



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

M. PIERRE CHAMPIGNEUX

le vendredi 15 juin 2018

**Titre :**

Comprendre et optimiser les anodes microbiennes grâce aux technologies  
microsystèmes

---

**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. MAXIME PONTIE, UNIVERSITE D'ANGERS

Mme LAURENCE SOUSSAN, ECOLE NLE SUP DE CHIMIE DE MONTPELLIER

**Membre(s) du jury :**

Mme CAROLE ROSSI, CNRS TOULOUSE, Président

M. ALAIN BERGEL, CNRS TOULOUSE, Membre

Mme MARIE LINE DELIA, INP TOULOUSE, Membre

M. THÉODORE BOUCHEZ, IRSTEA, 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 ».*

*A l'issue de la rédaction de ces travaux, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire et c'est pourquoi je tiens sincèrement à remercier mes directeurs de thèse: Alain Bergel et Marie-Line Délia. Vous m'avez offert l'opportunité de vivre cette expérience scientifique dans un environnement humain fantastique. Vous avez été d'un soutien sans faille tout au long de ces trois années et vous avez su faciliter l'ensemble de ce projet. Merci d'avoir toujours trouvé les mots justes pour me motiver et d'avoir accepté de me mettre un bon coup de pression de temps en temps. Et surtout merci de faire votre travail avec tant d'enthousiasme et de bonne humeur, cela rend les choses beaucoup plus facile. Merci Alain pour ta disponibilité, ta franchise et ton désir de faire grandir tes doctorants. Merci Marie-Line pour ta gentillesse, ta patience et ce côté sécurisant qui permet finalement de ne pas trop être perdu (même si la prochaine fois je prendrais peut-être un taxi pour aller à l'aéroport). Je tiens à remercier aussi le reste de l'équipe: Régine Basseguy pour ta sympathie et ton énergie, Luc Etcheverry pour ton aide technique et pour les sorties à Gruissan, et Benjamin Erable pour ta bonhomie et ton humour. Vous tous participez à faire de cette équipe une petite famille scientifique pleine de bons moments et qui représente toutes les valeurs que vous portez.*

*Je voudrais également remercier tous les membres du Jury d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. Merci à Maxime Pontié et Laurence Soussan d'endosser le rôle de rapporteurs. Un merci spécial à Laurence Soussan pour avoir laissé un cahier de laboratoire fort utile pour la culture de Geobacter. Je remercie également Carole Rossi pour avoir accepté d'être examinatrice de mes travaux mais surtout d'avoir enrichi ce projet Koropokkuru à nos côtés. Pour m'avoir introduit dans le monde de la bioélectrochimie et pour me suivre jusqu'à être examinateur de ma thèse, je souhaite aussi remercier Théodore Bouchez.*

*Je suis aussi très reconnaissant envers l'ensemble des gens ayant participé à ces travaux de thèse : l'équipe partenaire du LAAS pour les discussions enrichissantes et particulièrement Cyril Renault-Sentenac et David Bourrier pour m'avoir fourni de magnifiques bijoux en or ; L'ensemble des membres du département Biosym ; Cécile Pouzet pour son aide avec l'imagerie confocale ; Vincent Baylac pour ses analyses de surfaces ; 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 les réacteurs. Je remercie également l'ensemble du personnel administratif. J'adresse un remerciement particulier à Alain Philippe qui est le pilier du fonctionnement du LGC et qui prend sous son aile n'importe quel doctorant.*

*Forcément j'ai un énorme merci à faire passer à tous les amis et collègues du LGC. Merci aux 4 Galantes qui m'ont accueilli avec Polo pour équilibrer la balance en testostérone, Sylvia, William et Pierre pour vos enfantillages incessants, Emma pour tout le sel que tu déverse comme tu dirais, Poe, Cedric, Nadège, Bia, Freddy, Lauren, Marco, le couple Lucas/Pierre, Morgane, Refka, Pedro, Leticia, Simon et tant d'autres !! Merci à tous d'avoir été là pour faire de ces trois années des souvenirs impérissables.*

*Merci également aux colocs de la villa Jonas, aux 7 ½ et 33 pour tous ces moments off, aux autres 10 pour m'avoir écouté divaguer sur des HLM pour bactéries, aux potos parisiens pour ces soirées et ces semaines au ski mémorables, maintenant que c'est fini on va se voir plus, promis !*

*Je remercie de tout mon cœur ma famille : mes parents, Anne et Gilles, mes sœurs, Aurélie et Marine (Merci de m'avoir laissé gagner pour la course à la thèse ^^), leurs maris, Antoine et Paul et bienvenue à la petite nouvelle Alexie! Forcément en tant que Champigneux ou affiliés vous êtes parfait, ne changez rien! Plein de belles choses arrivent pour notre famille et je n'ai qu'une hâte c'est d'en profiter avec vous.*

*Et enfin Carla, tu as su trouver le meilleur moyen de me motiver à finir cette thèse ! Maintenant que ce projet est fini, on va enfin pouvoir avoir nos projets à deux !*





## Comprendre et optimiser les anodes microbiennes grâce aux technologies microsystèmes

### Résumé

De multiples micro-organismes ont la capacité de catalyser l'oxydation électrochimique de matières organiques en s'organisant en biofilm à la surface d'anodes. Ce processus est à la base de procédés électro-microbiens très innovants tels que les piles à combustible microbiennes ou les électrolyseurs microbiens. L'interface biofilm/électrode a été l'objet de nombreuses études dont les conclusions restent difficiles à démêler en partie du fait de la diversité des paramètres interfaciaux mis en jeu.

L'objet de ce travail de thèse est d'exploiter les technologies microsystèmes pour focaliser l'impact de la topographie de surface des électrodes sur le développement du biofilm et sur ses performances électro-catalytiques. La formation de biofilms électroactifs de *Geobacter sulfurreducens* a été étudiée sur des électrodes d'or présentant des topographies bien contrôlées, sous la forme de rugosité, porosité, réseau de piliers, à des échelles allant du nanomètre à quelques centaines de micromètres. La présence de microrugosité a permis d'accroître les densités de courant d'un facteur 8 par rapport à une surface lisse et son effet a été quantifié à l'aide du paramètre  $S_a$ . Nous avons tenté de distinguer les effets des différentes échelles de rugosité sur le développement du biofilm et la vitesse des transferts électroniques. L'intérêt de la microporosité a été discuté. L'accroissement de surface active par la présence de micro-piliers s'est avéré très efficace et une approche théorique a donné des clés de compréhension et d'optimisation. Les connaissances acquises dans les conditions de culture pure ont finalement été confrontées avec la mise en œuvre de biofilms multi-espèces issus d'un inoculum complexe provenant de sédiments marins.

Mots-clés : Bioanode ; Rugosité ; Biofilm électroactif ; Adhésion bactérienne ; *Geobacter sulfurreducens* ; Systèmes bioélectrochimique

## Understanding and optimizing microbial anodes using microsystems technologies

### Abstract

Many microorganisms have the ability to catalyze the electrochemical oxidation of organic matter by self-organizing into biofilm on the surface of anodes. This process is the basis of highly innovative electro-microbial processes such as microbial fuel cells or microbial electrolysis cells. The biofilm/electrode interface has been the subject of numerous studies whose conclusions remain difficult to disentangle partly because of the diversity of the interfacial parameters involved.

The purpose of this thesis work is to exploit microsystem technologies to focus the impact of electrode surface topography on biofilm development and electro-catalytic performance. The formation of electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* was studied on gold electrodes presenting well-controlled topographies, in the form of roughness, porosity, pillar networks, at scales ranging from nanometer to a few hundred micrometers. The presence of micro-roughness increased the current densities by a factor of 8 compared to a smooth surface and its effect was quantified using the  $S_a$  parameter. We have tried to distinguish the effects of different roughness scales on biofilm development and electron transfer rates. The suitability of micro-porosity was discussed. The increase of active surface area by the presence of micro-pillars has proved very effective and a theoretical approach has given keys to understanding and optimization. The knowledge acquired under pure culture conditions was finally confronted with the use of multi-species biofilms formed from a complex inoculum coming from marine sediments.

Keywords : Bioanode; Roughness; Electroactive biofilm ; Bacterial adhesion ; *Geobacter sulfurreducens*; Bioelectrochemical system



# Sommaire



## Sommaire

Introduction générale .....	15
Chapitre 1: Bibliographie .....	21
1. Biofilms et communautés bactériennes vivant à l'interface solide/liquide...	23
1.1. Histoire de la découverte des biofilms .....	23
1.2. Avantages d'une organisation en biofilm .....	24
1.3. Mise en place d'un biofilm .....	24
1.4. Structure d'un biofilm et facteurs déterminants .....	26
2. Electroactivité des micro-organismes .....	29
2.1. Historique de la découverte des capacités électroactives .....	29
2.2. Principes généraux de l'électroactivité des micro-organismes .....	30
2.3. Applications des systèmes électromicrobiens .....	31
2.4. Les micro-organismes électroactifs.....	33
3. Geobacter sulfurreducens : organisme modèle .....	36
4. Mécanismes de transferts électroniques .....	38
4.1. Transfert indirect .....	38
4.2. Transfert direct.....	40
5. La bioanode : matériaux et architecture .....	41
5.1. Les bioanodes en carbone .....	41
5.2. Les bioanodes métalliques.....	42
5.3. Modifications de surface et nouveaux matériaux d'anode .....	43
5.4. Architecture des bioanodes .....	43
6. La bioanode : importance des caractéristiques de surface .....	44
6.1. Physico-chimie de la surface.....	44
6.2. Topographie de la surface (Publication 1) .....	46

<b>Chapitre 2: Matériels et méthodes .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Inocula.....</b>	<b>91</b>
1.1. <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	91
1.2. Sédiments de marais salants .....	91
<b>2. Milieux synthétiques.....</b>	<b>91</b>
2.1. Milieu et mise en culture pour <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	91
2.2. Milieu synthétique pour les sédiments.....	92
<b>3. Dispositifs expérimentaux .....</b>	<b>93</b>
3.1. Les électrodes .....	93
3.1.1. Anodes en carbone .....	93
3.1.2. Anodes en or .....	94
3.1.3. Support des surfaces d'or.....	95
3.1.4. Anodes en cuivre .....	96
3.2. Réacteurs anaérobies pour <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	96
3.3. Réacteurs sédimentaires.....	97
<b>4. Techniques d'analyses .....</b>	<b>98</b>
4.1. Techniques d'analyses électrochimiques.....	98
4.1.1. Chronoampérométrie.....	99
4.1.2. Voltammétrie cyclique .....	99
4.2. Techniques d'analyses chimiques et biochimiques .....	100
4.2.1. Dosage enzymatique de l'acétate .....	100
4.2.2. Dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	100
4.2.3. Protocole d'extraction du contenu cellulaire .....	101
4.3. Techniques de microscopie .....	101
4.3.1. Microscopie en épifluorescence.....	101
4.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	102
4.3.3. Microscopie pour les mesures de surface.....	104
4.4. Détermination de l'hydrophobie de surface par mesure d'angle de contact	105
4.5. Analyses de populations microbiennes par pyroséquençage .....	105

## Chapitre 3 : Performances de bioanodes formées sur différents matériaux d'électrode ..... 107

1. Choix initiaux des matériaux d'électrode .....	109
2. Test abiotiques de l'or, du cuivre et du graphite .....	111
3. Formation de biofilms électroactifs de <i>G. sulfurreducens</i> .....	112
3.1. Electrodes de graphite .....	112
3.2. Electrodes d'or et de cuivre .....	116
4. Perte d'électroactivité de <i>Geobacter</i> .....	119
5. Formation de biofilms électroactifs de sédiments .....	122
5.1. Electrodes en graphite plan et feutre de carbone .....	122
5.2. Electrodes d'or .....	125
6. Conclusion et choix d'étude .....	127

## Chapitre 4 : Optimisation de la rugosité de surface pour la formation de biofilms ..... 131

1. Objectifs et Choix d'étude .....	133
2. Choix pour la caractérisation de la rugosité .....	134
3. Mise au point d'une mesure électrochimique des surfaces actives .....	137
4. Performance anodique selon une gamme de micro-rugosité (Publication 2) .....	140
5. Commentaires sur la publication « micro-rugosité » .....	160
6. Conclusion .....	161

<b>Chapitre 5 : Micro-structuration de surface pour l'amélioration des bioanodes .....</b>	<b>163</b>
1. Choix du type de structuration de surface .....	165
2. Performance anodique en présence de structuration (Publication 3).....	168
3. Commentaires sur les observations microscopiques des bioanodes micro-structurées. ....	193
4. Nouvelles ingénieries de surface pour l'obtention de bioanodes performantes (Publication 4).....	196
5. Ultra-microelectrodes, diffusion et conductivité au sein du biofilm.....	220
6. Investigation d'une eventuelle voie métabolique Annexe chez Geobacter sulfurreducens.....	223
7. Conclusions Générales sur les expériences menées en culture pure de Geobacter sulfurreducens.....	229
<b>Chapitre 6: Essais en conditions d'inoculation réelle.....</b>	<b>233</b>
1. Objectif du passage à un inoculum multi-espèces .....	234
2. Expérimentation de différentes techniques d'inoculation.....	235
2.1. Réduction du taux d'inoculation .....	236
2.2. Filtration du milieu de culture après inoculation.....	237
2.3. Passage par une électrode primaire .....	238
3. Formation d'une anode sur une surface d'or structurée à partir d'une électrode primaire .....	242
4. Formation d'une anode sur or en inoculation directe .....	250

5. Conclusion quant a l'utilisation de l'or avec un inoculum sédimentaire .... 252

Conclusions générales ..... 255

Références bibliographiques..... 263



# *Introduction générale*



Depuis les débuts de la maîtrise de l'électricité au XVIII<sup>ème</sup> siècle, la seconde révolution industrielle a placé l'électricité au centre de notre mode de vie. L'électricité est devenue omniprésente dans un monde toujours plus informatisé et automatisé et la tendance ne fait que s'accroître. Les besoins en électricité au niveau mondial sont aujourd'hui d'environ 20 000 TWh (térawatts-heure) contre 6 129 TWh en 1973. Cela correspond à 18.5% de la consommation énergétique mondiale et les estimations annoncent une augmentation de 2,2% de la demande chaque année.

À l'heure des grands défis écologiques, l'électricité est encore très largement produite à partir de sources dites non-renouvelables que sont le charbon, le gaz naturel, le nucléaire et le pétrole. La transition énergétique doit entraîner un bouleversement du panorama énergétique de notre planète qui passera principalement par le développement de nouvelles solutions de production d'électricité. Afin de diversifier l'éventail énergétique actuel, les énergies mécaniques (hydraulique, éolienne), solaires et géothermiques déjà largement maîtrisées, seront à la base du processus de remplacement.

La diversification nécessaire des sources énergétiques incite à explorer toutes les pistes, dont les solutions émergentes que sont les bioénergies telles que le biogaz ou les biocarburants. Ces deux voies proposent de produire des combustibles de substitution à partir de la biomasse. Pour la production d'électricité une étape supplémentaire est nécessaire qui consiste à utiliser le biocombustible pour alimenter une turbine ou une pile à combustible. Les piles à combustible microbiennes offrent une voie alternative qui multiplie le champ des possibilités en permettant l'exploitation de nombreux composés organiques qui peuvent être issus de la biomasse et ne seraient pas exploitables par les piles conventionnelles. Le principe des piles à combustible microbiennes (PCM) est fondé sur la fascinante capacité de certaines bactéries de produire des électrons à la surface d'une électrode par dégradation de matière organique. Les PCM font l'objet de nombreuses recherches depuis les années 2000. Cependant, après un fort développement des performances et des procédés, les avancées technologiques espérées ne sont pas totalement au rendez-vous. L'utilisation de PCM pour la production massive d'électricité reste illusoire en l'état actuel des connaissances. Ces systèmes pionniers ont été la source de nombreuses autres applications innovantes avec des applications envisagées dans des domaines aussi variés que les traitements d'effluents, la production d'hydrogène, les biocapteurs, la valorisation du dioxyde de carbone, l'électrosynthèse, etc.

Parmi les nouvelles voies de développement des PCM, le projet de recherche Koropokkuru soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) cherche à explorer l'idée d'énergie de récupération (*Energy harvesting* en anglais). Le concept est d'exploiter de petites quantités d'énergie facilement disponibles dans l'environnement ambiant pour assurer l'autonomie électrique d'appareils ne nécessitant que de faibles puissances. Le projet est porté par deux laboratoires : le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS) et le Laboratoire de Génie Chimique (LGC). Le projet Koropokkuru s'appuie d'un côté sur l'expertise des équipes du LAAS en termes de récupération d'énergie mais surtout en ingénierie des

microsystèmes et, de l'autre, sur le savoir-faire et les connaissances acquises depuis plus de 10 ans par le LGC sur les systèmes électrochimiques microbiens. Les recherches s'articulent autour de deux axes :

- La compréhension fondamentale des mécanismes d'électrocatalyse microbienne grâce à l'utilisation des technologies microsystèmes pour concevoir des interfaces biofilms/électrodes bien définies. Les technologies microsystèmes maîtrisées par le LAAS sont utilisées pour construire des électrodes spécifiques qui permettent des explorations fondamentales ciblées. La combinaison d'électrodes à surface micro-structurées ou de microélectrodes avec les outils de microscopie et de biologie moléculaire constitue une approche totalement originale pour l'étude des mécanismes d'électroactivité des biofilms.
- La conception d'une PCM de petite taille permettant d'assurer l'autonomie de micro-capteurs distribués à partir de l'oxydation de la matière organique présente dans les sédiments marins. L'architecture de l'anode sera conçue grâce aux technologies microsystèmes afin de forcer le développement d'une structure de biofilm optimale sur la base des connaissances créées dans l'axe précédent.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont liés au premier axe de recherche. Ils combinent des approches relatives à l'électrochimie, la microbiologie et aux bioprocédés. Le choix a été fait d'utiliser une culture pure de *Geobacter sulfurreducens* comme modèle d'étude afin de simplifier la compréhension des mécanismes fondamentaux et de s'affranchir de la variabilité apportée par l'utilisation d'une communauté microbienne multi-espèces. La mise en œuvre des anodes dans un milieu inoculé avec des sédiments marins vient dans un second temps comme travail préparatoire au second axe du projet.

Le manuscrit de thèse est organisé en six chapitres qui présentent le cheminement suivi au cours de ces travaux de recherche. Le chapitre 1 s'attache à situer ces travaux au sein de l'environnement de recherche lié aux technologies électro-microbiennes et aux interfaces biofilm/électrode. Dans un second temps, une synthèse des connaissances est réalisée sur l'influence de la topographie de la surface de l'électrode sur les interfaces biofilm/électrode. Intégré dans le chapitre, un article de revue :

- « Impact of electrode micro- and nano-scale topography on the formation and performance of microbial electrodes » soumise dans le journal *Biosensors and Bioelectronics*

met en avant la nécessité d'apporter des connaissances transversales pour progresser dans la compréhension de ces interfaces.

Le chapitre 2 présente les matériels, techniques et protocoles mis en œuvre pour les expériences décrites dans les chapitres 3 à 6.

Le chapitre 3 est consacré aux travaux qui ont conduit à choisir les matériaux d'électrodes utilisés pour la suite du projet.

Le chapitre 4 décrit l'investigation des relations entre la formation d'un biofilm électroactif et la présence de rugosité à la surface de l'électrode. Il s'appuie sur l'article :

- « Impact of surface micro-roughness on biofilm formation and current production of microbial anodes » soumis au journal *Electrochimica Acta*.

Le chapitre 5 présente les résultats obtenus avec les bioanodes formées à partir de diverses électrodes micro-structurées. La discussion des résultats s'appuie sur une approche théorique exploitant un modèle mathématique de diffusion-réaction. Les expériences réalisées avec des électrodes micro-structurées avec des réseaux de micro-piliers ont donné lieu à l'article:

- « Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches » publié dans le journal *Bioelectrochemistry*.

Les travaux ont ensuite tenté de pousser les résultats à leur limite en réalisant des électrodes poreuses puis en combinant rugosité et réseaux de micro-piliers. Les résultats sont décrits et analysés dans l'article:

- « Micro-designed microbial anodes: porosity and pattern size vs. surface roughnessTitre » à soumettre.

Le chapitre 6 prépare la suite de l'aventure scientifique en rapportant les expériences réalisées et les résultats obtenus en passant des cultures pures de *G. sulfurreducens* à un inoculum issu de sédiments marins.



# *Chapitre 1: Bibliographie*



## 1. BIOFILMS ET COMMUNAUTES BACTERIENNES VIVANT A L'INTERFACE SOLIDE/LIQUIDE

La vie en communauté et la sédentarisation des populations humaines n'a pas toujours été la norme mais depuis que l'homme a commencé à s'établir durablement dans des lieux précis, la civilisation n'a cessé de progresser. L'être humain n'est pas le seul à avoir compris qu'une vie sédentaire et communautaire présente de nombreux avantages pour résister notamment aux pressions climatiques ou aux agressions extérieures. En effet, les bactéries ont développé elles aussi un mode de vie stationnaire et une organisation collective au sein de structures pluricellulaires que sont les biofilms.

### 1.1. Histoire de la découverte des biofilms

Les micro-organismes et plus particulièrement les bactéries représentent la forme de vie majoritaire sur Terre et cependant, la découverte de leur existence n'a été que très tardive du fait de leur taille microscopique. La première observation et description de bactéries est attribuée à Antoni van Leeuwenhoek en 1680. Il est amusant de remarquer que cette observation a été faite sur des bactéries provenant du tartre présent sur les dents d'Antoni van Leeuwenhoek et donc qu'elles étaient organisées en biofilm au sein d'une plaque dentaire. En effet, bien que la première observation ait été faite sur des bactéries issues d'un biofilm, le développement de la microbiologie jusqu'aux années 1970 se fait en occultant presque totalement ce mode de vie. Jusqu'à cette date les micro-organismes étaient définis comme des êtres unicellulaires microscopiques vivant majoritairement en condition planctonique et rarement en condition sessile, c'est-à-dire en contact avec une surface. La notion de communauté microbienne présentant des interactions et une organisation commune n'est que très peu décrite durant cette période. En 1933, Arthur Henrici émet l'hypothèse que la plupart des bactéries qu'il observe se développent sous forme de communautés sessiles fixées sur les lames de verre qu'il place dans un aquarium. Ses observations seront confirmées en 1936 par Claude E. Zobell qui démontre que la présence de surfaces solides favorise la conservation et le développement de bactéries dans un milieu nutritif dilué.

L'apparition du concept de biofilm et l'essor des études sur le sujet interviennent dans les années 1970 sous l'impulsion de William Characklis et Bill Costerton. Ils sont les premiers à observer et décrire les biofilms comme un ensemble de bactéries adhérant à une surface et engluées dans une matrice dont ils s'accordent à dire qu'elle est sécrétée par les micro-organismes. En 1973, Characklis et al. démontrent que les exopolymères constituant la matrice des biofilms entraînent une résistance contre les désinfectants (Characklis, 1973a, 1973b). Par la suite, en 1978 Costerton et al. proposent un premier modèle pour expliquer la formation et la structure des biofilms et sont les premiers à introduire le terme de « biofilm » (Costerton et al., 1978). Depuis, la définition du terme biofilm a évolué au fil des études qui se sont multipliées sur le sujet mais reste basée sur deux critères descriptifs de type contextuel et morphologique. Un biofilm définit une communauté microbienne mono- ou multi-espèces fixée à une surface et dont les cellules sont maintenues entre elles par la sécrétion d'une matrice adhésive d'exopolysaccharides (EPS) qui lui confère une structure tridimensionnelle. La définition a été élargie à une population bactérienne entourée de matrice extracellulaire, qu'elle se développe

sur une surface, à l'interface entre deux milieux ou sous forme d'agrégats ou de floculats (Costerton et al., 1995). Il est maintenant communément admis que le mode de vie en biofilm est le mode de vie majoritaire pour les bactéries plutôt que la forme planctonique (Palmer et al., 2007) et que l'on retrouve des biofilms dans tous les environnements non-stériles : environnements naturels (fonds marins, rivières, sols...), organismes vivants (plantes, racines, tubes digestifs, dents...), installations industrielles (unités de production de l'agroalimentaire, tours aéroréfrigérantes, puits d'extraction de pétrole...).

