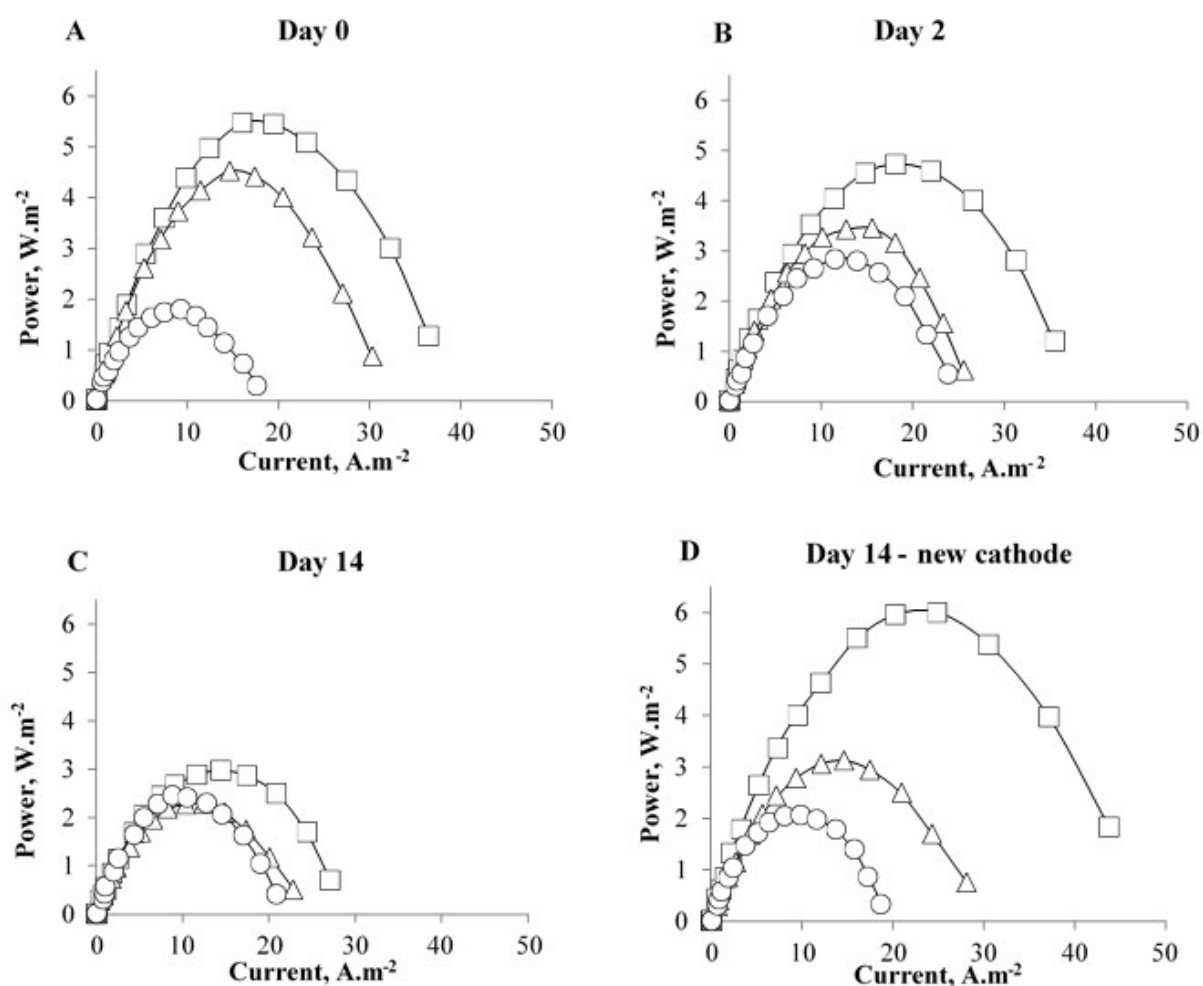


Figure 2. Power curves of duplicates in MFC operation. Squares: Grid-SEA. Triangles: JCloth-SEA. Circles: Paper-SEA.