## 1.2. Avantages d'une organisation en biofilm

Les biofilms sont présents dans toutes les niches écologiques et colonisent des surfaces très diverses, biotiques ou abiotiques (sols, sédiments, métaux, organes d'animaux, plantes). La phase planctonique est de plus en plus considérée comme étape transitoire vers la colonisation de nouvelles surfaces à la suite d'un mécanisme de dissémination (Watnick et Kolter, 2000; Kolter et Greenberg, 2006). Cela s'explique par les avantages qu'offre la vie dans un biofilm :

- **une protection contre les stress environnementaux** que peuvent subir les cellules : variations de pH, dessiccation, concentrations toxiques du milieu (antibiotiques, métaux lourds, biocides), variations de température, forces de cisaillement (Characklis et Cooksey, 1983; Costerton et al., 1987; Anwar et al., 1992).
- **une coopération entre des bactéries** aux besoins métaboliques différents qui mettent en place des symbioses métaboliques.
- **une augmentation des transferts horizontaux** de matériel génétique par un contact direct et prolongé inter-espèces. Ces transferts sont essentiels de l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques par exemple.
- **une modulation de l'activité cellulaire** vers des fonctions différentes. Une fois organisées en biofilm, les bactéries adaptent leur expression génétique pour optimiser leur rendement énergétique, ralentir leur croissance, exprimer une fonction précise et le tout grâce à des mécanismes de communications intercellulaires.

## 1.3. Mise en place d'un biofilm

Les progrès des techniques d'étude, aussi bien en termes de génétique que de microscopie, ont permis de construire un modèle solide décrivant le développement des biofilms. Ce modèle se compose de cinq étapes qui présentent l'évolution de la colonisation d'une surface par une communauté microbienne (Figure 1).

- **L'adhésion réversible** : des bactéries planctoniques sont amenées au contact d'une surface de façon passive (flux hydrodynamique, gravitation) ou active (mobilité dirigée vers la surface). Le rapprochement entre la surface, le plus souvent présentant un film conditionnant de molécules adsorbées, et les bactéries entraîne l'apparition de forces d'attraction physico-chimiques. Ces forces permettent la rétention des bactéries à la surface mais le processus reste réversible.

- **L'adhésion irréversible et la division bactérienne** : l'interaction avec une surface, même si elle est réversible, cause des modifications de l'expression génétique chez les bactéries. En résulte une augmentation du taux de reproduction des bactéries qui permet d'augmenter leur nombre à la surface, ainsi que la synthèse de composés membranaires ou d'appendices qui renforcent les forces d'adhésion entre les bactéries et la surface et rendent l'adhésion irréversible (Beloin et al., 2003; Schembri et al., 2003; Ren et al., 2004).
- **La croissance du biofilm** : les modifications de l'expression génétique se poursuivent lorsqu'un nombre suffisant de bactéries sont adhérentes irréversiblement à la surface. Les bactéries activent leur machinerie cellulaire pour produire de grandes quantités de polymères extracellulaires (EPS). Cette production permet la formation de micro-colonies composées de bactéries engluées dans la matrice d'EPS. Durant cette phase, le biofilm croît via la division des cellules adhérentes mais aussi par attachement de nouvelles bactéries planctoniques sur la matrice.
- **La structuration et maturation du biofilm** : les micro-colonies développent des structures tridimensionnelles (structures 3D) de natures variées. La structuration dépend des facteurs environnementaux et de la composition microbienne du biofilm, elle peut aussi être définie par les besoins des bactéries ou les fonctions qu'elles veulent exprimer. Il est possible d'observer des biofilms très denses et compacts dans lesquels les bactéries cherchent à se protéger et réduisent leur activité métabolique, comme des biofilms très épars qui permettent la circulation de nutriments et de substrats.
- **La dissémination du biofilm** : lors de la phase de maturation, ou après que le biofilm soit structuré, certaines bactéries se séparent du biofilm, retournent à l'état planctonique et vont ainsi coloniser de nouvelles surfaces, dans une phase dite de dissémination.

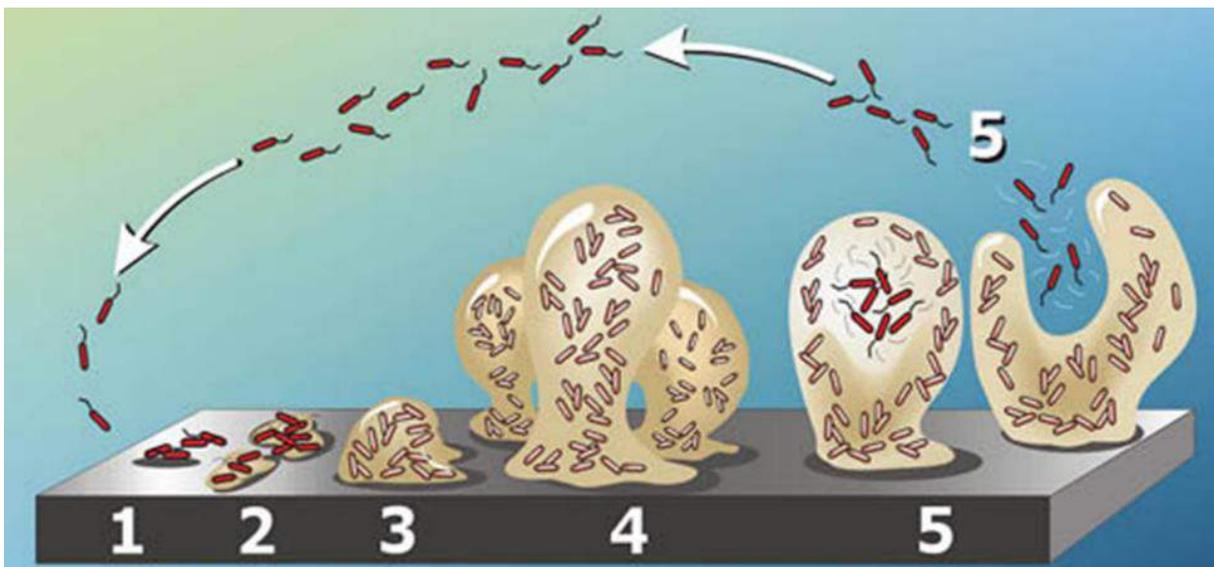


Figure 1 : Différents stades de formation du biofilm. (1) adhésion réversible, (2) adhésion irréversible et croissance des colonies, (3) croissance du biofilm et synthèse des EPS, (4) maturation et structuration du biofilm, (5) dissémination. © P.Dirckx, 2003, Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman.

#### 1.4. Structure d'un biofilm et facteurs déterminants

L'étude de la structuration des biofilms a largement bénéficié du développement des techniques d'imagerie optique. Ces différents procédés d'observation des biofilms ont permis de mettre en lumière la multitude de leurs structures. Un exemple de cette diversité d'organisation est donné sur la figure 2 qui présente des biofilms formés dans les mêmes conditions par trois souches différentes de méningocoques génétiquement modifiées. Ces souches présentent des protéines de surfaces différentes et donc forment des biofilms variables. Les propriétés architecturales communes à tous les biofilms sont, comme indiqué précédemment, la formation d'agglomérats cellulaires et la matrice extracellulaire d'EPS. Toutefois, de nombreux paramètres (protéines membranaires, hydrodynamique, nature des nutriments, nature et topographie de la surface colonisée...) influencent l'organisation spatiale de ces deux composantes au sein du biofilm et donnent naissance à des structures variées (Stanley et Lazazzera, 2004; Klausen et al., 2006).

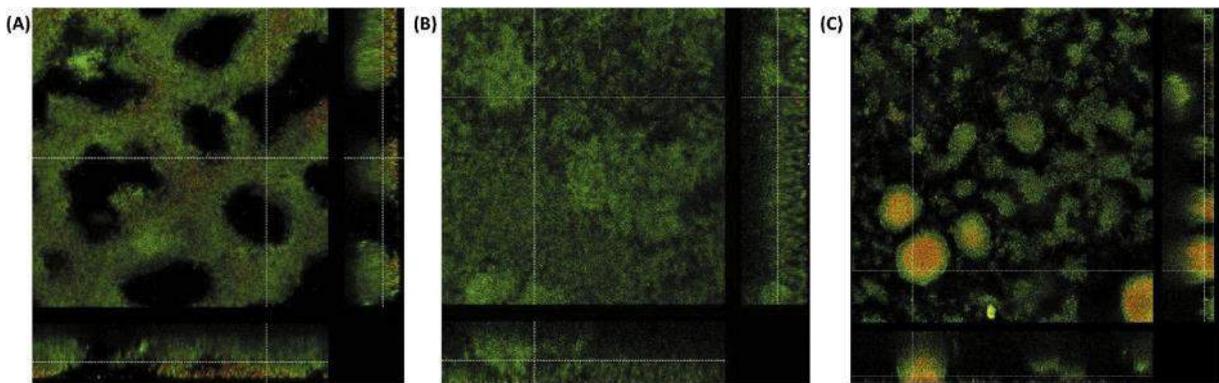


Figure 2 : Architecture de biofilms de trois souches modifiées de *Neisseria meningitidis*. Les modifications sont dues à l'inactivation de trois gènes inhibant la formation du biofilm. Les biofilms sont formés dans des conditions identiques : en 14h dans une cellule d'écoulement sur une lamelle de verre borosilicaté (Arenas et Tommassen, 2017).

Il existe ainsi dans la nature une grande variété d'organisations. On peut trouver des biofilms mono-espèces composés seulement de quelques couches de cellules qui, le plus souvent, traduisent un environnement très sélectif et relativement défavorable à la croissance bactérienne. A l'inverse, un milieu très riche et standard favorisera un biofilm pluri-espèces épais et plus diffus, c'est-à-dire comportant des espaces libres qui forment des canaux au sein du biofilm et assurent ainsi le transfert des nutriments et des métabolites (Costerton et al., 1995; Davey et O'toole, 2000). De plus, il a été démontré que la densité des biofilms matures augmente lorsque l'on se rapproche de la surface (Zhang et Bishop, 1994a, 1994b) du fait de la diminution de leur porosité. Cela a permis de mettre en évidence que les biofilms se forment dans un premier temps de manière relativement homogène en couvrant la surface. Les premières micro-colonies formées à la surface s'étendent par croissance de manière horizontale sans mettre en place de structuration. Puis, lorsque les micro-colonies se rejoignent et forment la base d'un biofilm relativement peu poreux (Klausen et al., 2003), la croissance se poursuit en épaisseur et crée alors des structures 3D avec des canaux et des excroissances microbiennes.

Une telle structure assure la circulation du fluide au sein du biofilm favorisant ainsi l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination des déchets du métabolisme (Lawrence et al., 1991).

Le biofilm mature n'est pas un milieu homogène, mais un environnement structuré dans lequel apparaissent des gradients physico-chimiques, par exemple, des gradients de concentration en oxygène ou en nutriments et des pH différents. Certains biofilms peuvent être vus comme un environnement stratifié de l'extérieur vers l'intérieur avec le plus souvent des zones centrales anaérobies et pauvres en nutriments et les strates externes riches et oxygénées (Costerton et al., 1994). Ces gradients peuvent conduire dans certains cas à une stratification écologique avec des espèces qui sont dominantes dans les couches internes et abandonnent les zones externes. Le biofilm est alors un environnement de coexistence complémentaire et organisée entre espèces bactériennes différentes. La notion de biofilm recouvre donc des formations biologiques assez différentes, qui associent haute densité bactérienne, production de matrice extracellulaire et croissance sur une surface et forment ainsi des écosystèmes complexes qu'il est souvent difficile d'étudier dans leur globalité. Pour cela, les microbiologistes se sont attachés à identifier les paramètres qui peuvent influencer le développement et la structuration d'un biofilm (Stoodley et al., 2002). Les principaux facteurs environnementaux sont :

- **La concentration en nutriments** (carbone, azote, oxygène, micronutriments ...) régule le métabolisme des bactéries et constitue donc un paramètre primordial pour le développement et la structuration d'un biofilm. Comme indiqué précédemment, la formation de canaux en son sein résulte d'un équilibre entre la croissance importante du biofilm du fait d'un milieu riche et la diffusion limitée au sein de la matrice extracellulaire, les canaux favorisant l'acheminement des nutriments.
- **L'hydrodynamique du milieu** joue un rôle primordial dans la structure et surtout l'épaisseur des biofilms. L'épaisseur d'un biofilm et sa structure plus ou moins dense résulte d'un équilibre entre la croissance et le détachement par les forces de cisaillement induites par le flux hydrodynamique. Lorsque les taux de cisaillement sont élevés, en conditions turbulentes, les biofilms sont compacts et denses, alors qu'en conditions laminaires les biofilms présentent une morphologie plus hétérogène et plus ouverte (Qi et al., 2008; Radu et al., 2010; Lemos et al., 2015). Ces deux premiers points sont d'ailleurs complémentaires car il a été montré que la diffusion des nutriments au sein du biofilm est fortement dépendante des conditions hydrodynamiques (García López et al., 2003). La formation d'un biofilm mince et dense en milieu turbulent s'accompagne d'une diffusivité interne réduite.
- **La surface colonisée** par les biofilms impacte le développement du biofilm. Les caractéristiques physicochimiques et topographiques de la surface ont un effet sur l'adhésion des bactéries au début de la phase d'organisation du biofilm (Whitehead et al., 2005). Les propriétés de surfaces entraînent en outre des variations dans la maturation du biofilm et peuvent donc impacter sa structure (Teughels et al., 2006).
- **La diversité des communautés microbiennes** qui participent à la formation d'un biofilm influence directement sa structure. Comme décrit précédemment le biofilm crée une stratification et la diversité des communautés microbiennes qui le constituent en permettant ou en empêchant la colonisation de certaines de ces strates est susceptible de modifier

l'architecture du biofilm (Figure 3). D'autre part, cette diversité peut induire des mécanismes d'interactions, notamment de compétition qui contribuent à déliter le biofilm ou à réduire fortement sa croissance (Kreft et Wimpenny, 2001).

- **La température** influence la croissance et l'efficacité du métabolisme cellulaire. Des biofilms qui se forment dans des conditions non optimales de température auront tendance à rester peu développés (Donlan et al., 1994). Il semble même y avoir une restructuration saisonnière des biofilms du fait principalement de la baisse de température pour les biofilms environnementaux.

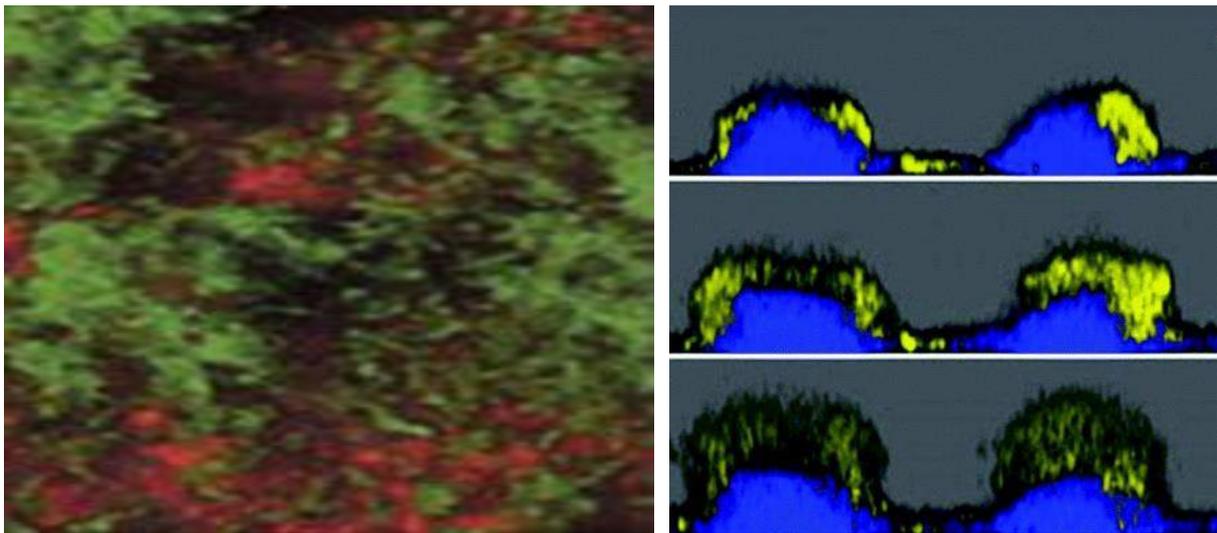


Figure 3 : Exemples de structuration d'un biofilm observé en épifluorescence. A gauche biofilm composé d'*Acinetobacter sp* (rouge) et *Pseudomonas putida* (vert) montrant la stratification du biofilm avec *Pseudomonas putida* englobant les colonies d'*Acinetobacter sp* (Hansen et al., 2007). A droite un biofilm composé de deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* dont l'une (bleu) possède la capacité de former des pili et l'autre (jaune) ne possède pas de pili. On observe une coopération entre les deux espèces, celle qui possède des appendices favorables à la rétention sur une surface forme la base du biofilm (bleu) et l'autre contribue à l'expansion et la structuration 3D du biofilm (jaune) (Klausen et al., 2003).

L'étude des facteurs influençant la formation des biofilms, a mis en évidence que l'organisation sous forme de biofilm permet aux bactéries de tirer un maximum de profit de l'environnement dans lequel elles évoluent. C'est en adaptant leur comportement aux contraintes environnementales qu'elles ont développé des stratégies alternatives de colonisation. De la même façon que l'implantation et la croissance de communautés humaines furent dictées par des facteurs environnementaux tels que le relief, le climat, l'accessibilité des ressources, et des facteurs communautaires en termes d'échanges et de rivalités, la formation d'un biofilm présente des similitudes par les interactions que peuvent avoir les communautés microbiennes entre elles et avec leur environnement, en termes de contraintes et d'adaptabilité. Pourrait-on voir dans la formation d'un biofilm un processus accéléré similaire à l'organisation géographique humaine au cours de l'histoire ?

## 2. ELECTROACTIVITE DES MICRO-ORGANISMES

L'électrochimie microbienne est une discipline qui cherche à comprendre et optimiser les interactions existant entre certaines bactéries et une électrode. Ces interactions reposent sur une capacité spécifique de ces bactéries dites électroactives. En l'état actuel des connaissances, une centaine d'espèces sont décrites comme électroactives, c'est-à-dire présentant la capacité de coupler leur activité métabolique à un flux d'électrons dirigé vers ou provenant d'une électrode via un transfert extracellulaire d'électrons. Ces micro-organismes sont donc des catalyseurs de réactions d'oxydo-réduction au niveau d'une surface. Cependant la diversité existant au sein de ces espèces amène à penser que l'électroactivité pourrait être une caractéristique assez répandue au sein du règne bactérien. Les transferts électroniques peuvent faire intervenir des cellules planctoniques aussi bien que des biofilms microbiens et ont été étudiés dans une grande variété de configurations allant de systèmes à grande échelle en environnement naturel impliquant des communautés très complexes jusqu'à des études centrées sur les interactions moléculaires et l'analyse à l'échelle unicellulaire.

### 2.1. Historique de la découverte des capacités électroactives

Il est couramment dit que la première observation d'activité électrochimique de micro-organismes remonte aux travaux de M.C. Potter au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Potter, 1911). A cette époque l'étude de l'électrophysiologie se développait avec les plantes, mettant en évidence l'existence d'un couplage entre les processus physiologiques et l'existence de courant au sein des plantes. M.C. Potter a cherché à détecter des interactions électriques mises en jeu lors de la fermentation en utilisant des levures *Saccharomyces cerevisiae* et des bactéries *Escherichia coli*. Deux électrodes sont placées dans des compartiments séparés par une membrane poreuse et remplis d'une solution nutritive. La solution contenant les levures ou les bactéries ainsi que du glucose est introduite dans l'un des deux compartiments et l'apparition d'une différence de potentiel est observée du compartiment contenant les levures vers l'autre (Figure 4).

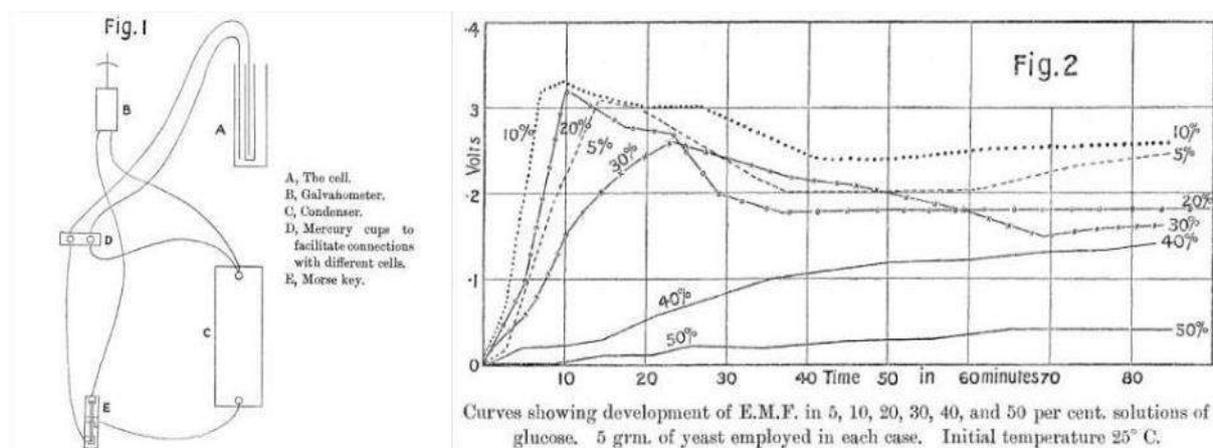


Figure 4 : Schéma de montage de la première "cellule électrochimique microbienne" et courbes de potentiels mesurés avec des levures *Saccharomyces cerevisiae* (Potter, 1911).

Le concept d'électroactivité des bactéries ne sera que peu étudié durant les années qui suivent. En 1931, B. Cohen réussit à atteindre une tension de 35 volts en reproduisant les expériences de Potter avec des demi-piles microbiennes branchées en série (Cohen, 1931) puis en 1964, R. Berk et J. Canfield mirent au point ce que l'on considère comme la première pile à combustible microbienne (Berk et Canfield, 1964). Toutefois, ces expériences ne font que constater la collecte d'électricité sans investiguer plus avant les mécanismes cellulaires. Durant la même période, des études mettaient en lumière l'importance des réactions d'oxydo-réduction et des potentiels associés en bactériologie (Wurmser, 1930; Hewitt, 1948; Clark, 1960). Ce n'est qu'à l'approche des années 1980 que les deux domaines convergent et l'intérêt pour les bactéries électroactives devient alors grandissant. Ces propriétés sont envisagées comme pouvant être utilisées pour augmenter les rendements de production bactérienne de certains composés (Hongo et Iwahara, 1979), pour la production d'énergie électrique dans des piles à combustible (Karube et al., 1977), ou encore pour la détection de polluants grâce à des biocapteurs (Rawson et al., 1989). La découverte de H. Bennetto et son équipe portant sur l'augmentation de l'efficacité de certains biosystèmes après l'ajout d'un médiateur électrochimique (Bennetto et al., 1981) marque le début d'un engouement pour les piles microbiennes. Enfin dans les années 2000, avec la mise en évidence de la possibilité de transfert direct des électrons entre les bactéries et les électrodes (Bond et al., 2002) le fonctionnement complexe de ces systèmes devient un sujet d'étude qui connaît une évolution exponentielle de l'intérêt de la communauté scientifique (Figure 5).

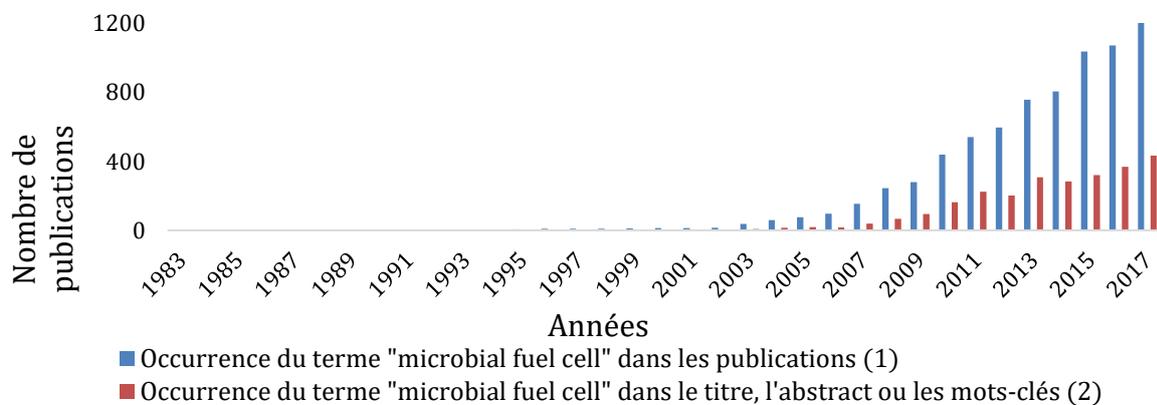


Figure 5 : Evolution du nombre de publications sur le thème des PCM (1) contenant l'expression « microbial fuel cell » au sein de l'article (source : Web of Sciences au 05/03/2018) et (2) dans le titre, le résumé et/ou les mots-clés (source : Sciencedirect au 05/03/2018).

## 2.2. Principes généraux de l'électroactivité des micro-organismes

Comme indiqué précédemment, les systèmes électrochimiques microbiens sont des dispositifs similaires aux systèmes électrochimiques classiques mais utilisant l'action catalytique des micro-organismes. Il existe des micro-organismes qui produisent des électrons via l'oxydation de matière organique et se déchargent de ces électrons sur une surface anodique et d'autres qui captent les électrons fournis par une surface cathodique afin de réduire un oxydant du milieu. Les différents mécanismes de transferts sont décrits dans la section 4.

Pour ce qui concerne le transfert d'électrons vers les anodes, les propriétés catalytiques des micro-organismes reposent le plus souvent sur le métabolisme respiratoire des cellules (Bond et al., 2002; Bond et Lovley, 2003). La molécule source d'énergie des réactions chimiques du métabolisme est l'adénosine triphosphate (ATP). Sa synthèse suppose des transferts d'électrons au sein de la cellule via de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Pour assurer ce processus respiratoire (Figure 6), la cellule capte des électrons provenant d'une molécule donneuse d'électrons dont le potentiel d'oxydo-réduction est le plus bas possible. Ces électrons à haut potentiel alimentent une cascade de réactions métaboliques qui permettent de récupérer de l'énergie sous forme d'ATP. A l'issue de la chaîne de réactions, la cellule doit évacuer les électrons de basse énergie en réduisant un accepteur final externe. Lors de la respiration aérobie l'accepteur final est l'oxygène (Figure 6.A). Elle est fortement privilégiée par rapport aux autres modes de respiration (respiration des sulfates, nitrates, oxydes métalliques...) car le potentiel d'oxydo-réduction du couple accepteur final d'électrons  $O_2/H_2O$  est très élevé et permet donc une récupération importante d'énergie par les cellules. Dans un système bio-électrochimique les accepteurs ou les donneurs d'électrons sont respectivement remplacés par l'anode (Figure 6.B) ou la cathode. Pour les réactions anodiques, il faut travailler en condition anaérobie afin que les micro-organismes ne se tournent pas spontanément vers la réduction de l' $O_2$  et soient forcés de transférer les électrons à l'anode.

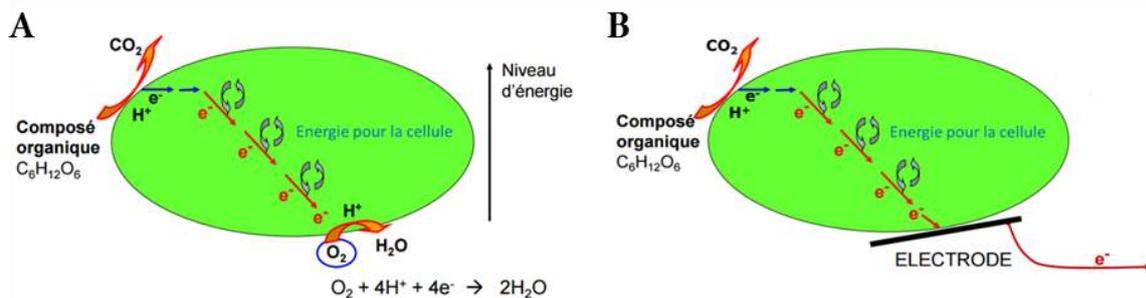


Figure 6: Schéma du couplage entre métabolisme bactérien et transfert d'électrons à l'anode (D'après Bergel, 2012)

### 2.3. Applications des systèmes électromicrobiens

De nombreux systèmes innovants mettant en jeu des micro-organismes électroactifs ont été développés. La plupart sont basés sur le concept pionnier de pile à combustible microbienne (PCM) qui constitue une sorte de système de référence en électrochimie microbienne (Schröder et al., 2015). Au niveau de l'anode d'une PCM le donneur d'électrons, le plus souvent de la matière organique provenant d'effluents ou de l'acétate, est oxydé par des bactéries électroactives qui produisent du dioxyde de carbone, des protons et des électrons transmis à l'anode. Ces électrons sont transférés par le circuit électrique à la cathode où un accepteur d'électrons, le plus souvent l'oxygène, est réduit (Cheng et Logan, 2007; Venkata Mohan et al., 2007, 2008a, 2008b).

Les PCM sédimentaires ou benthiques font partie des piles microbiennes les plus étudiées (Reimers et al., 2001; Logan et al., 2015). Une anode est enfouie dans les sédiments et la cathode est placée dans l'eau au-dessus des sédiments. Ces systèmes utilisent les communautés bactériennes des sédiments et leur charge en matière organique pour produire des électrons à l'anode. La cathode réduit l'oxygène dissous contenu dans l'eau. La production de courant ainsi obtenue dans des rivières, des lacs ou dans l'océan a permis d'alimenter des équipements de mesure (Tender et al., 2002; Erable et al., 2013; Krieg et al., 2014; Reimers et al., 2017). Les PCM sont capables de produire de l'énergie à partir d'une grande variété de substrats tels que les déchets organiques complexes, les eaux usées, la biomasse, des effluents industriels ....

Une application largement étudiée vise le traitement des eaux usées. Il existe une vraie problématique de réduction des coûts associés aux systèmes d'aération et de gestion des boues dans les stations d'épuration. En effet, l'énergie consommée pour l'aération des bassins représente jusqu'à 50% des coûts totaux de ces installations (Wei et al., 2003; Aelterman et al., 2006). Les eaux usées contiennent de fortes concentrations en matière organique qui représente une source d'énergie convertible via les PCM de l'ordre de 10 fois l'énergie consommée pour leur traitement (Lovley, 2006). Ceci explique le nombre considérable de travaux réalisés pour développer des PCM utilisant les eaux usées à l'échelle de laboratoire (Aelterman et al., 2006; Ahn et Logan, 2010; Capodaglio et al., 2013) et à l'échelle pilote (Borjas et al., 2015). Les PCM offrent une variété de possibilités à des fins de dépollution d'effluents ou d'environnement naturels. Dans le secteur des eaux usées, la capacité des PCM à dénitrifier les effluents a été mise en évidence (Gregory et al., 2004). Certaines espèces de *Geobacter* qui se développent sur la cathode sont capables de capter les électrons afin de réduire les nitrates en nitrites. En associant une telle biocathode à une bioanode qui oxyde la matière organique il est donc possible de concevoir une PCM qui assure l'abattement de la matière organique, la production d'énergie électrique et la dénitrification (Clauwaert et al., 2007; Cucu et al., 2016). La bio-électroremédiation s'avère aussi efficace pour le traitement de sols pollués (Franks et Nevin, 2010). A l'anode, des bactéries sont capables d'oxyder des polluants tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Morris et Jin, 2012; Rodrigo et al., 2014; Sherafatmand et Ng, 2015), des phénols (L. Huang et al., 2011), des composés organiques chlorés (Chun et al., 2013) ou encore des herbicides (Rodrigo Quejigo et al., 2016). Toujours dans un but de dépollution, les PCM sont utilisées pour la récupération d'ions métalliques. Cette fois, l'activité catalytique des bactéries favorise la réduction de certains ions métalliques à la cathode entraînant parfois leur dépôt ou leur fixation par des bactéries cathodiques. Ces systèmes permettraient donc de dépolluer mais également de récupérer certains métaux.

Proposée en 2005 simultanément par deux équipes de recherche, l'une des Etats-Unis (Liu et al., 2005) l'autre des Pays-Bas (Rozendal et Buisman, 2005), la possibilité de développer des électrolyseurs microbiens a été mise en avant. Dans ce cas, de l'énergie électrique est fournie au système afin de provoquer des réactions qui ne sont pas thermodynamiquement spontanées. Il est ainsi possible de coupler une anode microbienne à une cathode qui réalise la réduction de l'eau en hydrogène. Il a été couramment démontré, qu'en appliquant un potentiel externe entre l'anode et la cathode, plus de 90% des électrons provenant de l'oxydation microbienne de l'acétate à l'anode sont transformés en hydrogène à la cathode (Liu et al., 2005; Logan et Regan, 2006; Kundu et al., 2013). L'activité catalytique des micro-organismes permet de réduire d'un

ordre de grandeur le potentiel externe à appliquer par rapport à une cellule d'électrolyse de l'eau classique. Ces systèmes sont appelés des cellules d'électrolyse microbienne (CEM) et sont considérés comme une nouvelle approche prometteuse pour la production d'hydrogène à partir de matière organique (Kapdan et Kargi, 2006; Kadier et al., 2016).

Les cellules d'électrolyse microbiennes permettent de produire d'autres composés que de l'hydrogène (Rabaey et Rozendal, 2010; Rabaey et al., 2011). Lorsque la cathode est en contact avec certaines communautés microbiennes, celles-ci sont capables d'utiliser l'hydrogène produit pour former d'autres composés. Dans certains cas, il est supposé que les micro-organismes collectent directement les électrons de la cathode pour synthétiser des molécules d'intérêt. Les CEM ont été envisagées pour la production d'acétate (Marshall et al., 2013), de méthane (Cheng et al., 2009), de 2-oxobutyrate (Nevin et al., 2010), de glycérol (Soussan et al., 2013a) ou encore de butyrate (Ganigué et al., 2015). On parle alors de cellules d'électrosynthèse microbienne. La variété des produits cathodiques synthétisés par ces systèmes en font une voie très intéressante qui permettrait de traiter un effluent à l'anode et de synthétiser un produit d'intérêt à la cathode (Bridier et al., 2015; Bouchez et al., 2016). A titre d'exemple, c'était l'objectif du projet ANR-Investissement « BIOelectrosynthèse pour le RAffinage des déchets REsiduels » (Biorare, ANR-10-BTBR-02, <https://biorare.irstea.fr>) dans le cadre duquel j'ai effectué mon stage de fin d'études d'école d'ingénieur avant de m'engager dans la préparation du doctorat. Le développement de ces systèmes représente une des applications les plus prometteuses au sein des technologies d'électrochimie microbienne (Sadhukhan et al., 2016).

Les PCM ont également ouvert la voie à la conception de capteurs électromicrobiens. Dans ce cas, l'objectif est de détecter un signal électrique en présence de certains composés, dont l'intensité est si possible corrélée à la concentration du/des composé(s) visé(s). Dans les environnements de stations d'épuration, de tels biocapteurs ont déjà été développés avec succès pour la détection et la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) (Peixoto et al., 2011; Zhang et Angelidaki, 2011), de l'acétate (Li et al., 2011; Estevez-Canales et al., 2015), du glucose (Kumlanghan et al., 2007), du pH (Uria et al., 2016) ainsi que de composés toxiques (Davila et al., 2011; Lee et al., 2015).

Les possibilités offertes par les systèmes électrochimiques microbiens sont encore à investiguer et la découverte de nouvelles applications, parallèlement au développement des connaissances sur les organismes impliqués dans ces systèmes, ouvre de larges horizons à ces technologies (Zhang et Angelidaki, 2014; Jafary et al., 2015).

## 2.4. Les micro-organismes électroactifs

La diversité des écosystèmes étudiés dans le cadre de l'électrochimie microbienne traduit la profusion de bactéries capables d'effectuer des transferts d'électrons extracellulaires avec des électrodes. De nombreux environnements ont été identifiés comme abritant des bactéries électroactives, dont les boues de stations d'épuration (Kim et al., 2004; Liu et al., 2004; Rabaey et al., 2004; Min et al., 2005; Sun et al., 2008; Torres et al., 2009; Lu et al., 2009; Fornero et al., 2010; Ketep et al., 2013; Blanchet et al., 2015a), les sédiments marins ou lacustres (Reimers et al., 2001; Bond et al., 2002; Tender et al., 2002; Holmes et al., 2004; Erable et al., 2009b, 2010; Rousseau et al., 2013) ou encore les sols (Parot et al., 2008; D.-Y. Huang et al., 2011;

Dunaj et al., 2012; Futamata et al., 2013; Oliot et al., 2017). Les bactéries électroactives ne sont pas parmi les espèces majoritaires de ces environnements mais leur proportion augmente au contact d'une électrode (Hou et al., 2011; Wang et al., 2015).

A l'état naturel, les écosystèmes susceptibles d'abriter des bactéries électroactives sont nombreux. Il a même été suspecté que tous les écosystèmes sont susceptibles d'en contenir (Chabert et al., 2015) Les environnements aquatiques font partie des sources les plus étudiées. On retrouve des communautés d'eau douce dans les zones lacustres (Karra et al., 2014) et des biofilms de rivières ont permis de produire des densités de courant intéressantes (Lyautey et al., 2011). En descendant au fil de l'eau, on rencontre les consortia microbiens d'environnement côtiers, dans lesquels il a été mis en évidence des activités électroactives notamment dans des sédiments de mangrove (Salvin et al., 2012), de marais salants (Rousseau et al., 2013), et de rivages (Erable et Bergel, 2009). Enfin, des sédiments marins plus profonds abritent aussi de fortes communautés électroactives (Reimers et al., 2006). La variété de communautés testées issues d'environnements aquatiques suggère que de nombreux organismes électroactifs y sont présents et qu'ils représentent une source importante pour les recherches à venir sur l'identification de nouvelles souches.

Les environnements marins présentent un intérêt applicatif important pour le déploiement de PCM. En effet, ils abritent des consortia de bactéries qui supportent bien les milieux très salins offrant de fortes conceptions ioniques. Ceci est un atout majeur pour réduire la résistance interne (chute ohmique) de ces dispositifs. En ce qui concerne les zones côtières, l'avantage est le plus souvent dans la quantité importante de matière organique présente dans les sédiments qui constitue un apport en substrat combiné à l'apport en micro-organismes qui servent d'inoculum.

Au sein des niches naturelles, les sols constituent des milieux riches en nutriments et en matière organique et, en corollaire, riches en micro-organismes. Ils représentent donc un environnement propice à la présence de micro-organismes électroactifs et commencent à être de plus en plus étudiés (Huang et al., 2011; Cercado Quezada et al., 2013). Les études se concentrent sur les composts (Parot et al., 2008; Mocali et al., 2013) très riches en matière organique et donc en flore bactérienne, les sols anaérobies (Miceli et al., 2012) dans lesquels l'absence d'oxygène favorise le développement de bactéries électroactives et les sols riches en oxydes métalliques (Miceli et al., 2012) qui sont de bons accepteurs d'électrons.

Des environnements extrêmes font aussi partie des inocula choisis dans le but d'identifier des bactéries électroactives. Ils permettent de diversifier les conditions opératoires et peuvent ainsi apporter des voies d'optimisation nouvelles qui permettent de s'affranchir de contraintes de culture telles que le pH classiquement compris entre 6 et 8 ou les températures autour de 30°C. Dans des environnements acides, en particulier des eaux résiduelles de sites miniers, comme par exemple l'écosystème du Rio Tinto en Espagne, il a été mis en évidence la présence de bactéries électroactives vivant à des pH très bas, de l'ordre de 2 à 3 (García-Muñoz et al., 2011; Sulonen et al., 2015). Des communautés thermophiles vivant à 60°C ont été identifiées comme électroactives (Mathis et al., 2008; Martins et al., 2010).

Les milieux les plus étudiés restent les effluents du fait de leur forte concentration en bactéries et en matière organique ainsi que des applications de dépollution envisagées. De

nombreuses études se focalisent sur l'exploitation de déchets organiques ou d'eaux usées pour la production d'énergie couplée à l'assainissement des effluents car les bactéries électroactives permettent de réduire de façon importante le taux de matière organique de ces résidus (Zhou et al., 2013). De nombreux effluents ont été testés comme des eaux usées domestiques (Yu et al., 2011; Escapa et al., 2015), des boues de stations d'épurations (Ishii et al., 2013; Mansoorian et al., 2013) ainsi que des effluents industriels de l'industrie papetière ou agroalimentaire (Kaewkannetra et al., 2011; Velasquez-Orta et al., 2011; Durruty et al., 2012). L'utilisation de ces effluents vient sans doute autant de leur accessibilité aisée que de la nécessité de les traiter.

De nombreuses communautés microbiennes ont été testées dans des systèmes électromicrobiens permettant d'isoler de nombreuses bactéries électroactives. La comparaison de cultures pures par rapport aux cultures mixtes dont elles proviennent a le plus souvent montré que les consortia bactériens permettent d'obtenir des densités de courant plus élevées (Nevin et al., 2008; Sydow et al., 2014). Pourtant, de nombreux travaux concernent des bactéries électroactives en culture pure afin de simplifier les interactions et ainsi pouvoir plus facilement identifier et expliquer les phénomènes fondamentaux.

La question de l'origine écologique des bactéries électroactives a fait l'objet d'articles visant à recenser les bactéries identifiées comme électroactives et les environnements dont elles sont issues (Chabert et al., 2015; Koch et Harnisch, 2016). Les deux études concluent qu'il n'existe pas de niche écologique spécifique aux micro-organismes électroactifs mais qu'on les retrouve dans des environnements très variables, ce qui ouvrent la possibilité de nombreuses découvertes d'espèces et de nouveaux mécanismes de transfert. De plus, les bactéries électroactives connues à ce jour n'appartiennent pas à une taxonomie particulière. On les retrouve dans une très grande variété de classes de bactéries comme le montre le graphique de Koch et Harnisch, 2016 (Figure 7). Le graphique indique en outre que les classes d'appartenance des bactéries électroactives ne déterminent pas les mécanismes mis en œuvre par les bactéries ou l'électrode avec laquelle elles interagissent. L'électroactivité est donc une capacité très répandue et diversifiée au sein du règne bactérien. Il semble que la capacité d'une bactérie à utiliser des oxydes métalliques comme accepteurs finaux d'électrons soit un indice du potentiel électroactif d'une espèce. Certaines familles bactériennes ont été identifiées comme présentant de nombreuses espèces utilisant des oxydes métalliques, en particulier les *Geobacteraceae* et les *Shewanellaceae*. Elles sont donc rapidement devenues des familles de prédilection pour les études d'électrochimie microbienne.

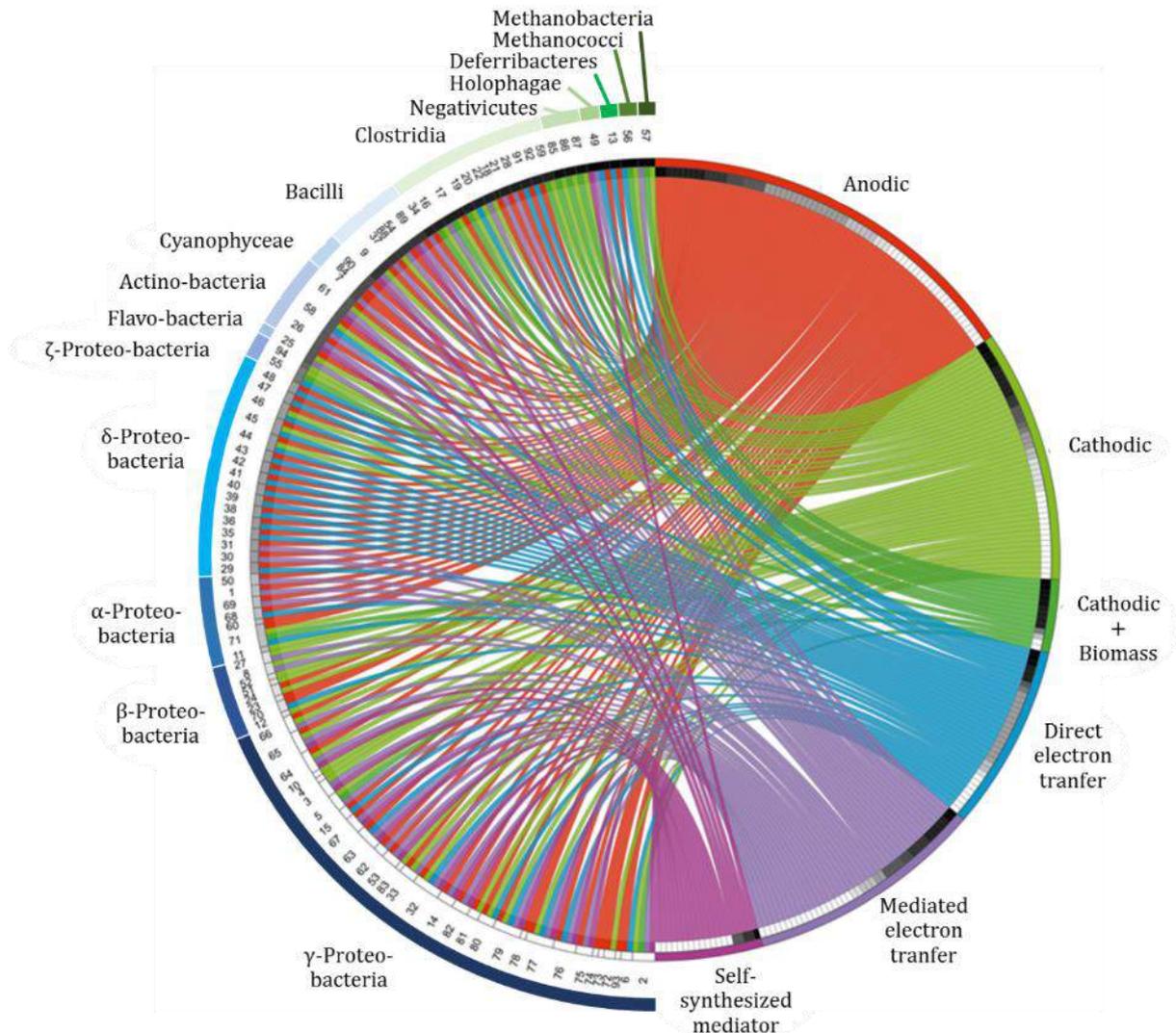


Figure 7 : Représentation de la diversité taxonomique des bactéries électroactives et des mécanismes d'expression de l'électroactivité. Le demi-cercle de gauche répertorie les espèces identifiées comme électroactives et les regroupe selon leur classe. Le demi-cercle de droite présente les mécanismes de transferts mis en jeu et les électrodes impliquées. Les deux demi-cercles sont reliés en associant l'espèce aux électrodes avec lesquelles elle interagit et le type de transfert effectué (Koch et Harnisch, 2016).

### 3. GEOBACTER SULFURREDUCTENS : ORGANISME MODELE

Depuis plus d'une dizaine d'années, une partie des études sur l'électrochimie microbienne s'est concentrée sur les cultures pures. Comme précisé dans la section 2.4, les cultures pures ne présentent pas les meilleurs résultats en termes de conversion mais répondent à un besoin de simplification des systèmes afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes de transferts électroniques extracellulaires et, si possible les améliorer sur la base des connaissances acquises. Nous traiterons des avancées réalisées et des mécanismes décryptés en section 4.

Parmi les delta-proteobacteria, le premier micro-organisme chez qui l'utilisation d'oxydes de fer comme accepteurs finaux d'électrons a été mis en évidence appartient à la famille des *Geobacteraceae* (Lovley et al., 1987). Dans les environnements favorables à la réduction du

fer, les espèces microbiennes les plus abondantes sont du genre *Geobacter* (Rooney-Varga et al., 1999; Stein et al., 2001; Roling et al., 2001; Anderson et al., 2003; Islam et Singhal, 2004; Holmes et al., 2007; Hori et al., 2010; Kerkhof et al., 2011). Les espèces de la famille des *Geobacteraceae* ont été identifiées dans des environnements sédimentaires très divers, dans des digesteurs de méthanisation (Lovley et al., 2011) et semblent être très présentes dans tous les milieux anaérobies comme l'intestin des ruminants (Guzman et al., 2015) ou même partiellement anaérobies comme les eaux usées (Aguirre-Sierra et al., 2016). Plus de 20 espèces de *Geobacter* ont été identifiées et sont maintenant disponibles grâce à des méthodes simples d'isolement et de culture. Ce sont des bactéries à Gram-négatif en forme de bâtonnet. Elles possèdent les voies métaboliques permettant d'oxyder de petits acides organiques, tels que l'acétate, et d'utiliser différents accepteurs finaux d'électrons ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{U}^{6+}$ , substances humiques ... (Lovley et al., 1996)). Elles peuvent aussi utiliser l'éthanol ou l'hydrogène comme donneur d'électrons. La capacité des *Geobacter* à oxyder l'acétate, élément central de la dégradation anaérobie de la matière organique, et à réduire des oxydes ferreux en font un maillon important au sein des communautés microbiennes des sédiments et sols (Lovley et Chapelle, 1995).