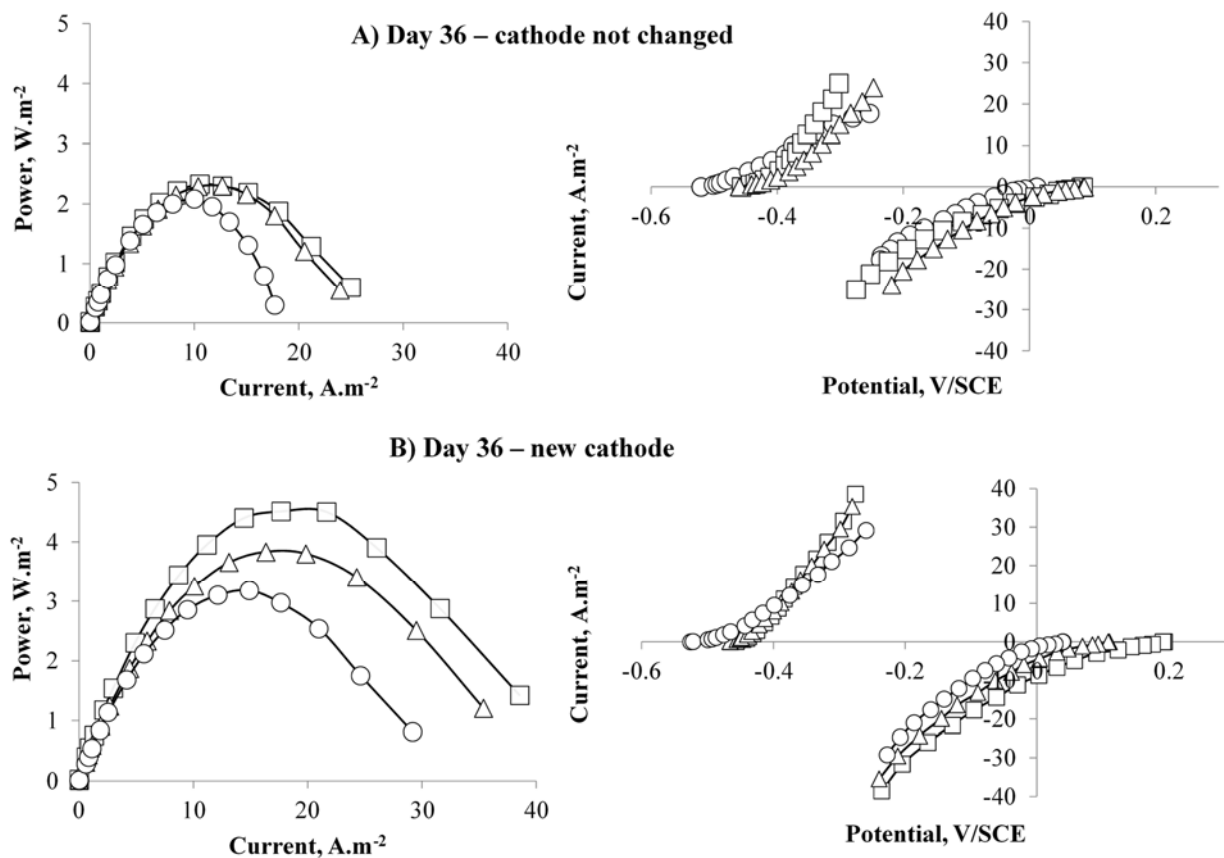


Figure 3. Power curves and electrode kinetics (i-E curves) in MFC operation at day 36 (A) the air-cathode was not changed; (B) the air-cathode was changed. Squares: Grid-SEA. Triangles: JCloth-SEA. Circles: Paper-SEA.