L'espèce *Geobacter metallireducens* a longtemps été l'organisme le plus étudié de la famille des *Geobacteraceae* pour une éventuelle utilisation en bioremédiation. Dans le domaine de l'électrochimie microbienne, une autre espèce, *Geobacter sulfurreducens*, est devenue l'organisme de référence. Cette bactérie a été isolée pour la première fois en 1994 dans l'état de l'Oklahoma à partir de sédiments de surface prélevés dans un fossé contaminé par des hydrocarbures (Caccavo et al., 1994). La bactérie à gram-négatif, en forme de bâtonnet et présentant un métabolisme non fermentaire, est indexée dans les collections, sous la référence souche PCA. Elle a été décrite comme une bactérie anaérobie même s'il a été mis en évidence plus tard qu'elle était aussi capable d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons à des concentrations faibles (Lin et al., 2004). Le milieu de croissance de *G. sulfurreducens* comprend de l'acétate ou de l'hydrogène comme donneur d'électrons et un accepteur d'électrons parmi l'oxyde de fer III, l'hydroxyde de fer III, le citrate de fer III, le soufre élémentaire, le Co (III)-EDTA, le fumarate ou le malate. Elle fait partie des rares bactéries disponibles en culture pure réduisant les métaux. La possibilité de la cultiver en laboratoire en milieu liquide en présence de fumarate en fait un organisme de choix pour les études fondamentales. Ces caractéristiques ont permis d'obtenir un séquençage complet du génome (Methe et al., 2003), de mettre en évidence le système génétique de l'espèce (Coppi et al., 2001) et d'établir des modèles métaboliques (Mahadevan et al., 2006; Segura et al., 2008; Scheibe et al., 2009; Butler et al., 2010; Mahadevan et al., 2011; Butler et al., 2012). Elle a été également cultivée en culture continue en chemostat (Esteve-Nunez et al., 2005), ce qui permet d'obtenir une physiologie reproductible, paramètre clé pour les analyses transcriptomiques (Holmes et al., 2006) et protéomiques (Ding et al., 2006). La connaissance profonde de la souche en termes de génome, de métabolisme et de physiologie associée à la présence de *Geobacter spp* dans un nombre important de communautés microbiennes électroactives ont fait de *Geobacter sulfurreducens* PCA un organisme modèle privilégié pour l'étude des transferts d'électrons extracellulaires.

## 4. MECANISMES DE TRANSFERTS ELECTRONIQUES

Plusieurs mécanismes de transferts d'électrons entre micro-organismes et électrode ont été mis en évidence (Figure 8), principalement dans les cas des bioanodes (Schröder, 2007). Ils sont généralement classés en deux groupes : les transferts indirects et directs. Le premier mécanisme décrit est un mécanisme de type indirect mettant en jeu des métabolites sécrétés par la cellule (Karube et al., 1977). Les bases du transfert direct ont été posées par B.H. Kim qui a démontré la nécessité de la formation d'un biofilm à la surface des électrodes (Kim et al., 1999).

### 4.1. Transfert indirect

Les mécanismes de transfert indirect font appel à des médiateurs extracellulaires qui peuvent être exogènes ou endogènes. Ces médiateurs servent de navette de transport d'électrons entre la cellule et la surface de l'électrode (Figure 8.A). Les médiateurs exogènes sont des molécules présentes dans le milieu, le plus souvent ajoutées par l'expérimentateur, alors que les médiateurs endogènes sont synthétisés par la cellule pour pallier l'absence d'accepteurs d'électrons solubles. Indépendamment de la nature endogène ou exogène des médiateurs, il existe deux types de mécanismes de transfert électronique avec ces navettes électroniques :

- Si le médiateur possède les propriétés physico-chimiques lui permettant de traverser la membrane lipidique, il est réduit au sein de la cellule puis relargué dans le milieu pour diffuser jusqu'à l'anode et s'y oxyder.
- Si le médiateur ne peut pas pénétrer dans la cellule, il reste dans le milieu et sa réduction s'effectue via des composés membranaires (le plus souvent des cytochromes).

Un grand nombre de composés exogènes ont été testés tels que des phénazines, phénothiazines, phénoxazines, flavines, l'AQDS (anthraquinone-2,6-disulfonate), le rouge neutre ou encore les quinones (Lovley, 2006). Cependant, les médiateurs exogènes présentent de nombreux inconvénients comme leur courte durée de vie, leur toxicité et leur coût élevé.

Les médiateurs endogènes ne présentent pas ces inconvénients mais la cinétique de réaction à l'anode et une faible vitesse de diffusion au sein du milieu, combinée à une concentration peu élevée, peut limiter leur efficacité (Okamoto et al., 2014; Yong et al., 2014; Qiao et al., 2017). De nombreuses bactéries comme *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas aeruginosa* sont capables de produire leur propre médiateur. La pyocyanine et la 2-amino-3-dicarboxy-1,4-naphtaquinone (ACNQ) ont été identifiés parmi les médiateurs électrochimiques endogènes (Hernandez et Newman, 2001). Par exemple la pyocyanine (un pigment) a été identifiée comme responsable de l'activité électrochimique de *P. aeruginosa* (Rabaey et al., 2004). Pour *S. oneidensis*, la production d'un médiateur de type quinone (ACNQ), permet d'augmenter par un facteur 2 la densité de puissance d'une PCM par rapport à une PCM sans le médiateur (Freguia et al., 2010). Le transfert indirect d'électrons peut également s'effectuer via l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien. L'hydrogène est pressenti comme une de ces navettes électroniques à la cathode, où il est produit, par électrolyse de l'eau et permet la conversion de CO<sub>2</sub> en acétate par exemple (Rosenbaum et al., 2011; Blanchet et al., 2015b). D'autres études présentent l'hydrogène produit par fermentation bactérienne comme une navette oxydée à la surface de l'anode (Niessen et al., 2006).

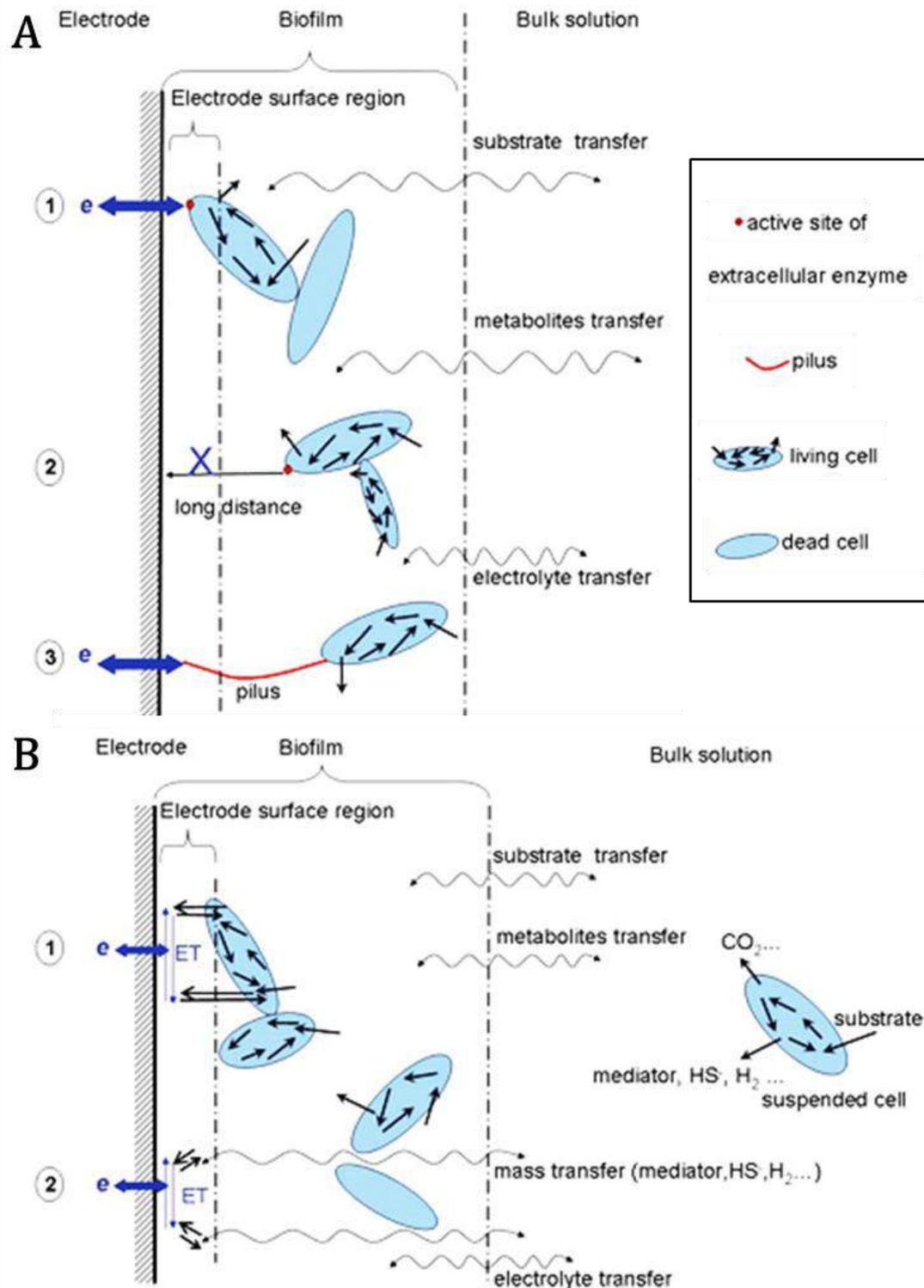


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents transferts d'électrons micro-organisme/anode. (A) Avec médiateurs, le transfert s'effectue (1) par diffusion au sein du biofilm lorsque les bactéries sont adhérentes ou (2) par diffusion depuis le milieu lorsque les bactéries sont planctoniques. (B) Sans médiateur, le transfert s'effectue (1) directement via des cytochromes à la surface de la membrane cellulaire mais (2) est impossible lorsque la cellule est trop loin de l'électrode. Certaines cellules développent donc (3) des pili afin de se connecter à l'électrode (Zhao et al., 2009).

Les bactéries électroactives mettant en place des transferts indirects d'électrons via des médiateurs peuvent être planctoniques ou sessiles (Figure 8.A). La formation d'un biofilm à la surface favorise les transferts dans le cas de médiateurs endogènes. En effet, le biofilm permet d'augmenter la concentration locale en médiateur et de réduire la distance de diffusion. Les bactéries assurent ainsi une efficacité de transfert plus élevée et un renouvellement plus rapide des médiateurs.

#### 4.2. Transfert direct

Initialement les cellules étaient considérées comme incapables d'effectuer des transferts d'électrons sans la présence de médiateurs. Les membranes cellulaires sont constituées de molécules isolantes, principalement des phospholipides. Toutefois, la croissance de certaines bactéries à la surface de particules d'oxyde de fer ou de manganèse a mis en évidence la présence d'interactions directes entre les cellules et ces solides (Lovley et Phillips, 1988; Myers et Nealson, 1988; Beveridge et al., 1996; Nealson et Little, 1997) via des protéines transmembranaires, les cytochromes de type c. Des expériences de caractérisation biochimique et de mutagenèse sur *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* ont démontré que les cytochromes de type c facilitent l'interaction entre les bactéries et les oxydes métalliques en formant une chaîne de transfert d'électrons au-travers de la membrane cellulaire (Seeliger et al., 1998; Lloyd et al., 2003; Shi et al., 2006; Wigginton et al., 2007). L'ensemble de ces transferts (Figure 8.B) a été principalement décrit pour les réactions anodiques et il semblerait que les transferts à la cathode fassent appel à des mécanismes différents mais soient principalement des transferts directs (Dumas et al., 2008a; Rabaey et Rozendal, 2010).

Toutefois, ce mécanisme exige un contact entre l'électrode et les cytochromes situés sur la membrane externe de la cellule, si bien que seule la première couche de cellules peut utiliser l'électrode pour évacuer les électrons. Gorby et al. (2006) ont observé la présence de extensions appelées pili entre *Shewanella oneidensis* et une surface conductrice (Figure 9). Il a été démontré que certaines bactéries étaient capables de développer ces longues extensions conductrices de leur membrane afin d'établir un contact avec l'électrode bien qu'elles ne fassent pas partie de la première couche de cellules du biofilm directement en contact avec l'électrode (Reguera et al., 2005). La conductivité de ces pili a été confirmée en utilisant des nano-électrodes d'or qui ont permis de mesurer une vitesse de transfert de  $10^9$  électrons. $s^{-1}$  pour une différence de potentiel de 100mV (El-Naggar et al., 2010). Deux mécanismes sont aujourd'hui proposés pour expliquer les transferts d'électrons le long des pili (Malvankar et al., 2011, 2015; Snider et al., 2012) :

- la délocalisation d'électrons par conjugaison d'acides aminés,
- des sauts électroniques entre cytochromes placés le long des pili.

Certaines bactéries ne produisant pas de pili ont pourtant la capacité de former des biofilms épais et conducteurs. Un mécanisme de transfert a donc été proposé dans lequel les micro-organismes sont capables d'échanger des électrons via leur cytochromes respectifs. Une chaîne électronique se met alors en place au sein du biofilm depuis les cellules les plus éloignées de la surface vers celles en contact avec l'électrode.

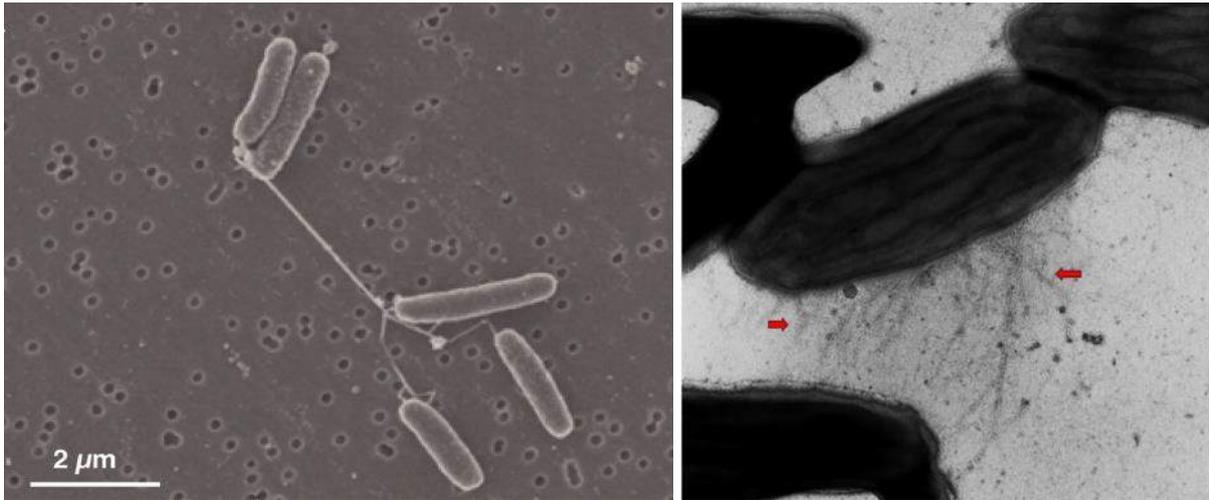


Figure 9: Observation de (A) *Shewanella oneidensis* (Gorby et al., 2006) et (B) *Geobacter sulfurreducens* (Reguera et al., 2005) : présence de pili à la surface d'une électrode.

## 5. LA BIOANODE : MATERIAUX ET ARCHITECTURE

L'électrode est un composant déterminant dans l'efficacité des transferts d'électrons avec les biofilms microbiens. Le choix du matériau d'électrode fait partie des challenges les plus importants dans l'optimisation d'un procédé électro-microbien et a donc fait l'objet d'un nombre très important d'études, abondamment reprises dans des revues bibliographiques (Wei et al., 2011; Guo et al., 2015; Sonawane et al., 2017). Afin de constituer une bonne bioanode, le matériau choisi doit présenter un bon compromis entre plusieurs critères : être un bon conducteur électrique, être stable chimiquement et mécaniquement, être peu coûteux et être biocompatible (Morozan et al., 2007; Zhou et al., 2011). Les matériaux répondant le mieux possible à ces critères sont relativement nombreux : le carbone et ses dérivés, les métaux et plus récemment les céramiques (Winfield et al., 2016).

### 5.1. Les bioanodes en carbone

Les électrodes à base de carbone sont très largement utilisées dans les systèmes électrochimiques microbiens du fait de leur forte biocompatibilité associée à une bonne conductivité et des coûts de production faibles (Wei et al., 2011; ElMekawy et al., 2017; Li et al., 2017). De plus, le carbone étant facilement modelable, de nombreuses configurations et structures 3D ont pu être testées avec ce matériau.

La forme la plus intéressante pour les applications électro-microbiennes est certainement le graphite. En effet, cet allotrope du carbone présente une forte conductivité ainsi qu'une très bonne stabilité mécanique et chimique. De nombreuses formes de graphite ont été employées comme anodes dans les systèmes électrochimiques microbiens : tiges, feutres, tissus, mousses ou encore brosses. Il est souvent recherché de maximiser la surface des électrodes en utilisant des structures 3D très poreuses. Par exemple, une tige et un feutre de graphite testés dans les mêmes conditions en présence de *Rhodospirillum rubrum* ont mis en évidence l'avantage que présentait le feutre en terme de surface disponible (200 cm<sup>2</sup> contre 65 cm<sup>2</sup>) et donc de

croissance du biofilm par rapport à la tige (Chaudhuri et Lovley, 2003). Des brosses de graphite sont souvent utilisées dans le même objectif (Logan et al., 2007; Xu et al., 2018).

D'autres formes de carbone moins conductrices que le graphite sont aussi largement utilisées. On retrouve du papier, du tissu, des grilles et des feutres qui constituent des électrodes à faible coût (Aelterman et al., 2008; Mishra et al., 2017; Chouler et al., 2018). Des électrodes en carbone provenant de la pyrolyse de carton ondulé (Chen et al., 2012b) ou de matières organiques présentant des structures 3D poreuses telles que la peau de pamplemousse (Chen et al., 2012a) ou des champignons (Karthikeyan et al., 2015) ont montré des performances très intéressantes du fait de la forte surface disponible.

Cependant, les électrodes en carbone sont limitées en termes de conductivité, largement inférieure à celle des métaux. La conductivité spécifique du graphite, forme la plus conductrice du carbone, est entre  $3.10^4$  à  $1.10^5$  S/m alors que celle du cuivre atteint  $58.10^6$  S/m. Cette résistance élevée du carbone, au sein d'un système électrochimique microbien, entraîne des pertes en termes de puissance délivrée dès que la surface de l'anode est importante (Oh et Logan, 2006).

## 5.2. Les bioanodes métalliques

L'utilisation d'anodes métalliques a été envisagée pour augmenter les performances des systèmes électro-microbiens (Baudler et al., 2015). L'or et parfois le platine, ont été mis en œuvre surtout pour des études fondamentales (Pocaznoi et al., 2012b; Snider et al., 2012; Kuzume et al., 2013). L'or assure une bonne biocompatibilité et la formation de bioanodes performantes. Les premières études rapportent des densités de courant respectivement de 0,3 et 0,6 A/m<sup>2</sup> sur de l'or plan (Richter et al., 2008; Siu et Chiao, 2008) mais 11 A/m<sup>2</sup> ont été obtenus plus récemment (Baudler et al., 2015) et une étude a démontré des densités de courant de 16 A/m<sup>2</sup> pour des microélectrodes d'or (Liu et al., 2010). Toutefois, le coût élevé de ce métal empêche d'envisager son utilisation pour des systèmes à grande échelle. Pour d'éventuelles extrapolations possibles, l'acier inoxydable a été testé pour ses propriétés de tenue à la corrosion mais aussi sa plasticité pour un façonnage mécanique aisée (Pocaznoi et al., 2012a; Hindatu et al., 2017). Comme le carbone, l'acier est assez facile à structurer et des mousses d'acier ont par exemple été testées (Ketep et al., 2014) et ont produit des densités de courant de 80 A/m<sup>2</sup>, plus de 2 fois supérieures aux 33 A/m<sup>2</sup> du tissu de carbone mis en œuvre dans les mêmes conditions. Toutefois, la couche de passivation présente à la surface des aciers inoxydables peut ajouter une résistance significative aux transferts d'électrons, ce qui entraîne une perte d'efficacité de l'acier en comparaison avec le graphite (Dumas et al., 2008b). Le titane présente des performances moindres que celles de l'acier (ter Heijne et al., 2008). Notons que ce dernier résultat n'est pas surprenant dans la mesure où le titane est connu pour ne pas être un matériau d'anode pertinent car il se recouvre d'un d'oxyde non-conducteur.

Certains métaux ont été longtemps écartés du fait de leurs propriétés antimicrobiennes. L'activité antimicrobienne d'un métal provient de la libération d'ions métalliques dans le milieu mais la plupart des espèces électroactives, spécialement les Geobacteraceae, sont tolérantes à cet effet antimicrobien des ions métalliques (Kargi et Eker, 2007; Patil et al., 2010). De plus, les potentiels utilisés pour la mise en œuvre des anodes microbiennes sont relativement bas, le

plus souvent de l'ordre de ou inférieurs à 0 V/ESH ce qui les protège de l'oxydation anodique qui provoquerait la production d'ions en solution. L'utilisation de métaux tels que le cuivre, l'argent ou le nickel pour former des bioanodes est prometteuse (Baudler et al., 2015). Ils assurent des densités de courant élevées (Cuivre : 15,1 A/m<sup>2</sup> ; Argent : 11,1 A/m<sup>2</sup> ; Nickel : 3,8 A/m<sup>2</sup> ; Graphite : 9,8 A/m<sup>2</sup>) et n'ont pas démontré d'effet toxique envers les bactéries.

### 5.3. Modifications de surface et nouveaux matériaux d'anode

Les premières voies d'optimisation ont tenté de coupler les propriétés de biocompatibilité du carbone et les propriétés conductrices des métaux (Antolini, 2015). Ainsi, des modifications aussi simples que le dépôt de graphène sur des électrodes d'acier ont permis d'augmenter par 200 la production de courant par rapport à l'acier seul pour arriver à 6 A/m<sup>2</sup> (Hou et al., 2014).

Depuis une dizaine d'années, les nanotubes de carbone sont de plus en plus souvent utilisés pour modifier la surface des électrodes et cette stratégie concerne une grande partie des études actuelles (Mustakeem, 2015; Yazdi et al., 2016). Ils présentent des caractéristiques très intéressantes en termes de conductivité électrique, de stabilité chimique, de biocompatibilité (Correa-Duarte et al., 2004), de propriétés catalytiques et offrent la possibilité d'une large surface spécifique pour l'accrochage du biofilm (Iijima, 1991). Des densités de courant de l'ordre de 0,8 A.m<sup>2</sup> ont ainsi été obtenues, soit 8 fois plus élevées que pour l'électrode non modifiée (Mink et Hussain, 2013). De bonnes performances au niveau des transferts de charges entre les atomes de carbone et les pili ont été observées par Erbay et al. (2015). Les succès obtenus ont sans doute contribué à la diversification des études vers les modifications de surface avec des nanoparticules (Wen et al., 2013; Mehdinia et al., 2014) et des polymères (Sun et al., 2010; Nguyen et Yoon, 2016). Ces méthodes qui relèvent de la modification de la physico-chimie de la surface sont traitées dans la section 6.1.

Les céramiques ont été introduites comme matériau d'électrode dans le domaine de l'électrochimie microbienne par une application marginale : une pile à combustible exploitant une micro-algue photosynthétique (Thorne et al., 2011). Bien que les densités de courant restent faibles, de l'ordre de 0,13 A/m<sup>2</sup> l'électrode en céramique s'est montrée 16 fois plus efficace qu'une électrode de carbone. Des électrodes céramiques mises en œuvre dans des PCM (Hidalgo et al., 2014; Jadhav et al., 2015) ont donné des résultats prometteurs (densités de courant respectivement de l'ordre de 0,94 et 0,59 A/m<sup>2</sup>). Les céramiques sont présentées comme une alternative plausible aux autres matériaux d'électrodes qui permettent une structuration facile des anodes. De plus, il est possible d'incorporer au sein de matériaux céramiques des nanoparticules conductrices ou autres composants qui favoriseraient la formation de biofilms électroactifs (Massazza et al., 2015).

### 5.4. Architecture des bioanodes

Des études comparatives sur différents matériaux d'électrode carbonés ont permis de conclure que la géométrie de la surface a une importance plus grande que la nature du matériau carboné (Rimboud et al., 2014). Certains travaux s'intéressent à l'optimisation de l'architecture des bioanodes via l'utilisation de structures 3D. Les avantages d'une électrode tridimensionnelle résident dans l'augmentation de la surface active qui accroît la surface offerte à la colonisation par le biofilm et donc la surface de transfert.

Les premières observations qui ont orienté la recherche vers des structures 3D ont été réalisées avec des électrodes en carbone. L'utilisation de brosses de carbone a permis d'augmenter la puissance d'une PCM de 600 mW/m<sup>2</sup> à 1430 mW/m<sup>2</sup> par rapport à du papier de carbone (Logan et al., 2007). De la même manière, le feutre de carbone améliore les densités de courant par rapport aux structures de carbone planes (Aelterman et al., 2008; Sleutels et al., 2009). L'intérêt d'une structure d'électrode 3D a été démontré avec des structures poreuses de différentes tailles : des électrodes en fibres de carbone non-tissées présentant des pores de quelques micromètres ont produit 30 A/m<sup>2</sup> (Chen et al., 2011), de la mousse d'acier avec des pores entre 200 et 800 µm a atteint 80 A/m<sup>2</sup> (Ketep et al., 2014) de même que du feutre de carbone avec des pores variant de 20 à 200 µm (Rousseau et al., 2013).

Ces différentes études ont conduit à identifier la taille des pores comme un paramètre primordial dans l'optimisation des structures 3D des électrodes microbiennes. En effet, l'augmentation de la surface active permise par une structure 3D peut être compensée par la limitation des transferts de matière et donc une réduction des performances du biofilm (Chen et al., 2012a). Cet effet a été mis en évidence pour des pores entre 20 et 60 µm de diamètre et semble ne plus apparaître pour des porosités de l'ordre de 300 à 500 µm. De plus, la structure 3D d'une électrode peut impliquer des changements dans les voies de transport des électrons au sein de la structure ainsi qu'imposer la mise en place d'un collecteur de courant susceptibles de limiter les performances (Zhou et al., 2011; Rousseau et al., 2015). Enfin les structures tridimensionnelles ont été identifiées comme des causes d'augmentation de la chute ohmique (Aelterman et al., 2008). Certaines études visent donc à optimiser la structure des électrodes 3D par des modélisations multidimensionnelles des géométries (Picioreanu et al., 2010; Merkey et Chopp, 2012). Les meilleures performances obtenues jusqu'à présent proviennent d'une étude de Chen et al., (2012b) dans laquelle un assemblage de 6 couches de carton ondulé a été pyrolysé afin d'obtenir une électrode de carbone. Cette bioanode a permis d'atteindre des densités de courant de 390 A/m<sup>2</sup>, valeur exprimée par rapport à la surface projetée de l'électrode.

Il est donc nécessaire de trouver le bon compromis entre les différents paramètres de structure tridimensionnelle, le choix du matériau et l'utilisation souhaitée de l'électrode afin d'obtenir les performances électrochimiques optimales de la part des micro-organismes adhérents. Le développement des études sur les matériaux et les structures permet de mieux comprendre les interactions entre micro-organismes et électrodes dans différents systèmes électrochimiques microbiens et apportent de bons éléments pour le choix de l'anode. Cependant il est encore possible d'améliorer les électrodes et d'augmenter les connaissances générales sur les bioanodes.

## **6. LA BIOANODE : IMPORTANCE DES CARACTERISTIQUES DE SURFACE**

### **6.1. Physico-chimie de la surface**

En parallèle des nombreuses études réalisées sur les matériaux et les architectures d'électrodes pour l'utilisation en bioanodes, de nombreux travaux ont souligné l'importance de l'interface micro-organismes/surface, c'est-à-dire la physico-chimie et la topographie de la

surface (Lowy et al., 2006; Liu et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007; Scott et al., 2007; Kumar et al., 2013; Du et al., 2014; Guo et al., 2015).

Des études théoriques se sont focalisées sur l'interface biofilm/électrode du point de vue de la physico-chimie de surface (Zhao et al., 2009; Guo et al., 2015) en s'appuyant sur les connaissances existantes en microbiologie sur les interactions entre les surfaces et les bactéries. En parallèle, de nombreuses équipes se sont essayées à la modification de la chimie de surface de l'électrode dans le but d'augmenter la colonisation ou la vitesse du transfert électronique (Erable et al., 2009a; Picot et al., 2011; Lapinsonnière et al., 2013; Zhao et al., 2013; Ding et al., 2015; Li et al., 2017).

L'hydrophilie/hydrophobie d'une surface est un paramètre très important dans les premières phases d'adhésion et dans la constitution d'un biofilm. Il a été démontré que l'hydrophilie d'une surface d'électrode permettait de réduire le temps de démarrage d'une PCM (Santoro et al., 2014) en utilisant des électrodes en carbone contenant différentes quantités de PTFE à leur surface afin d'augmenter leur hydrophobicité. L'hydrophilie est souvent discuté comme un des paramètres impactés par une modification de surface mais pas forcément ciblé comme le paramètre à étudier. Ainsi dans cette étude, l'addition de polyaniline et de nanotubes de carbone sur du graphite a permis d'augmenter de 343% les performances de l'anode grâce entre autre à une meilleure colonisation de la surface (Cui et al., 2015). La colonisation accrue est expliquée par la transformation de cette surface hydrophobe en surface hydrophile mais également par la meilleure conductivité. Selon une étude récente de Du et al. (2017), l'augmentation de l'hydrophilie de la surface pourrait avoir un effet sur la sélectivité microbienne de l'anode. En utilisant de la polydopamine pour augmenter l'hydrophilie de leurs électrodes, ils ont observé une réduction du temps de formation des bioanodes mais aussi une plus grande sélectivité de *Proteobacteria* et de *Firmicutes* au niveau des espèces microbiennes qui constituent le biofilm. L'hydrophobicité de la surface de l'électrode semble donc impacter la colonisation de l'électrode en termes de quantité de biomasse et de sélectivité des communautés microbiennes.

En couplant cet effet avec une modification de la charge de surface grâce à la fonctionnalisation de la surface par des sels de diazonium, Guo et al., 2013, ont démontré que la charge de surface avait aussi un impact positif sur la sélectivité de l'anode et sur sa conductivité, favorisant ainsi la formation de biofilms électroactifs plus performants. Dans une autre étude, des sels de diazonium ont été utilisés pour augmenter la densité de charge de surface de 16,5 à 200 mC/cm<sup>2</sup> (Picot et al., 2011). Ce travail a montré que l'apport de charges positives à la surface avait un effet bénéfique alors que les charges négatives avaient un effet néfaste principalement du fait des interactions électrostatiques avec les bactéries chargées négativement. Un effet de compatibilité physico-chimique nécessaire entre les molécules fonctionnalisées et les cytochromes a aussi été mis en évidence. Ces observations ont été confirmées par l'étude de monocouches auto-assemblées sur des électrodes (Santoro et al., 2015).

Le traitement de la surface de l'électrode avec de l'acide nitrique, du nitrate d'ammonium ou du sulfate d'ammonium a permis d'augmenter la quantité d'azote, de soufre et d'oxygène, de réduire la résistance des anodes et donc de favoriser la formation plus rapide d'un biofilm plus épais résultant en une production de courant plus élevée (Li et al., 2014). La

fonctionnalisation avec des groupes amides par un procédé simple oxydation électrochimique, a également favorisé l'adsorption bactérienne (Liu et al., 2014). L'ajout de groupes fonctionnels azotés semble être la voie préférentielle utilisée pour la fonctionnalisation mais la quantité optimale de composés azotés à ajouter n'est pas encore déterminée. Saito et al ont montré qu'un rapport de C/N de 0,7 est plus efficace que n'importe quel rapport supérieur, suggérant ainsi que la quantité de fonctions azotées à apporter sur la surface est limitée (Saito et al., 2011). Enfin la fonctionnalisation des surfaces avec des médiateurs redox a été tentée (Pan et Zhou, 2015) mais n'a démontré un effet positif que dans le cas où les biofilms mettent en œuvre des transferts indirects d'électrons.

Les modifications de surface ont révélé des impacts notables sur la production de courant des anodes microbiennes, sur les espèces microbiennes qui sont sélectionnées au sein du biofilm et sur les temps de latence au démarrage des systèmes. Cependant les techniques et composés utilisés pour ces modifications sont dans la plupart des cas chers et peu durables (Guo et al., 2015). Les modifications ayant montré une amélioration des performances sans avoir recours à des procédés trop coûteux et complexes sont les traitements à haute température sous atmosphère contrôlée qui ont permis de fonctionnaliser les surfaces par des composés simples.

## **6.2. Topographie de la surface**

La section suivante est rédigée sous forme d'une revue soumise dans *Biosensors and Bioelectronics*. L'objectif est de regrouper les connaissances de domaines disciplinaires variés et les études traitant de ce sujet dans les systèmes électromicrobiens afin d'extraire quand cela est possible des règles générales sur l'impact de la topographie sur l'interface biofilm/électrode.

## Impact of electrode micro- and nano-scale topography on the formation and performance of microbial electrodes

Pierre Champigneux, Marie-Line Délia, Alain Bergel

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

Accepted in Biosensors and Bioelectronics in April 2018

### Abstract

From a fundamental standpoint, microbial electrochemistry is unravelling a thrilling link between life and materials. Technically, it may be the source of a large number of new processes such as microbial fuel cells for powering remote sensors, autonomous sensors, microbial electrolyzers and equipment for effluent treatment. Microbial electron transfers are also involved in many natural processes such as biocorrosion. In this context, a huge number of studies have dealt with the impact of electrode materials, coatings and surface functionalizations but very few have focused on the effect of the surface topography, although it has often been pointed out as a key parameter impacting the performance of electroactive biofilms.

The first part of the review recalls some basics of the effect of surface topography on bacterial adhesion and biofilm formation, in a broad domain reaching beyond the context of electroactivity. The second part gives an overview of the influence of electrode topography on abiotic electrochemical reactions. On these well-established bases, the effect of surface topography is reviewed and analysed in the field of electroactive biofilms. General trends are extracted and fundamental questions are pointed out, which should be addressed to boost future research endeavours. The objective is to provide basic guidelines useful to the widest possible range of research communities so that they can exploit surface topography as a powerful lever to improve, or to mitigate, the performance of electrode/biofilm interfaces.

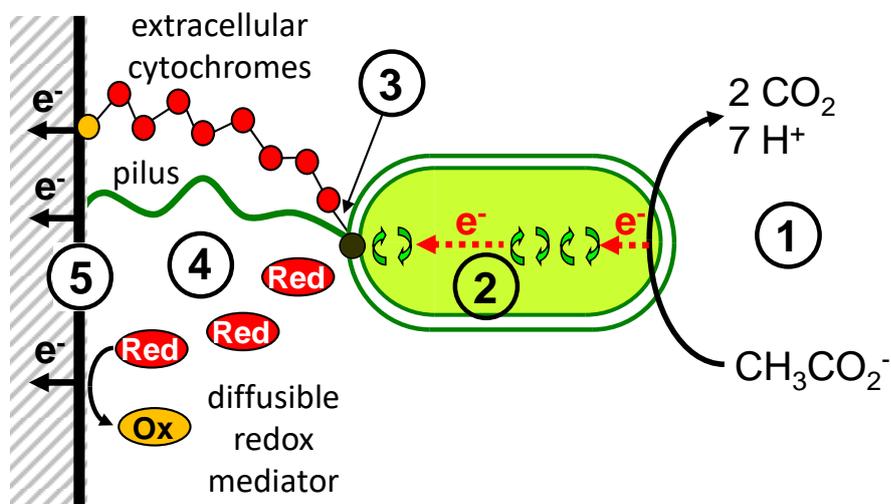
**Keywords:** Electroactive biofilm; Roughness; Microbial anode; Microbial fuel cell; Microbial electrochemical technology; Bioelectrochemical system.

### 1. Introduction

A huge number of bacteria have revealed their capability to perform extracellular electron transfer with electrodes (Logan and Regan, 2006; Koch and Harnisch, 2016). Two main strains, *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003; Lovley et al., 2011) and *Shewanella oneidensis* (Ringeisen et al., 2006; Fredrickson et al., 2008) have been widely used as model organisms for basic investigations, because of their early discovery as electroactive strains and their high performance. In addition, *G. sulfurreducens* has the capability to achieve both anodic and cathodic electron transfers (Bond and Lovley, 2003; Dumas et al., 2008a; Soussan et al., 2013). However, multi-species microbial communities are most often used as the inoculum when the objective is to design microbial anodes to be implemented in microbial electrochemical processes. Environmental samples coming from

marine or lake sediments (Reimers et al., 2001; Girguis et al., 2010; Zabihallahpoor et al., 2015; Grattieri and Minteer, 2018), wastewater, sludge from treatment plants (Fornero et al., 2010; Kokko et al., 2018), and soils (Cercado Quezada et al., 2013; Doyle and Marsili, 2015) have been particularly used as multi-species inocula and many others can be implemented (Chabert et al., 2015).

The majority of studies have been devoted to microbial anodes (Pham et al., 2009; Wagner et al., 2010; Kumar et al., 2013; Lu et al., 2015). Microorganisms oxidize organic compounds to sustain their metabolism and the resulting low energy electrons are released to the electrode through the biofilm (Figure 1). A smaller number of studies have dealt with microbial cathodes, mainly for oxygen reduction (Bergel et al., 2005) and, more recently, CO<sub>2</sub> reduction (Rabaey et al., 2011; ElMekawy et al., 2016; Bajracharya et al., 2017).



*Figure 1: Scheme of electron transfer mechanism through an electroactive anodic biofilm, adapted from (Strycharz et al., 2011). 1) Diffusion of the substrate to and of the products from the microbial cells, 2) metabolic redox reactions, 3) electron transfer from the cell to extracellular redox compound, 4) electron transport through the biofilm matrix, 5) electron transfer to the electrode surface.*

Microbial electrodes have been considered as the possible source of a large number of new processes (Wang and Ren, 2013; Schröder et al., 2015; Bajracharya et al., 2016). Some exaggeratedly enthusiastic forecasts about the future of microbial electrochemical technologies are open to question (Blanchet et al., 2015; Oliot et al., 2016) but microbial electrodes should, nevertheless, be at the core of many innovative applications, provided that suitable objectives are chosen. For instance, microbial fuel cells may be appropriate energy production systems when low power is sufficient (Shleev et al., 2015), such as for powering remote sensors (Dewan et al., 2014) and designing autonomous sensors (Di Lorenzo et al., 2009; Pasternak et al., 2017). Simplifying the equipment to design low-cost devices that do not require attendance, such as the electro-microbial snorkel (Erable et al., 2011; Matturro et al., 2017), or focusing on specific environments, such as hypersaline media (Rousseau et al., 2013; Carmona-Martinez et al., 2015; Grattieri and Minteer, 2018) may also open up promising horizons. Furthermore, microbial electrodes have led to fundamental discoveries on the

electrochemical link between living organisms and materials (Borole et al., 2011; Shi et al., 2016; Kumar et al., 2017), which may be involved in many natural processes, such as anaerobic digestion (Kato et al., 2012; Liu et al., 2012) and microbially influenced corrosion (Beech and Sunner, 2004; Mehanna et al., 2009a; Kip and van Veen, 2015).

Very many studies have focused on electrode materials and coatings (Liu et al., 2007; Wei et al., 2011; Guo et al., 2013; Santoro et al., 2015; Xie et al., 2015). Actually, the biofilm/electrode interface has been widely investigated from the standpoint of surface chemistry (Lowy et al., 2006; Rosenbaum et al., 2007; Scott et al., 2007; Kumar et al., 2013; Du et al., 2014), with many attempts at surface functionalization (Erable et al., 2009a; Picot et al., 2011; Lapinsonnière et al., 2013; Zhao et al., 2013; Ding et al., 2015; Li et al., 2017). Surprisingly, the topography of the biofilm/electrode interface has rarely been at the heart of the studies, although it has often been pointed out as a key parameter for the efficiency of microbial electrodes (Peng et al., 2010; Sun et al., 2010; Fan et al., 2011; Pons et al., 2011; Pocaznoi et al., 2012a). To the best of our knowledge, the studies dealing with the impact of the electrode topography on electroactive biofilms have never been reviewed so far. Such a review is the purpose of the present article, with the objective of trying to extract general guidelines and suggesting, if relevant, useful directions for future research.

The first part of the present article recalls the basics concerning the effect of surface topography on bacterial adhesion and biofilm formation. It gives an overview of the overall knowledge that has been established in a general field, out of the context of electroactivity. The second part deals with the impact of electrode topography on abiotic electrochemical reactions, i.e. in the absence of microbially-related phenomena. On these two well-established bases, the studies that deal with surface topography in the field of electroactive biofilms are then reviewed and analysed.

One objective is to see whether general trends can be extracted and whether or not they follow the knowledge previously established for non-electroactive biofilms and in the field of abiotic electrochemistry. Secondly, this cross-cutting analysis points to exciting questions that should be addressed in order to encourage future research endeavours in the most relevant directions. Among various suggestions, the main conclusion that should be kept in mind is the necessity to take the considerable effect of surface topography into better consideration when analysing any experimental data related to electron transfer at biofilm/electrode interfaces in the future.

We hope that this review will offer useful guidelines for exploiting surface topography as a lever to improve the performance of electroactive biofilms. Furthermore, even though the main current trend is towards the design of electroactive biofilms for microbial electrochemical processes, it should not be forgotten that the same interfaces can be at the heart of microbially influenced corrosion. In this field, the same fundamental knowledge is similarly relevant to fight against corrosion by mitigating interfacial electron transfers. In both cases, this review article has been written with the objective of giving the widest possible range of research communities some helpful information for further basic and technological thinking.

## **2. Basics of surface topography**

### **2.1. Macro-, micro- and nano-roughness**

Each surface, even the smoothest one, contains irregularities, which can occur at macro-, micro- and nano-scale. This review focuses the micro- and nano-scale surface topography, because this is the range of sizes that can impact the mechanisms of bacterial adhesion, biofilm formation and electron transfer reactions. The surface waviness, also referred as macro-roughness, is not taken into account in this review article. Actually, it may affect the global performance of microbial electrochemical systems, by modifying the surface area that is available for microbial colonization, but it is not thought to influence the mechanisms of electroactive biofilm formation and operation.

## 2.2. Characterization of surface topography: $R_a$ is not perfect but is useful

Any surface is perturbed by asperities and valleys at micrometer and nanometre scales. The surface roughness profile is commonly characterized by the arithmetic mean roughness value ( $R_a$ ) measured along a line.  $R_a$  is defined as the average absolute deviation of the roughness irregularities from the mean line (Table 1). For example, this means that a surface with  $R_a$  of 1  $\mu\text{m}$  presents peaks and valleys 1  $\mu\text{m}$  above and 1  $\mu\text{m}$  below the mean line on average. Since it is one of the easiest to measure,  $R_a$  has become a standard parameter. Nevertheless, it depicts the surface topography only vaguely (Donoso et al., 2007), since various surface profiles can present the same  $R_a$  value (Table 1). A large variety of parameters have been described in the literature to better characterize surface topography according to the field of study (Bharat Bhushan, 2000; Stout, 2000; Webb et al., 2012).

Several parameters have been based on the roughness profile (Table 1), i.e. the roughness along a line:

- skewness ( $R_{sk}$ ), which measures the symmetry between peaks and valleys,
- kurtosis ( $R_{ku}$ ), which measures the sharpness of surface,
- root mean square surface roughness ( $R_q$ ),
- maximum peak to valley height ( $R_t$  or  $R_{max}$ ),
- maximum peak height ( $R_p$ ),
- maximum valley depth ( $R_v$ ),
- average peak to valley height ( $R_z$ ),
- average peak-to-mean height ( $R_{pm}$ ),
- and mean width of the roughness elements ( $RS_m$ ).

Other parameters have been based on an analysis of the two-dimensional roughness, instead of the roughness profile along a line. The so-called spatial parameters are: root mean square area roughness ( $S_q$ ), summit density ( $S_{ds}$ ), developed area ratio ( $S_{dr}$ ), ten-point average roughness ( $S_z$ ), skewness ( $S_{sk}$ ), texture aspect ratio ( $S_{tr}$ ) and bearing ratio ( $t_p$ ) as proposed by Crawford et al. (2012).

The ( $S_i$ ) parameters based on surface analysis result in better characterization of the surface shape and organization than those based on the analysis of one-dimensional roughness profiles ( $R_i$ ). However, spatial parameters are more complex to determine and require specific analytical equipment. They have consequently been largely less implemented than the parameters based on profile roughness, among which  $R_a$  is almost always used.

## 3. Impact of surface topography on electrochemical reactions

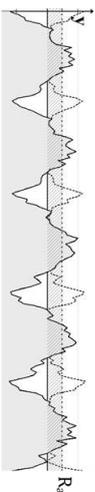
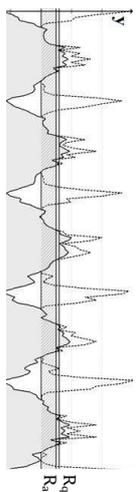
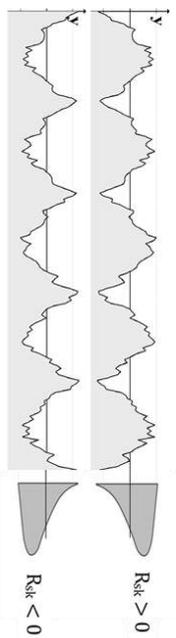
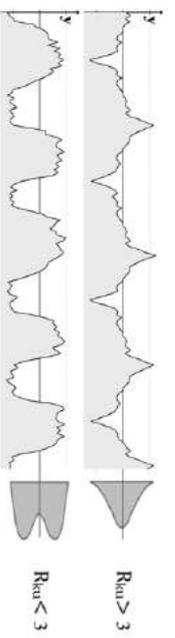
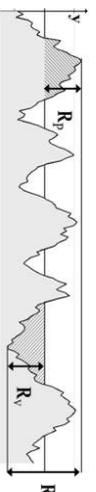
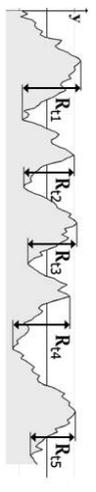
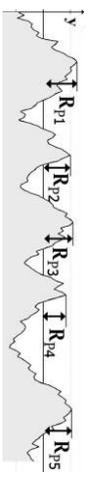
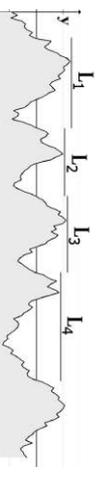
### 3.1. Micro-roughness and electrochemical reactions

The current lines are perpendicular to the electrode surface, so they can be severely disturbed locally by the peaks and valleys created by surface micro-roughness (Gamburg and Zangari, 2011). Moreover, it is recognized that the micro-roughness of the surface enhances electrode performance by virtue of both the larger active surface area it creates and the increased local mass transfer due to micro-turbulence (Gabe et al., 1998).

Because of their importance, the effects of micro-roughness have been the subject of many theoretical studies aimed at modelling the electrode surface topography. Two different approaches have been investigated. On the one hand, roughness can be assimilated to well-defined micro-structures. Electrodes covered with arrays of bell-shaped or conical micro-peaks (Menshykau and Compton, 2009; Popov et al., 2010), cylindrical microelectrodes (Dickinson et al., 2008), spherical and hemispherical micro- and nano-particles (Streeter et al., 2007; Streeter and Compton, 2007; Popov et al., 2010) and micro-peaks with arbitrary sinusoidal shapes (Menshykau et al., 2008) have thus been modelled. Roughness has also been modelled as an interfacial porous layer with defined pore shape and size (Real et al., 1992). The development of many techniques such as lithography, nano-printing and plasma etching, which allow micro-/nano-patterned electrode surfaces to be produced (Sánchez-Molas et al., 2012) or nano-/micro-particles to be deposited on electrode surfaces (Streeter et al., 2007), have given accurate experimental supports. It has thus been possible to refine the theoretical approaches by confrontation with accurate experimental data.

On the other hand, attempts have also been made to approach electrode surface roughness by means of random models. The objective was to establish global formalisms to characterize the electrode topography. The fractal concept has been implemented in several papers (Nyikos and Pajkossy, 1986; Pajkossy and Nyikos, 1989a, 1989b; Rammelt and Reinhard, 1990; Parveen and Kant, 2016). Other similar attempts have been made to define global parameters that could introduce the effect of the electrode roughness into electrochemical equations for non-fractal surfaces (Kant, 1993; Kant and Rangarajan, 1995; Kant, 2010; Sharma et al., 2017).

Table 1 : Roughness parameters recommended to describe a topographical profile.

Symbol	Parameter	Description	Formula	Schematic meaning
$R_a$	Roughness average	Average absolute deviation of the roughness irregularities from the mean line	$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n  y_i $	
$R_q$	Root mean square	Arithmetic mean of the squares of deviation of the roughness irregularities from the mean line	$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$	
$R_{sk}$	Skewness	Symmetry of the roughness in terms of peaks and valley	$R_{sk} = \frac{1}{nR_q^3} \sum_{i=1}^n y_i^3$	
$R_{ku}$	Kurtosis	Sharpness of the roughness defined as deviation from the mean line	$R_{ku} = \frac{1}{nR_q^4} \sum_{i=1}^n y_i^4$	
$R_t$ or $R_{max}$	Maximum peak to valley height	Amplitude of the roughness between the maximum peak $R_p$ and maximum valley $R_v$	$R_t = R_p - R_v$ $R_t = \max_i y_i - \min_i y_i$	
$R_z$	Average peak to valley height	Average of the $R_t$ on n small profile lengths	$R_z = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n R_{t_i}$	
$R_{pm}$	Average peak height	Average of the $R_p$ on n small profile lengths	$R_{pm} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n R_{p_j}$	
$RS_m$	Mean peak spacing	Mean width of the roughness profile elements	$RS_m = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n L_j$	

These different modelling approaches have mainly dealt with micro-roughness but they can also be applied to nano-roughness (Streeter et al., 2007; Streeter and Compton, 2007; Kant, 2010). Both the experimental and theoretical approaches have shown significant effects of the surface roughness on the current provided by electrodes. Obviously, roughness increases the active surface area and increases thus the current density related to the electrode projected surface area. It has also been shown that roughness increases the transport-limiting current by acting on the local diffusion profile (Kant and Rangarajan, 1994; Streeter and Compton, 2007). It also modified the conditions of adsorption redox compounds on the electrode surface (Menshykau and Compton, 2009) and impact the double layer capacity (Douglass Jr. et al., 2008). The impact of surface roughness on abiotic electrochemistry has been judged so important that a recent article has stated that: “...*not accounting for roughness in data analysis may cause errors in estimation of composition, diffusion coefficient, improper assignment of electrode mechanism, and so forth*” (Parveen and Kant, 2016).

To the best of our knowledge, this vast theoretical basis developed for abiotic electrochemistry has not yet been exploited to investigate the impact of roughness on electroactive biofilms, although it may directly affect the step 5, or even possibly step 4, of the electron transfer chain (Figure 1). Tapping into these studies would no doubt help the research community to make significant advances in understanding and improving microbial electrodes.

### **3.2. Nano-roughness and electrochemical reactions**

Borisova and Ershler have reported pioneering work on the influence of nano-scale roughness on the double-layer capacitance (Borisova and Ershler, 1950). Capacitance dispersion decreased as the surface became flatter. Many studies then confirmed that capacitance dispersion was mainly of geometrical origin (De Levie, 1965; Scheider, 1975; de Levie, 1989). Since this discovery, surface roughness has been known to have a positive correlation with the electrical capacitance of the surface (Albina et al., 2006). It has also been stated that electrical conductance is reduced by deposited films, which decrease the nano-roughness. This effect has been observed for thin films, tens of atoms thick (Ke et al., 2009). Nano-roughness is also known to impact molecular adsorption on electrode surfaces (Pfeifer et al., 1989). The concentration of adsorbed species tends to be smaller and the adsorption process slower on a rough surface than on a smooth one, because of the perturbation of the molecular arrangement caused by the roughness. Adsorption can lead to great variations in the interfacial properties (Bockris, 2008), especially in the electrode double-layer capacitance (Douglass et al., 2008).

## **4. Impact of surface topography on cell adhesion and biofilm development**

### **4.1. Basics of cell adhesion**

Settlement of a solid surface by a microbial biofilm is highly dependent on the preliminary attachment to the support. It is agreed that biofilm formation takes place in eight successive steps (Characklis and Marshall, 1990) and the term “cell adhesion” covers a complex mechanism (Berkeley, 1980; Marshall, 1984), which commonly involves the first three steps.

The first step is the formation of a conditioning film on the surface. This is composed of organic or inorganic matter. By modifying the surface charge, potential, and possibly topography, it can promote or lessen bacterial adhesion.

The second step involves a random or targeted contact between planktonic cells and the surface. This step has been approached using theories developed in colloidal science. There, physical forces are at play: if the attractive forces are greater than the repulsive forces, bacteria reversibly adsorb to the surface. The forces to be considered include Van der Waals forces, steric interactions and electrostatic interactions, which are strongly dependent on the compositions of the conditioning film and the medium. Interfacial interactions have been modelled using the DLVO theory applied to cells (Marshall et al., 1971), which has been supplemented by an extended DLVO theory adding hydrophobic/hydrophilic and osmotic interactions (Van Oss et al., 1986; Van Oss, 1989; Hermansson, 1999). These forces act at the nano-scale and are classified as long-range ( $< 150$  nm), such as Van der Waals and electrostatic double-layer forces, or short-range ( $< 3$  nm) forces, such as hydrogen bonding, ionic and dipole interactions, and hydrophobic forces (Busscher and Weerkamp, 1987). In the case of adsorption of solid particles, the DLVO theory has been complemented with a surface roughness parameter (Czarnecki and Warszyński, 1987).

The application of DLVO theory to the adhesion of microbial cells has been strongly debated. The wall of microbial cells cannot be considered as a well-defined, hard, non-permeable, uniform sheath, as the conventional colloidal approaches assume, but should be approached by soft, permeable heterogeneous interphases with a non-negligible thickness (Gaboriaud et al., 2008; Duval and Gaboriaud, 2010; Hori and Matsumoto, 2010). The complexity of the theoretical model is consequently significantly increased.

The third step of the adhesion process, irreversible adhesion, involves molecular reactions. Bacterial surface structures, such as adhesins and transmembrane polymers, perform chemical bridging with the conditioning film of the surface (Davey and O'Toole, 2000; O'Toole et al., 2000; Ubbink and Schaer-Zammaretti, 2007). The bonds must be strong enough to overcome the repulsive and detachment forces, such as shear forces induced by fluid flow. Increasing the contact area between bacterial cells and the electrode surface gives more opportunities for linking and thus increases the adhesion strength. Once they are irreversibly bonded with the surface, bacteria are able to change their metabolism, switching from a free-swimming way of life to a complex surface-attached community life (Flemming et al., 2016).

#### **4.2. Basics of biofilm development and structural models**

As the primo-adherent cells undergo irreversible adhesion, they adopt a biofilm metabolism (Costerton et al., 1994; Costerton, 1995), which is expressed by the growth and division of the cells to form microbial aggregates. The growth of such cell clusters and their spatial arrangement create the three-dimensional structure of the biofilm (Klapper and Dockery, 2002). Biofilm growth and maturation involve the establishment of an extracellular matrix that holds the three-dimensional structure of the biofilm. The extracellular matrix ensures the structural integrity of the microbial community, protects it from environmental stresses, and enhances nutrient availability (Cogan and Keener, 2004; Flemming et al., 2007; Flemming and Wingender, 2010).

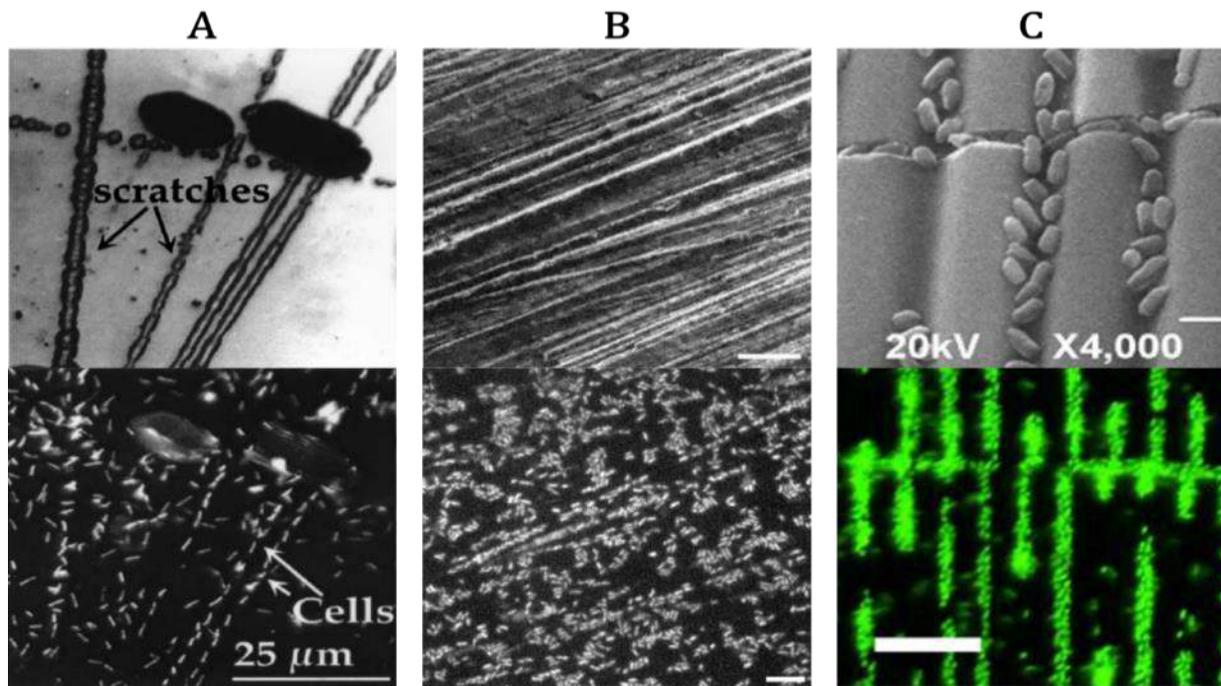
The formation and growth of a biofilm has been described as a developmental process (Doyle, 2001) evolving from primo-adherent cells to structured microbial aggregates and extracellular

matrix (Characklis and Wilderer, 1989) to the final organised microbial biofilm community. Understanding the mechanisms that govern how this complex organization becomes established in connection with the environmental factors has been a great challenge for the microbiology community in the past thirty years (Goller and Romeo, 2008). It has led to detailed understanding of the causal relationships linking genotype to phenotype within the biofilm communities (Monds and O'Toole, 2009), through genomic approaches linked with quorum sensing studies (Nealson et al., 1970; Eberhard, 1972; Irie and Parsek, 2008). In this context, the chemical and topographical features of surfaces have been shown to influence metabolic changes critical for biofilm formation (Shemesh et al., 2010). Nevertheless, there are still very few studies that have addressed the link between the properties of a surface and the response of bacterial communities growing on it.

### **4.3. Influence of surface topography on cell adhesion and biofilm formation**

As detailed above (section 4.1), cell adhesion mechanisms have mainly been approached by theories developed in the domain of colloid particles. In this context, surface topography has rarely been identified as an essential parameter that may strongly influence cell adhesion. Actually, DLVO studies are generally carried out by considering particles with a perfectly smooth surface and in the absence of shear stress. Yet shear stresses due to solution flow are predominant in most aqueous environments used to grow microbial cells. Neglecting the solution flow has consequently been judged as a possible source of discrepancy between the colloidal-based theoretical approaches and the real world (Perni et al., 2014).

When shear stress is taken into account, the surface topography takes on great importance since it can create local variations of the shear forces. It has been shown that, on altered surfaces, the initial adhesion of bacteria is favoured by asperities and tends to occur in the low shear force areas like scratches, holes or valleys (Characklis and Marshall, 1990). These observations have been reported in many studies as illustrated in Fig.1. They have been confirmed by implementing well-controlled surface topographies obtained by patterning the surface with micro-holes and micro-pillars (Díaz et al., 2007a, 2007b, 2010; Lorenzetti et al., 2015; Hochbaum and Aizenberg, 2010; Helbig et al., 2016) (Fig.2). It now seems established that bacterial settlement on a surface is enhanced by micro-roughness that creates low-shear-force areas and thus provides the cells with calm spaces for adhesion.



*Figure 1 : Preferential adhesion of bacteria in scratches and valleys observed by SEM (top images) and epifluorescence microscopy (bottom images). (A) From Edwards and Rutenberg (2001), cells from a soil enriched culture on a pyrite surface: polishing the surface created micrometric scale asperities that retained and oriented the cells. (B) From Medilanski et al. (2002), *D. desulfuricans* on a stainless steel surface polished with silicon carbide paper: bacterial colonization was concentrated and oriented along the micrometer-scale grooves. (C) From Epstein et al. (2013), attached cells of *P. aeruginosa* colonizing a PDMS surface patterned with wrinkles in a flow cell: the colonization only occurred in the calmer spaces formed by the 4- $\mu\text{m}$  spaced wrinkles; high colonization was also observed on the perpendicular crack where the cells were entrapped.*

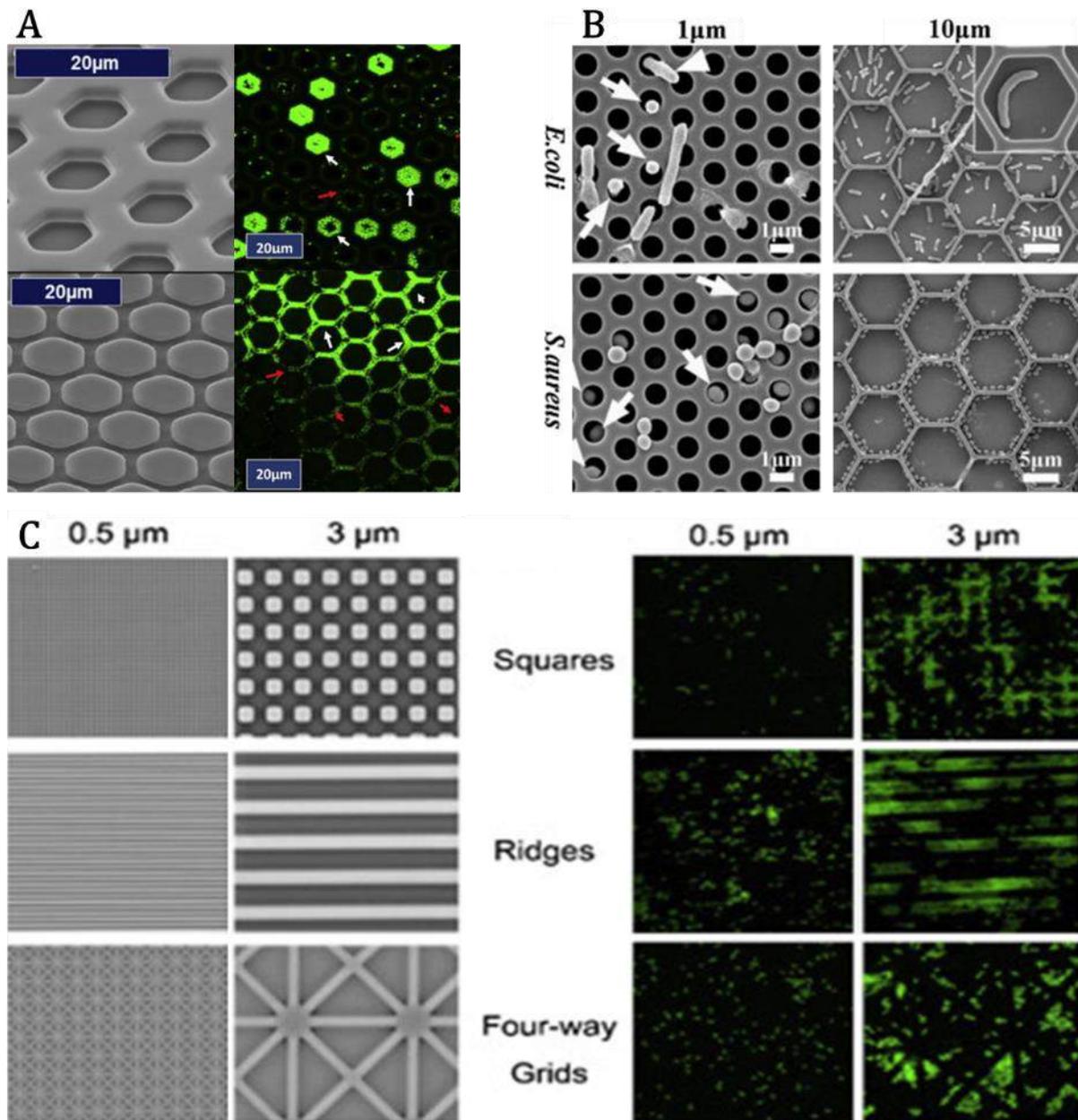
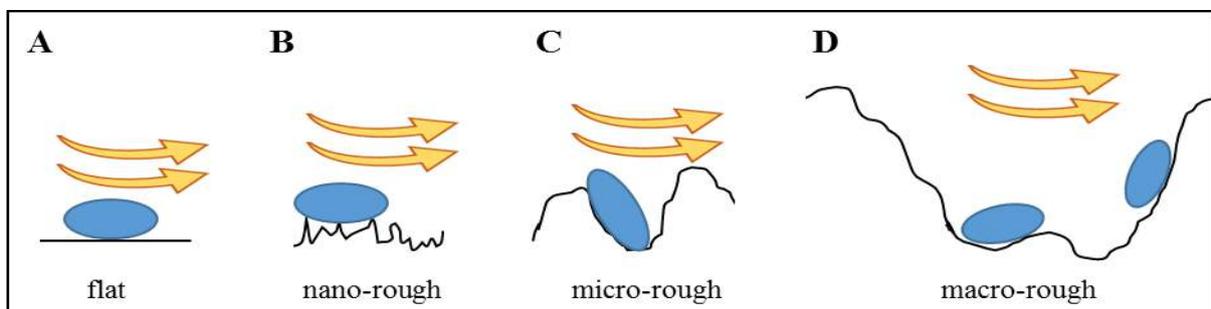


Figure 2 : SEM and Epifluorescence microscopy of various patterned surfaces and their microbial colonization. (A) From Vasudevan et al. (2014), *E. cloacae* was cultured on two PDMS surfaces patterned with hexagonal pits and pillars; the cells colonized only the recessed regions inside the pits or spaces between the pillars, which are protected areas. (B) From Yang et al. (2015), rod-shape bacteria *E. coli* and spherical-shaped bacteria *S. aureus* were inoculated on silicon surfaces presenting 1-µm holes and 10-µm hexagonal pits; white arrows show entrapped *S. aureus* cells (1 µm spheres) and *E. coli* cells (3-4 µm rods) only partially entrapped in the 1-µm holes; this pattern is highly efficient in terms of retention for bacteria having sizes similar to those of the holes; on the 10 µm pits, the reduction of shear forces was less and, consequently the *S. aureus* cells were only retained on the wall side, where they had a higher contact area with the surface. In contrast, elongated *E. coli* cells presented a higher contact area with the surface, allowing them to adhere even far from the pit walls. (C) From Lu et al. (2016); on patterned PDMS surfaces inoculated with *P. aeruginosa*, very little bacterial adhesion was observed when the patterning dimension was under 1 µm because the cells could not penetrate into the patterned surface; they could not take advantage of the low shear forces and had a smaller contact area with the surface (see Fig. 3.B).

Topographies with sizes of the same order of magnitude as those of cells have been claimed to be the most efficient to increase bacterial retention (Helbig et al., 2016). On the one hand, they present local sites with diminished shear forces and, on the other, they offer a greater contact area to bacteria (Flint et al., 2000; Edwards and Rutenberg, 2001; Medilanski et al., 2002) (Figure 2.B and Figure 3.C). When the surface topographical size increases, shear forces are still reduced but the reachable contact area no longer increases (Figure 2.B and Figure 3.D). The surface can be considered as flat at the scale of the microbial cells. In this case, cell adhesion can be enhanced because of the reduction of shear stress but there is no longer the effect due to the increase of the contact area.

At the nano-scale, roughness does not create calm spaces that could be exploited by the cells to adhere and it does not significantly increase the possible contact area. It has even been reported that nano-roughness can reduce the contact area between surface and cells (Ivanova et al., 2011) (Fig 3.B). Thus nano-roughness and micro-roughness are claimed to have opposite effects on the bacterial adhesion (Fig. 2.C). While nano-roughness tends to reduce the attachment strength, micro-roughness increases it and improves the adhesion environment. This difference has been confirmed by using Atomic Force Microscopy (AFM) to measure the strength of bacterial attachment. On stainless steel that presented different  $R_a$  below  $0.8 \mu\text{m}$  ( $R_z = 0.3 \mu\text{m}$  and  $R_{Sm} = 2.8 \mu\text{m}$ ), forces of 8 nN were necessary to detach 50% of the cells, whereas surfaces with  $R_a$  of around  $10 \mu\text{m}$  ( $R_z = 0.04 \mu\text{m}$  and  $R_{Sm} = 0.96 \mu\text{m}$ ) showed 50% of cell detachment at only 4 nN (Boyd et al., 2002; Whitehead et al., 2006). The strength needed to detach bacteria from the support was twice as high on a surface with topography of the micron scale as on a surface with submicron scale topography.



*Figure 3: Impact of contact surface and shear forces on bacterial adhesion depending on the surface roughness scale. On the flat and nano-rough surfaces (A,B), the cell is directly impacted by the hydrodynamic flow and is subjected to high shear forces. On micro- and macro-rough surfaces (C,D), the hydrodynamic flow is reduced in the grooves of the surface structure, which provides the cell with a calmer space to adhere. Regarding the contact area between the cell and the surface, the binding surface is reduced in the nano-rough configuration (B) and enhanced when the roughness is of the same order of magnitude as the cell dimensions (C).*

Nevertheless, nano-roughness has sometimes been claimed to significantly affect cell adhesion through indirect pathways. For instance, nano-roughness has been observed to lower the attachment of proteins to the surface by altering their supramolecular assemblages and thus causing bacterial attachment and retention to dwindle (Denis et al., 2002). Some studies have even demonstrated that the nano-topography of a surface could inactivate some proteins (Müller, 2001).

Nano-roughness has also been claimed to increase cell adhesion by increasing the surface hydrophobicity. Surfaces patterned with titanium nano-wires of different diameters exhibited higher roughness as the diameter of the wires decreased (Anitha et al., 2015). Ranging from  $R_a$  of 11 nm ( $R_{max} = 20$  nm) to  $R_a$  of 17 nm ( $R_{max} = 35$  nm) for wire diameters of 140 and 20 nm, respectively, the 1.5-fold increase of roughness resulted in a 4 fold increase in the attached biomass. This was explained by the higher hydrophobicity of the rougher surfaces (contact angles of  $32.4^\circ$  and  $57.6^\circ$  for  $R_a$  of 11 and 17 nm, respectively).

A surface patterned with nano-pores of various diameters from 15 to 100 nm showed that the electrostatic repulsive forces resulting from the nano-pores opposed bacterial adhesion. The electrostatic repulsion was combined with acid-base repulsion and impacted all types of the tested bacteria (Feng et al., 2015). It has been reported that the impact of nano-roughness is dependent on the cell type and shape (Ivanova et al., 2011). Surfaces with 0.18 and 0.52 nm  $R_a$  and -0.08 and 0.43  $R_{sk}$  showed different colonization patterns of rod-shaped and spherical bacteria.

Nano-roughness has also been claimed to affect the phases of biofilm development that occur after the adhesion of individual cells. It has been reported to induce changes in the extracellular polymeric matrix and even in the ratio between the proteins, polysaccharides and lipids that compose the matrix (Truong et al., 2009; Singh et al., 2011) and the amount of matrix with respect to cell density (Singh et al., 2011). On a nano-rough surface, cells are in contact with only a few peaks (Figure 3.B), which may result in weak attachment to the surface. In such a situation, cells have been assumed to compensate for the lack of cell/surface contact points by secreting a matrix that is more efficient at gluing them to the surface.

## **5. Impact of electrode topography on microbial electrochemical systems.**

### **5.1. General overview**

Surface roughness is not absolutely necessary to form a microbial electrode as it has been reported that an ultra-flat gold electrode can hold an electroactive biofilm that is as efficient as one developed on a rough carbon cloth electrode (Richter et al., 2008). Nevertheless, it is generally accepted as a rule of thumb that increasing the electrode surface roughness increases the electrochemical performance of microbial electrodes (Dumas et al., 2008b; Erable et al., 2009b, 2010; In Ho et al., 2011; Cercado-Quezada et al., 2011; Ye et al., 2012; Bombelli et al., 2012; He et al., 2012; Kim et al., 2014; You et al., 2014; W. Guo et al., 2014; Thung et al., 2016; Tao et al., 2016). Some studies comparing different electrode materials have even suggested that the surface roughness may have a greater impact than the nature of the material itself (Dumas et al., 2008b; Erable et al., 2009b). The better performance observed with the rougher electrodes has most often been attributed to enhancement of cell adhesion and biofilm development (Erable et al., 2009b, 2010; In Ho et al., 2011; Ye et al., 2012; You et al., 2014; W. Guo et al., 2014; Thung et al., 2016). The fact that biofilm development is favoured by the surface roughness has even been identified as a possible disadvantage for long-term operation because biofilm overgrowth may finally result in a decrease in long-term performance (Thung et al., 2016). In contrast, some studies have reported that the rougher electrodes produce higher current, even though no significant difference in biofilm development was observed (Dumas et al., 2008b; Bombelli et al., 2012).

Numerous articles have noted the effect of surface roughness on the current produced by microbial electrodes or on the power produced by microbial fuel cells, although it was not the main purpose of the study. In this context, several basic explanations have been suggested, sometimes only as speculative ideas that should be investigated further. The increase of surface area available for cell adhesion has been evoked to explain greater biofilm development (You et al., 2014). In contrast, the importance of the larger available area has sometimes been denied by pointing out the more significant effect of the difference in surface energy linked to different roughnesses (Bombelli et al., 2012). The lower charge-transfer resistance of rougher electrodes (Ye et al., 2012) and a difference in local acidification of the biofilm (Kim et al., 2014) (see section 5.3) have also been evoked.

Actually, the main aim of most of these studies was to improve the current produced by the electrode or the power supplied by the microbial fuel cell, so the accurate characterization of the effect of surface topography was not an essential objective in this context. Drastic procedures were consequently used to modify the electrode surface, such as plasma (He et al., 2012), electrochemical oxidation (Cercado-Quezada et al., 2011) and various chemical surface modifications (Lai et al., 2011; Bombelli et al., 2012; You et al., 2014; W. Guo et al., 2014), and some studies compared electrodes of different materials. In such conditions, the differences in surface roughness were only a consequence of the modification of other physicochemical parameters that may also play a key role in cell adhesion, biofilm formation and electron transfer rate, such as hydrophilicity (Zhou et al., 2017), surface energy (Bombelli et al., 2012) and surface chemical composition (Cercado-Quezada et al., 2011; Lai et al., 2011). In this context, the effect of surface roughness could not be differentiated from the effect of the other parameters that were changed.

From this preliminary overview, it can easily be concluded that surface roughness most probably has an impact on microbial electrodes and that this issue would deserve specifically dedicated studies. These studies should be designed to minimize the number of parameters that are modified when modifying the surface roughness. The detailed review presented above is based on the articles that have tended towards this objective.

## 5.2. Random micro-roughness

The limit between nano-, micro- and macro-roughness is still unclear and may vary with the surface under study. Thus it is difficult to clearly attribute an effect to each of the roughness scales but recent works have been focusing on this issue (Santoro et al., 2014; Li et al., 2014). The first study segregated roughness in two ranges: from 5-10  $\mu\text{m}$ , where roughness was characterized by the high frequency roughness  $R_a^H$  and skewness  $R_{sk}^H$ , and from 100-300  $\mu\text{m}$ , characterized by low frequency roughness  $R_a^L$  and skewness  $R_{sk}^L$  (Santoro et al., 2014). This classification could be related to micro- and macro-roughness. Various commercial carbon papers implemented with wastewater in a microbial fuel cell showed that the decrease of bacterial attachment and current density was correlated with the decrease of  $R_{sk}^H$ , while no correlation could be established with the variation of  $R_{sk}^L$ . This means that the topographical variations measured at the scale of 5-10  $\mu\text{m}$ , close to the cell size, had an impact on the system while the variations in the 100-300 scale were irrelevant in an analysis of the microbial fuel cell performance. In order to better differentiate these impacts, a segregation into four ranges was studied (20-100 nm, 0.9-5  $\mu\text{m}$ , 6.5-50  $\mu\text{m}$  and 163-450  $\mu\text{m}$ ) but it was not possible to correlate the different parameters with the bacterial adhesion or with the current produced. This study illustrated how complex surface characterization can be (Li et al., 2014).

As recalled in section 4.3, when approaching the size of a cell, around a few micrometers, roughness offers an obvious physical benefit for bacterial adhesion by creating “calm areas” and increasing the reachable contact area. The results presented above tend to confirm this and the phenomenon, well-documented in the field of biofilms in general, seems to also apply to electroactive biofilms. It has also been observed on stainless steel electrodes inoculated with *Geobacter sulfurreducens*. Increasing the roughness from 0.1 to 2  $\mu\text{m}$  produced almost no effect on biofilm coverage and electrical output, while a shift from 2 to 4  $\mu\text{m}$  multiplied the current density provided by the cathode by 1.6 (Pons et al., 2011). The current rise was explained by the presence of dense bacterial colonies on the roughest, 4  $\mu\text{m}$ , surface, which formed in the calm spots created by the valleys.

In contrast, another study performed on stainless steel with a multi-species bacterial inoculum showed no noticeable effect of either the large (300  $\mu\text{m}$  wide, 500  $\mu\text{m}$  deep channels) or the small values of micro-roughness ( $R_a = 5 \mu\text{m}$ ) compared with those for smooth stainless steel (Pocaznoi et al., 2012a). The effect of micro-roughness seems to be subject to strong variation depending on the system and the bacterial inoculum, and it may be higher in restricted growth conditions.

It has also been observed that the shape and the size of the microbial colonies induced by the micro-roughness may affect their electrochemical properties. In the case of *G. sulfurreducens* colonies settling on rough stainless steel electrodes, the current density calculated with respect to the surface area covered by the bacterial colonies, instead of the whole electrode surface area, was shown to decrease with bacterial coverage (Pons et al., 2011). Isolated cells and small colonies provided higher local current density than dense colonies. The total current increased with the global biofilm coverage ratio but, locally, small colonies proved more efficient than big microbial aggregates. This may open up valuable possibilities for micro-scale surface engineering of electroactive biofilms.

Table 2: Performance of microbial anodes with random micro-rough surface.

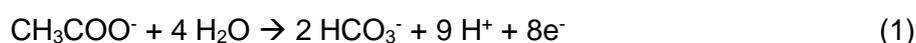
References	Testing device	Bacteria	Substrate	Anode materials	Surface characteristics	Maximal density	
						Current (A.m <sup>-2</sup> )	Power (W.m <sup>-2</sup> )
Santoro et al, 2014	MFC	Wastewater	Sodium acetate (1 g.L <sup>-1</sup> )	Carbon paper with various PTFE content	0 wt% PTFE : Ra = 52 µm 60 wt% PTFE: Ra = 136 µm	0.13	0.19
Li et al, 2014	MFC	Wastewater	Sodium acetate (1.5 g.L <sup>-1</sup> )	Raw carbon papers and electrochemically oxidized with three electrolyte	No treatment : Ra = 15.5 µm HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : Ra = 16.5 µm NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : Ra = 13.5 µm (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : Ra = 13.8 µm	1.5 1.7 1.75 1.82	0.16 0.2 0.18 0.19
Pons et al, 2010	Three-electrode set-up. Electrode polarized at -0.5 V vs. Ag/AgCl	<i>G.sulfurreducens</i>	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Sandblasted stainless steel	Ra = 0.1 µm Ra = 2.3 µm Ra = 4 µm Ra = 6.1 µm	0.6 0.6 1 1	0.6 0.6 1 1
Pocaznoi et al, 2012	Three-electrode set-up. Electrode polarized at -0.2 V vs. SCE	Leachate from garden compost	Sodium acetate (1.64 g.L <sup>-1</sup> )	Sandblasted stainless steel	Ra < 0.9 µm Ra = 5 µm	19.7 21.5	19.7 21.5

### 5.3. Surface micro-structuring

Studies of the impact of the electrode topography should gain considerably in accuracy when well-defined electrode surface structuration is implemented. Electrode surfaces with regular topography can thus be offered to bacterial settlement in a fully reproducible manner.

The pioneering works in this field were conducted by the MEMS research community, which previously used electrode structuration for biological applications (Grayson et al., 2004). In the context of MFC, micro-structured gold electrodes presenting arrays of 8- $\mu\text{m}$ -high cross-shaped micro-pillars of 40  $\mu\text{m}$  width, inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*, produced a current density of 30.2  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Siu and Chiao, 2008). This current density was 4.9 times that obtained on flat gold although the surface area was only increased 1.8 times. It is stated that micro-pillars reduced the culture time of the MFC by a factor of 4 and thus increased the current conversion of substrate.

Another study performed with a *Serratia marcescens*-inoculated MFC, which implemented micro-structured anodes with cylindrical micro-pillars of 20  $\mu\text{m}$  diameter, 20  $\mu\text{m}$  height and various spacings from 20 to 50  $\mu\text{m}$ , highlighted the impact of micro-structuring on a key issue for electroactive biofilm (Kim et al., 2014). It showed that the micro-pillar pattern reduced the local acidification of the biofilm and thus led to a lower rate of microbial death. Actually, the oxidation of organic compounds, e.g., acetate, which is the most usual substrate for microbial anodes, leads to the production of protons:



and electroactive biofilms are very sensitive to low pH. Local acidification has been demonstrated to be a major cause of inhibition of microbial anodes (Torres et al., 2008; Popat and Torres, 2016; Oliot et al., 2016)

The protective effect of micro-pillars against local acidification was accentuated by the densification of pillars. A 14% improvement of the power density was reported with the tightest micro-pillar pattern in comparison with the smooth surface, thus reaching 287  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  which corresponds to 1.3  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  current density. The biofilm developed on the 20- $\mu\text{m}$  spaced pillars was thinner than on the 50- $\mu\text{m}$  ones. It was concluded that the biofilm acidification caused a thickening of the biofilm due to a high death ratio. In contrast, in the presence of structuration, biofilm formation was delayed and proton accumulation and the death ratio were thus reduced. Micro-pillars provided an appropriate environment for the formation of a thin and effective electroactive biofilm by mitigating the acidification phenomenon.

A recent study using gold micro-pillars of 500  $\mu\text{m}$  height has come to a seemingly opposite conclusion (Champigneux et al., 2018). Firstly, it was observed that the presence of micro-pillars favoured reproducible full biofilm coverage, and increased the current density to 8.5  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , while the flat surface gave only 2.5  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ . This increase was due only to the increase of the surface area that was available for microbial settlement. In contrast to the study described above, numerical modelling explained that the micro-pillar structure increased the local acidification by hindering the transfer of buffering species inside the micro-pillar array. Actually, these apparently opposite conclusions were obtained in different operating conditions: micro-pillars of 20  $\mu\text{m}$  vs. 500  $\mu\text{m}$ , mature biofilms vs. early colonization, MFC vs. electroanalytical set-up with control potential, and different strains, which led to different current densities.

Ultra-microelectrodes (Heinze, 1993; Bard and Faulkner, 2001) have been implemented in the form of gold micro-lines of 10  $\mu\text{m}$  width spaced by 100  $\mu\text{m}$  of non-conductive material (Liu et al., 2010) and inoculated with *Geobacter sulfurreducens*. The hemispheric biofilms that developed over the gold micro-lines resulted in a larger amount of bacterial biomass related to the electrode surface area in comparison to biofilms developed on plain macro-electrodes. The largest amount of biomass linked to a micro-line electrode resulted in 4-fold higher current density (1.6  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) than on a plain gold surface (0.4  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). A limitation due to extracellular electron transfer was assumed when a critical thickness of 20  $\mu\text{m}$  was reached.

Likewise, biofilms formed from a multi-species inoculum around a cylindrical ultra-microelectrode of 25  $\mu\text{m}$  diameter produced up to 6.6  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Pocaznoi et al., 2012b). In this case, it was assumed that the extracellular electron transport network was improved by the ultra-microelectrode effect. Same hypothesis were discussed with ring electrodes 20  $\mu\text{m}$  wide and spaced by 100 and 220  $\mu\text{m}$  of uncondutive material (Ren et al., 2016). A 50  $\mu\text{m}$  hemispherical biofilm developed on the ultra-microelectrodes resulting in 3-fold increase with current density up to 17.7  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ .

Micro-structuring has also been achieved with micro-holes (5  $\mu\text{m}$  wide and 8  $\mu\text{m}$  deep) and micro-channels (5  $\mu\text{m}$  wide and 3.6  $\mu\text{m}$  deep) (Inoue et al., 2012). When they were inoculated with *Geobacter sulfurreducens*, a good correlation between the surface area and the current production was reported but no supplementary positive or negative effect of the micro-structuration was observed.

The effect of the size of micro-holes has been investigated with gold electrodes having square holes with sides ranging from 1 to 10  $\mu\text{m}$ , inoculated with *S. putrefaciens* (size 3-5  $\mu\text{m}$ ) (Kano et al., 2012). Implemented in an MFC, the microbial anodes with holes of 4 and 5  $\mu\text{m}$  sides led to the highest power. The optimal size of the micro-holes corresponded to the size of the bacteria. It was concluded that offering an increased contact area to the cells resulted in more efficient electron transfer, which was consistent with the direct electron transfer pathway achieved by *S. putrefaciens* (Kim et al., 1999) (see section 4.3). However, it may be noted that micro-holes of side 4-5  $\mu\text{m}$  can increase the contact area for individual bacteria but they may be less favourable for biofilm development than micro-pillar structures because they isolate cells or colonies from each other (Vasudevan et al., 2014; Yang et al., 2015).

Table 3: Performance of microbial anodes with micro-structured surface.

References	Testing device	Bacteria	Substrate	Anode surfaces	Surface characteristics	Maximal density	
						Current (A.m <sup>-2</sup> )	Power (W.m <sup>-2</sup> )
<i>Siu et al, 2008</i>	MFC connected to resistance (47 to 1 kΩ)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose (180g.L <sup>-1</sup> )	Gold deposit structured on PDMS (0.2μm thick)	Flat surface Around 70 000 pillars 8 μm high, 40 μm wide	6 . 10 <sup>-3</sup> (100 Ω) 3 . 10 <sup>-3</sup> (100 Ω)	1 . 10 <sup>-4</sup> 4 . 10 <sup>-3</sup>
<i>Kim et al, 2014</i>	MFC	A flagellated gram negative bacteria, <i>Serratia marcescens</i>	Glucose (25g.L <sup>-1</sup> )	Cr/Au evaporated (30/300 nm) Round micropillars (20 μm diameter and 20 μm height) Various spacing	No pillars 50 μm spaced pillars 30 μm spaced pillars 20 μm spaced pillars	1.5 1.7 1.75 1.82	2.5 2.74 2.68 2.87
<i>Champigneux et al, 2018</i>	Three-electrode set-up. Electrode polarised at +0.1 V vs SCE	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Electrodeposited gold Square micropillars (100x100 μm, height 500 μm) Various spacing	No pillars 200 μm spaced pillars 125 μm spaced pillars 100 μm spaced pillars	2.5 6.1 7.85 8.45	
<i>Liu et al, 2015</i>	Three-electrode set-up. Electrode polarised at +0.24 V vs SHE	G. sulfurreducens	Sodium acetate (2.46 g.L <sup>-1</sup> )	Gold deposit on silicon wafer (0.75 μm thick)	Flat and plain gold 10 gold lines of 1.5 cm x 10 μm spaced by 100 μm	4 16	
<i>Pocaznoi et al, 2012</i>	Three-electrode set-up. Electrode polarised at -0.2 V vs SCE	Mixed bacterial community from compost leekages	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Platinum wire of various diameter	500 μm Ø 50 μm Ø 25 μm Ø	8 20 66	
<i>Ren et al, 2013</i>	MFC connected to resistance (148 to 1 MΩ)	Geobacter-enriched community from anaerobic-digestion sludge	Sodium acetate (2.05 g.L <sup>-1</sup> )	Gold deposit on glass (0.42 μm thick) Imbricated 20 μm wide rings electrodes with various gaps.	Flat and plain gold 100 μm spaced rings 220 μm spaced rings	5.2 17.7 15	2.1 6.9 7.7
<i>Inoue et al, 2012</i>	MFC connected to resistance (lowered stepwise)	G. sulfurreducens	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Au/Cr deposit on Si (400/200 nm thick)	Pattern of 5 μm x 5 μm holes Pattern of 5μm wide / 3.6μm deep channels	6 . 10 <sup>-3</sup> 2 . 10 <sup>-3</sup>	
<i>Kano et al, 2012</i>	MFC connected to resistance (100 to 3000 Ω)	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Glucose (0.4g.L <sup>-1</sup> )	Au evaporated Patterned with 1 μm deep square holes	1 μm wide 2 μm wide 3 μm wide 4 μm wide 5 μm wide 7 μm wide 10 μm wide	0.18 0.27 0.3 0.38 0.41 0.38 0.35	

#### 5.4. Nano-roughness

At the nano-scale, it is difficult to make a strict distinction between random nano-roughness, which is generally obtained by global surface treatments, and nano-structuring, which should result in well-patterned surfaces. For instance, it is hard to decide whether surface modification with nanoparticles, nanowires or nanotubes belongs to one or other of the categories. We have consequently tried to order this section from random nano-roughness to perfectly patterned nano-structures without drawing a frontier between the two categories.

Glassy carbon electrodes inoculated with *Shewanella oneidensis* displayed a well-developed biofilm on the roughest surface ( $R_a = 86$  nm,  $R_q = 116$  nm), whereas the smoothest one ( $R_a = 11$  nm,  $R_q = 14$  nm) was only settled by isolated cells (Ye et al., 2012). In addition, as observed in abiotic systems (see section 3.2), the nano-roughness also affected the polarization resistance, rougher surfaces showing lower polarization resistance (850 against 12500  $\Omega$ ). A similar coupled effect of different phenomena has been reported with anodes fabricated by ion implantation of  $N^+$  on a carbon paper surface. Implantation of  $N^+$  resulted in roughness being increased to around 100 nm and also decreased the resistance and increased hydrophobicity (He et al., 2012). It was consequently not possible to discriminate between the contributions of the three phenomena to the 3-fold power density increase obtained by implementing the electrodes in an MFC inoculated with sludge.

At the nano-scale, did the roughest surface enhance the development of electroactive biofilms by favouring bacterial adhesion and biofilm formation or by decreasing the polarization resistance, i.e. improving electron transfer? Bacteria use electron transfer to the electrode to support their metabolic process. Facilitating electron transfer can consequently lead to more intense biofilm development. Did nano-roughness impact cell adhesion directly or did it favour the growth of electroactive bacteria by accelerating electron transfer? A clear causal chain can hardly be extracted yet.

The difficulty of drawing straightforward conclusions has been illustrated by another study performed on stainless steel electrodes that were either treated by flame oxidation or left untreated (K. Guo et al., 2014). Flame oxidation not only increased the nano-scale roughness from 75 to 151 nm but also altered the surface chemistry. The treatment resulted in better biofilm coverage and higher current output from enriched *Geobacter psychrophilus* and *Geobacter sulfurreducens* inocula for the rougher oxidized electrode but, once again, the improvement cannot be fully related to the increase in surface nano-roughness since the flame oxidation also deteriorated the chromium-rich passive layer. Actually, the nature of the passive layer can significantly affect electron transfer rate with biofilms (Pons et al., 2011). Similarly, the generation of current by *Geobacter sulfurreducens* has been shown to be influenced by the crystallographic nature and orientation of the electrode surface (Maestro et al., 2014) and the crystallographic state can directly influence the nano-roughness of the electrode surface.

The technique used to achieve the surface nano-topography may also have a considerable impact on the performance of an electroactive biofilm. Grass-like nano-roughness of 100 nm obtained by deep reactive ion etching of a gold electrode has been compared with sputtering of gold nanoparticles on carbon paper in an MFC inoculated with wastewater (Alatraktchi et al., 2012). Nanoparticle sputtering led to considerably higher power densities (346 vs. 2.5 mW/m<sup>2</sup>). It has generally been observed that using nanoparticles sputtered on smooth electrodes to increase their roughness leads to increased current output (Qiao et al., 2007; Sharma et al., 2008; Sun et al., 2010; Fan et al., 2011; Quan et al., 2015; Z. Lu et al., 2015;

Xu et al., 2018) but, since nanoparticle sputtering also impacts the surface chemistry and its electrical characteristics, the current enhancement cannot be linked directly with the nano-topography.

Surfaces modified with titanium oxide nanowires (Jia et al., 2016) and titanium oxide nanotubes (Feng et al., 2016) have shown that a titanium surface with a nanometre organization constitutes a suitable electrode material for forming microbial anodes, in contrast to smooth titanium, which has proved to be of no interest. After inoculation with effluent from an existing acetate-fed MFC reactor, no biofilm developed on smooth titanium, and consequently no current was produced, while the titanium electrodes coated with nanotubes were completely covered with biofilm and produced 12.7 A.m<sup>-2</sup>. Titanium nanowires, on the other hand, were believed to act as a substitute for bacterial pili by promoting the bacterial adhesion and also favouring electron transfer. Here again, the conclusions should be moderated by considering the low conductivity of titanium oxide. In the field of electrochemical engineering, pure titanium is not considered as appropriate anode material because of the formation of a low-conductive oxide on its surface. Surface modification by titanium nano-objects such as nanowires or nanotubes may mainly act by modifying the surface conductivity.

Very recent studies have tended to single out the effect of nano-topography by comparing surfaces of identical nature. Gold surfaces with  $R_a$  of 0.8 and 4.5 nm have been compared. The 4.5-nm roughness was obtained by electrolytic deposition of gold on the 0.8-nm smooth gold surface (Champigneux et al., 2018). Inoculated with *G. sulfurreducens*, the 0.8 and 4.5 nm-rough electrodes respectively produced 0.9 and 2.5 A.m<sup>-2</sup> on average. It was speculated that nano-roughness might act by increasing the electron transfer rate. Another study implemented nano-patterning to design well-controlled grids 3 µm wide and 115 or 300 nm high on glassy carbon surfaces. These electrodes were inoculated with *S. oneidensis* (Ye et al., 2017). The 115 nm high pattern was 78% more effective in terms of cell attachment density than the smooth surface and 40% more productive in current density. The 300 nm high pattern showed no significant improvement in terms of current density compared to the smooth surface, even though the bacterial attachment was a little greater. It was assumed that the 300 nm pattern created frontiers between the biofilm patches that formed on different areas of the grid, and was thus detrimental to global biofilm organization. In contrast, the 115 nm pattern was not too high and did not hinder biofilm unity. The thermodynamic explanation given was that the membrane deformation needed to overcome the 300 nm feature was too demanding in energy. It highlights an optimal feature threshold of around 100 nm, which is consistent with cell energy limitations.

Table 4: Performance of microbial anodes with nano-rough surface.

References	Testing device	Bacteria	Substrate	Anode surfaces	Surface characteristics	Maximal density	
						Current (A.m <sup>-2</sup> )	Power (W.m <sup>-2</sup> )
He et al, 2012	MFC	Acclimated anaerobic sludge from anaerobic reactor	Sodium acetate (1 g.L <sup>-1</sup> )	Carbon paper implanted with N <sup>+</sup> ions	No implantation Implanted N <sup>+</sup> ions : roughened surface	0.033	0.1
Guo et al, 2014	Three-electrode set-up. Electrode polarised at -0.2 V vs. Ag/AgCl	Anodic effluent of an existing BES, which is rich in <i>Geobacter</i>	Sodium acetate (2 g.L <sup>-1</sup> )	Stainless steel felt flame oxidized	Untreated : Ra = 75 nm Oxidized: Ra = 151 nm	1.1	19.2
Alatrakchi et al, 2012	DCMFC	Anodic effluent of a two-chamber MFC with modified domestic wastewater	Sodium acetate (1.33 g.L <sup>-1</sup> )	Gold	Plain gold Nanoglass 100s of nm high	3.9 . 10 <sup>-5</sup>	2.5 . 10 <sup>-3</sup>
Jia et al, 2016	MFC connected to resistance (80 Ω to 40 kΩ)	<i>Shewanella loihica</i>	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Carbon paper with TiO <sub>2</sub> nanowires	Untreated carbon paper Fibers covered with 10 nm wide titanium wires mattress	0.19	0.39
Feng et al, 2016	MFC connected to resistance (1 Ω)	Anodic effluent of an acetate-fed MFC reactor	Sodium acetate (1 g.L <sup>-1</sup> )	Titanium plate with TiO <sub>2</sub> nanotubes	Bare titanium nanotubes diameter of 60-90 nm, Roughness around 10s of nm	0.066	12.7
Champigneux et al, 2018	Three-electrode set-up. Electrode polarised at 0.1 V vs. SCE	<i>G. sulfurreducens</i>	Sodium acetate (0.82 g.L <sup>-1</sup> )	Gold	Smooth: Ra = 0.8 nm Rough : Ra = 4.5 nm	0.9	2.5
Ye et al, 2017	Three-electrode set-up. Electrode polarised at 0.24 V vs. SHE	<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate (1.8 g.L <sup>-1</sup> )	Glassy carbon plates	Unstructured glassy carbon Grid patterned at 115 nm high Grid patterned at 300 nm high	0.12	0.25
Ye et al, 2012	Three- electrode set-up.	<i>Shewanella oneidensis</i>		Glassy carbon plates	Ra =11 ± 0.5 nm Ra =88.6 ± 13.4 nm	Electrode resistance : 12 500 Ω 850 Ω	

## 6. Open questions and thoughts.

As a first obvious conclusion, according to the impressive influence of the electrode surface topography on microbial electrochemical systems which have already been reported, it can be stated that surface topographical engineering is a very promising avenue for improving the efficiency of electroactive biofilms.

### 6.1. Take care when choosing the experimental set-up

Two different approaches can be followed to investigate microbial electrochemical systems depending on the objective. The engineering approach implements whole reactors and processes in order to shift the technology towards actual application as fast as possible (Pocaznoi et al., 2012c). In contrast, fundamental investigations try to single out a given phenomenon in order to gain deeper fundamental understanding of it. It is essential not to confuse the two approaches, which correspond to different purposes and different experimental set-ups.

In the context of engineering, with the objective of improving the performance of microbial electrodes, optimal surface topography can be associated with porous electrodes, 3-dimensional structures and surface functionalization, resulting in very complex electrode architecture. This can be illustrated by a glassy carbon electrode coated with carbon nanotubes and then functionalized with polypyrrole and manganese (Lu et al., 2013) or similarly, by carbon material doped with nickel nano-particles, patterned in a micropillar array to form an electrode and then coated with carbon nanofibers (Khare et al., 2016). Such innovative anode designs can lead to valuable improvements in performance but they are not ideally suited to analytical studies that aim to characterize the effects of surface topography on electroactive biofilms. Likewise, an MFC is not an appropriate electro-analytical device (Rimboud et al., 2014), because many other rate-limiting steps than the studied electrode can affect the global performance. As an illustration of this general consideration, it has recently been reported that the cathode roughness can increase MFC performance by improving the electrical contact between the cathode and the current collector (Santoro et al., 2015). In this case roughness had nothing to do with the bioelectrochemical processes. The design of MFCs should be reserved for engineering purposes. A search for a fundamental explanation of the impact of surface topography on electroactive biofilms should be carried out in carefully designed electroanalytical set-ups (Rimboud et al., 2014) with well-defined electrode surface topographies.

### 6.2. Consensus on the impact of micro-roughness at cell size

Several reports tend to confirm that micro-roughness improves the electroactive biofilm performance in two ways: by offering bacteria sites with low shear forces, suitable for their attachment, and by increasing the bacteria/electrode contact area for stronger attachment and improved electron transfer. These two effects have already been observed with bacterial adhesion and biofilm formation of non-electroactive species (Figs. 1 and 2). They are most marked when the average roughness is of the same order of magnitude as the size of the cells, i.e., a few micrometers.

Above a few micrometers, random roughness does not seem to have any great impact on electroactive biofilms, while ordered roughness, which is achieved by surface micro-

structuring, may increase the current produced by increasing the surface area available for biofilm development. For microbial anodes, the optimal order of magnitude for micro-structures should be closely related with the diffusion limitation, mainly to mitigate local acidification of the biofilm.

Actually, the impact of uncontrolled random surface topography on electroactive biofilms is still unclear (see section 5.2), certainly because of the large variety of systems that have been considered in the context of microbial electrochemical systems. Moreover, a large number of these studies have been carried out in MFCs designed for purposes other than characterizing the effect of surface topography. This is another major reason of the lack of clear conclusion. The variation of roughness has most often been the result of physical or chemical surface modifications, making it difficult to discriminate which parameter had the main impact. Specific studies should now focus on roughness as the single parameter tested, taking care to keep the other interfacial properties unchanged. This direction has already been engaged with surface micro-structured electrodes and should be intensified to grasp the real effect of random roughness.

### **6.3. Interesting possibilities related to nano-roughness (see section 5.4)**

It has been claimed that bacterial cells could hardly grow over a structure 300 nm high due to the deformation limitation. Sharp edges above 100 nm or so may thus delay the formation of continuous biofilms. This gives valuable guidelines on how to favour the development of biofilms on an electrode: nano-structuration may be more efficient when lower than 300 nm or presenting reduced sharpness ( $R_{ku}$  lower than 3) and wide peak to peak distance. Conversely, the same guidelines can also be considered if the objective is to hamper the development of harmful biofilm, in the context of biocorrosion for instance.

It has been suggested that bacterial appendices could be mimicked by decorating the electrode surface with metal nano-wires to provide the cells with multiple "pilus-like" nanostructures to achieve extracellular electron transfer. This particular patterning technique may show great promise, but further studies need to be carried out, in particular by avoiding the comparison with flat titanium, which is not an appropriate material for anodes.

At the nano-scale it seems difficult to discriminate between the real effect of the surface topography and that of other interfacial parameters, which are unavoidably changed when nano-topography is modified. Are the characteristics and performance of electroactive biofilms affected directly by the electrode nano-topography or by the impact of the electrode nano-topography on surface chemistry, interfacial resistance, crystallographic state, etc.? (See section 3.2.) Nano-roughness corresponds to a scale at which it is difficult to avoid other physicochemical properties being affected, so the causal chain can hardly be unravelled. Basic conclusions should be carefully qualified.

### **6.4. Exciting horizons to be explored**

Numerous electrochemical studies have approached, both experimentally and theoretically (see section 3), the impact of the electrode roughness on electron transfer in abiotic conditions. This solid basic knowledge should now be exploited for electroactive biofilms. For example, surface nano-roughness has been shown to drastically change the electrochemistry of an equine cytochrome c (Leopold and Bowden, 2002) by acting on the organization of the

monolayer that self-assembles on the electrode surface. This type of work, applied to the component of the specific cytochromes c, quinone compounds and other mediator types involved in biofilm extracellular electron transfer (Lidan et al., 2014), could lead to a more accurate description of certain transfer mechanisms.

Fascinating thoughts have been voiced on the possible impact of nano-roughness from the standpoint of the metabolic changes it may induce for adhering bacteria. A microbiological approach through genomic analysis should be suitable to better understand bacterial response to the surface topography. For example, effects of roughness on extracellular matrix production and composition have already been evoked (see section 4.3) but no experimental confirmation has yet been given. Genomics could be of great help in unravelling the bacterial mechanism at play.

This issue should have great importance for electroactive biofilms because the extracellular matrix plays a crucial role both in biofilm structure and extracellular electron transfer. Using the electrode topography to act on biofilm properties, such as thickness, structure and, above all, conductivity, should be a great breakthrough for electroactive biofilm design. In this direction, in the case of multispecies inocula, it seems very attractive to investigate the possibility of orienting the selection of the suitable electroactive species by means of the electrode topography. For both pure cultures and multispecies inocula, it has been shown that multiple pathways could be involved in extracellular electron transfer (Zhu et al., 2012; Rimboud et al., 2016). Trying to orient the synthesis of the most suitable extracellular mediator(s) through the nano-topography of the electrode would be a very attractive way to optimize electroactive biofilms. This research direction seems very ambitious but it is supported by previous studies. These studies did not deal with electroactive biofilms but suggested that the production by bacterial cells of compounds involved in biofilm structuring may be affected by the nano-topography of the support (see section 4.3).

## **7. Conclusion**

Surface topography has an obvious, strong impact on the formation and performance of electroactive biofilms. At the scale of around a hundred micrometers and above, surface engineering can be used to increase the electrode surface area. Optimal topographies are likely to be found by improving mass transfer and mitigating local acidification inside the micro-structure. At the micrometer scales, local shear stress and cell-electrode contact angle seem to play the major roles. The nano-scale opens up thrilling horizons, with some hope of acting on the intimate mechanisms of biofilm formation and extracellular electron transfer.

Up to now, many studies have investigated surface topography in parallel with other surface modifications, thus leading to a lack of specific understanding. Conversely, it may be questioned whether the improvements sometimes attributed to chemical or physicochemical modifications of the surface were not, to some extent or even totally, due to modification of the surface topography. The main conclusion of this review is that it may be advisable to develop investigations of well-controlled roughness by taking care to avoid the variation of other interfacial parameters. Conversely, when the objective is to characterize a chemical or physicochemical modification, it should be taken care to work with the same surface topography throughout. This objective seems fairly achievable at the micro-scale but more challenging at the nanoscale.

## Acknowledgements

This work was supported by funding from the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Koropokkuru project (ANR-14-CE05-0004).

## Declaration of interest

None.

## References

- Alatraktchi, F.A., Zhang, Y., Noori, J.S., Angelidaki, I., 2012. Surface area expansion of electrodes with grass-like nanostructures and gold nanoparticles to enhance electricity generation in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 123, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.048>
- Albina, A., Taberna, P.L., Cambronne, J.P., Simon, P., Flahaut, E., Lebey, T., 2006. Impact of the surface roughness on the electrical capacitance. *Microelectron. J.* 37, 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.mejo.2005.10.008>
- Anitha, V.C., Lee, J.-H., Lee, J., Banerjee, A.N., Joo, S.W., Min, B.K., 2015. Biofilm formation on a TiO<sub>2</sub> nanotube with controlled pore diameter and surface wettability. *Nanotechnology* 26, 065102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/065102>
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D.P.B.T.B., Sarma, P.M., Pant, D., 2016. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renew. Energy, Special Issue: New Horizons in Biofuels Production and Technologies* 98, 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Bajracharya, S., Srikanth, S., Mohanakrishna, G., Zacharia, R., Strik, D.P., Pant, D., 2017. Biotransformation of carbon dioxide in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *J. Power Sources* 356, 256–273. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.04.024>
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition. ed. John Wiley & Sons, New York.
- Beech, W.B., Sunner, J., 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.001>
- Bergel, A., Féron, D., Mollica, A., 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun.* 7, 900–904. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2005.06.006>
- Berkeley, R.C.W., Society of Chemical Industry (Great Britain) (Eds.), 1980. *Microbial adhesion to surfaces*. Published for the Society of Chemical Industry, London by Ellis Horwood; New York: Distributors, North and South America and the rest of the world, Halsted Press, Chichester [West Sussex].
- Bharat Bhushan, 2000. *Surface Roughness Analysis and Measurement Techniques*, in: *Modern Tribology Handbook*, Two Volume Set, Mechanics & Materials Science. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Blanchet, E., Duquenne, F., Rafrafi, Y., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2015. Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction. *Energy Environ. Sci.* 8, 3731–3744. <https://doi.org/10.1039/C5EE03088A>
- Bockris, A.K.N.R., Maria E. Gamboa-A, John O'M, 2008. *Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrode Processes*, 2nd ed. 2000. ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Bombelli, P., Zarrouati, M., Thorne, R.J., Schneider, K., Rowden, S.J.L., Ali, A., Yunus, K., Cameron, P.J., Fisher, A.C., Ian Wilson, D., Howe, C.J., McCormick, A.J., 2012. Surface morphology and surface energy of anode materials influence power outputs in a multi-channel mediatorless bio-photovoltaic (BPV) system. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 14, 12221–12229. <https://doi.org/10.1039/c2cp42526b>
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- Borisova, T.I., Ershler, B.V., 1950. Determination of the zero voltage points of solid metals from measurements of the capacity of the double layer, *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, vol.24, pp.337-344, 1950.
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., Kim, B.H., 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813–4834. <https://doi.org/10.1039/C1EE02511B>
- Boyd, R.D., Verran, J., Jones, M.V., Bhakoo, M., 2002. Use of the Atomic Force Microscope To Determine the Effect of Substratum Surface Topography on Bacterial Adhesion. *Langmuir* 18, 2343–2346. <https://doi.org/10.1021/la011142p>
- Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Lett.* 46, 165–173. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90062-0)
- Carmona-Martinez, A.A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., Bernet, N., 2015. Long-term continuous production of H<sub>2</sub> in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. *Water Res.* 81, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.041>
- Cercado Quezada, 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. *Bioresour. Technol.* 134, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.123>
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2011. Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes. *Electrochem. Commun.* 13, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.02.015>
- Chabert, N., Amin Ali, O., Achouak, W., 2015. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.004>
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., Bergel, A., 2018. Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.005>
- Characklis, W.G., Marshall, K.C., 1990. *Biofilms*. Wiley, New York.
- Characklis, W.G., Wilderer, P.A., 1989. *Structure and function of biofilms: report of the Dahlem Workshop on Structure and Function of Biofilms*, Berlin, 1988, November 27-December 2. Wiley.

- Cogan, N.G., Keener, J.P., 2004. The role of the biofilm matrix in structural development. *Math. Med. Biol. J. IMA* 21, 147–166. <https://doi.org/10.1093/imammb/21.2.147>
- Costerton, J.W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15, 137–140. <https://doi.org/10.1007/BF01569816>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994>
- Czarnecki, J., Warszyński, P., 1987. The evaluation of tangential forces due to surface inhomogeneties in the particle deposition process. *Colloids Surf.* 22, 187–205. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(87\)80220-2](https://doi.org/10.1016/0166-6622(87)80220-2)
- Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- de Levie, R., 1989. On the impedance of electrodes with rough interfaces. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 261, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(89\)87121-9](https://doi.org/10.1016/0022-0728(89)87121-9)
- De Levie, R., 1965. The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements. *Electrochimica Acta* 10, 113–130. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(65\)87012-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(65)87012-8)
- Denis, F.A., Hanarp, P., Sutherland, D.S., Gold, J., Mustin, C., Rouxhet, P.G., Dufrière, Y.F., 2002. Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry. *Langmuir* 18, 819–828. <https://doi.org/10.1021/la011011o>
- Dewan, A., Ay, S.U., Karim, M.N., Beyenal, H., 2014. Alternative power sources for remote sensors: A review. *J. Power Sources* 245, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.06.081>
- Di Lorenzo, M., Curtis, T.P., Head, I.M., Scott, K., 2009. A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters. *Water Res.* 43, 3145–3154. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.005>
- Díaz, C., Cortizo, M.C., Schilardi, P.L., Saravia, S.G.G. de, Mele, M.A.F.L. de, 2007a. Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. *Mater. Res.* 10, 11–14. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000100004>
- Díaz, C., Salvarezza, R.C., Fernández Lorenzo de Mele, M.A., Schilardi, P.L., 2010. Organization of *Pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2, 2530–2539. <https://doi.org/10.1021/am100313z>
- Díaz, C., Schilardi, P.L., Salvarezza, R.C., Fernández Lorenzo de Mele, M., 2007b. Nano/Microscale Order Affects the Early Stages of Biofilm Formation on Metal Surfaces. *Langmuir* 23, 11206–11210. <https://doi.org/10.1021/la700650q>
- Dickinson, E.J.F., Streeter, I., Compton, R.G., 2008. Theory of Chronoamperometry at Cylindrical Microelectrodes and Their Arrays. *J. Phys. Chem. C* 112, 11637–11644. <https://doi.org/10.1021/jp801867e>
- Ding, C., Lv, M., Zhu, Y., Jiang, L., Liu, H., 2015. Wettability-Regulated Extracellular Electron Transfer from the Living Organism of *Shewanella loihica* PV-4. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1446–1451. <https://doi.org/10.1002/anie.201409163>
- Donoso, M.G., Méndez-Vilas, A., Bruque, J.M., González-Martin, M.L., 2007. On the relationship between common amplitude surface roughness parameters and surface area: Implications for the study of cell–material interactions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology 59, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.011>

- Douglass Jr., E.F., Driscoll, P.F., Liu, D., Burnham, N.A., Lambert, C.R., McGimpsey, W.G., 2008. Effect of Electrode Roughness On the Capacitive Behavior of Self-Assembled Monolayers. *Anal. Chem.* 80, 7670–7677. <https://doi.org/10.1021/ac800521z>
- Doyle, L.E., Marsili, E., 2015. Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. *Bioresour. Technol., Microbial Fuel Cells* 195, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.025>
- Doyle, R.J., 2001. *Microbial Growth in Biofilms: Developmental and molecular biological aspects.* Academic Press.
- Du, J., Catania, C., Bazan, G.C., 2014. Modification of Abiotic-Biotic Interfaces with Small Molecules and Nanomaterials for Improved Bioelectronics. *Chem. Mater.* 26, 686–697. <https://doi.org/10.1021/cm401912j>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008a. Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta* 53, 2494–2500. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.018>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008b. DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 53, 3200–3209. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.066>
- Duval, J.F.L., Gaboriaud, F., 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.002>
- Eberhard, A., 1972. Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *J. Bacteriol.* 109, 1101–1105.
- Edwards, K.J., Rutenberg, A.D., 2001. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chem. Geol., Experimental and Theoretical Geomicrobiology* 180, 19–32. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00303-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00303-5)
- ElMekawy, A., Hegab, H.M., Mohanakrishna, G., Elbaz, A.F., Bulut, M., Pant, D., 2016. Technological advances in CO<sub>2</sub> conversion electro-biorefinery: A step toward commercialization. *Bioresour. Technol., Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy* 215, 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.023>
- Epstein, A.K., Hong, D., Kim, P., Aizenberg, J., 2013. Biofilm attachment reduction on bioinspired, dynamic, micro-wrinkling surfaces. *New J. Phys.* 15, 095018. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/9/095018>
- Erable, B., Duteanu, N., Kumar, S.M.S., Feng, Y., Ghangrekar, M.M., Scott, K., 2009a. Nitric acid activation of graphite granules to increase the performance of the non-catalyzed oxygen reduction reaction (ORR) for MFC applications. *Electrochem. Commun.* 11, 1547–1549. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.057>
- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Erable, B., Roncato, M.-A., Achouak, W., Bergel, A., 2009b. Sampling Natural Biofilms: A New Route to Build Efficient Microbial Anodes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3194–3199. <https://doi.org/10.1021/es803549v>

- Erable, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Délia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., Bergel, A., 2010. Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry* 78, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.06.006>
- Fan, Y., Xu, S., Schaller, R., Jiao, J., Chaplen, F., Liu, H., 2011. Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1908–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.006>
- Feng, G., Cheng, Y., Wang, S.-Y., Borca-Tasciuc, D.A., Worobo, R.W., Moraru, C.I., 2015. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *Npj Biofilms Microbiomes* 1, npjbiofilms201522. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.22>
- Feng, H., Liang, Y., Guo, K., Chen, W., Shen, D., Huang, L., Zhou, Y., Wang, M., Long, Y., 2016. TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays Modified Titanium: A Stable, Scalable, and Cost-Effective Bioanode for Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3, 420–424. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00410>
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flint, S.H., Brooks, J.D., Bremer, P.J., 2000. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.* 43, 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00157-0)
- Fornero, J.J., Rosenbaum, M., Angenent, L.T., 2010. Electric Power Generation from Municipal, Food, and Animal Wastewaters Using Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis* 22, 832–843. <https://doi.org/10.1002/elan.200980011>
- Fredrickson, J.K., Romine, M.F., Beliaev, A.S., Auchtung, J.M., Driscoll, M.E., Gardner, T.S., Nealon, K.H., Osterman, A.L., Pinchuk, G., Reed, J.L., Rodionov, D.A., Rodrigues, J.L.M., Saffarini, D.A., Serres, M.H., Spormann, A.M., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M., 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>
- Gabe, D.R., Wilcox, G.D., Gonzalez-Garcia, J., Walsh, F.C., 1998. The rotating cylinder electrode: its continued development and application. *J. Appl. Electrochem.* 28, 759–780. <https://doi.org/10.1023/A:1003464415930>
- Gaboriaud, F., Gee, M.L., Strugnell, R., Duval, J.F.L., 2008. Coupled electrostatic, hydrodynamic, and mechanical properties of bacterial interfaces in aqueous media. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 24, 10988–10995. <https://doi.org/10.1021/la800258n>
- Gamburg, D.Y.D., Zangari, D.G., 2011. Current Distribution at Rough Electrodes, in: *Theory and Practice of Metal Electrodeposition*. Springer New York, pp. 169–187. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9669-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9669-5_8)
- Girguis, P.R., Nielsen, M.E., Figueroa, I., 2010. Harnessing energy from marine productivity using bioelectrochemical systems. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 21, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.015>

- Goller, C.C., Romeo, T., 2008. Environmental influences on biofilm development. *Bact. Biofilms* 322, 37–66. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_3)
- Grattieri, M., Minteer, S.D., 2018. Microbial fuel cells in saline and hypersaline environments: Advancements, challenges and future perspectives. *Bioelectrochemistry* 120, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.004>
- Grayson, A.C.R., Shawgo, R.S., Johnson, A.M., Flynn, N.T., Li, Y., Cima, M.J., Langer, R., 2004. A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proc. IEEE* 92, 6–21. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2003.820534>
- Guo, K., Donose, B.C., Soeriyadi, A.H., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Freguia, S., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2014. Flame Oxidation of Stainless Steel Felt Enhances Anodic Biofilm Formation and Current Output in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7151–7156. <https://doi.org/10.1021/es500720g>
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2013. Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- Guo, W., Cui, Y., Song, H., Sun, J., 2014. Layer-by-layer construction of graphene-based microbial fuel cell for improved power generation and methyl orange removal. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1749–1758. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1148-y>
- He, Y.-R., Xiao, X., Li, W.-W., Sheng, G.-P., Yan, F.-F., Yu, H.-Q., Yuan, H., Wu, L.-J., 2012. Enhanced electricity production from microbial fuel cells with plasma-modified carbon paper anode. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 14, 9966–9971. <https://doi.org/10.1039/c2cp40873b>
- Heinze, J., 1993. Ultramicroelectrodes in Electrochemistry. *Angew. Chem.-Int. Ed.* 32, 1268–1288. <https://doi.org/10.1002/anie.199312681>
- Helbig, R., Günther, D., Friedrichs, J., Röbller, F., Lasagni, A., Werner, C., 2016. The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion. *Biomater. Sci.* 4, 1074–1078. <https://doi.org/10.1039/C6BM00078A>
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 14, 105–119. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00029-6)
- Hochbaum, A.I., Aizenberg, J., 2010. Bacteria Pattern Spontaneously on Periodic Nanostructure Arrays. *Nano Lett.* 10, 3717–3721. <https://doi.org/10.1021/nl102290k>
- Hori, K., Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J., Invited Review Issue* 2010 48, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>
- In Ho, P., Gnana Kumar, G., Kim, A.R., Kim, P., Suk Nahm, K., 2011. Microbial electricity generation of diversified carbonaceous electrodes under variable mediators. *Bioelectrochemistry* 80, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.06.007>
- Inoue, S., Parra, E.A., Higa, A., Jiang, Y., Wang, P., Buie, C.R., Coates, J.D., Lin, L., 2012. Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements. *Sens. Actuators Phys., 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems* 177, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.09.023>

- Irie, Y., Parsek, M.R., 2008. Quorum Sensing and Microbial Biofilms, in: *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 67–84. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4)
- Ivanova, E.P., Truong, V.K., Webb, H.K., Baulin, V.A., Wang, J.Y., Mohammadi, N., Wang, F., Fluke, C., Crawford, R.J., 2011. Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Sci. Rep.* 1. <https://doi.org/10.1038/srep00165>
- Jia, X., He, Z., Zhang, X., Tian, X., 2016. Carbon paper electrode modified with TiO<sub>2</sub> nanowires enhancement bioelectricity generation in microbial fuel cell. *Synth. Met.* 215, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.02.015>
- Kano, T., Suito, E., Hishida, K., Miki, N., 2012. Effect of Microscale Surface Geometry of Electrodes on Performance of Microbial Fuel Cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51, 06FK04. <https://doi.org/10.1143/JJAP.51.06FK04>
- Kant, R., 2010. General Theory of Arbitrary Potential Sweep Methods on an Arbitrary Topography Electrode and Its Application to Random Surface Roughness. *J. Phys. Chem. C* 114, 10894–10900. <https://doi.org/10.1021/jp1022339>
- Kant, R., 1993. Can current transients be affected by the morphology of the nonfractal electrode? *Phys. Rev. Lett.* 70, 4094–4097. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.70.4094>
- Kant, R., Rangarajan, S.K., 1995. Diffusion to rough interfaces: finite charge transfer rates. *J. Electroanal. Chem.* 396, 285–301. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(95\)03971-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(95)03971-1)
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1646–1654. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>
- Ke, Y., Zahid, F., Timoshevskii, V., Xia, K., Gall, D., Guo, H., 2009. Resistivity of thin Cu films with surface roughness. *Phys. Rev. B* 79, 155406. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.79.155406>
- Khare, P., Ramkumar, J., Verma, N., 2016. Carbon Nanofiber-skinned Three Dimensional Ni/Carbon Micropillars: High Performance Electrodes of a Microbial Fuel Cell. *Electrochimica Acta* 219, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.09.140>
- Kim, B.H., Kim, H.J., Hyun, M.S., Park, D.H., 1999. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 127–131.
- Kim, J., Hwan Ko, J., Lee, J., Jun Kim, M., Byun, D., 2014. Power enhancement of a  $\mu$ l-scale microbial fuel cells by surface roughness. *Appl. Phys. Lett.* 104, 223702. <https://doi.org/10.1063/1.4880596>
- Kip, N., van Veen, J.A., 2015. The dual role of microbes in corrosion. *Isme J.* 9, 542–551. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.169>
- Klapper, I., Dockery, J., 2002. Finger Formation in Biofilm Layers. *SIAM J. Appl. Math.* 62, 853–869. <https://doi.org/10.1137/S0036139900371709>
- Koch, C., Harnisch, F., 2016. Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem* 3, 1282–1295. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>
- Kokko, M., Epple, S., Gescher, J., Kerzenmacher, S., n.d. Effects of wastewater constituents and operational conditions on the composition and dynamics of anodic microbial communities in bioelectrochemical systems. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.090>

- Kumar, A., Hsu, L.H.-H., Kavanagh, P., Barrière, F., Lens, P.N.L., Lapinsonnière, L., Lienhard V, J.H., Schröder, U., Jiang, X., Leech, D., 2017. The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. *Nat. Rev. Chem.* 1, 0024. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>
- Kumar, G.G., Sarathi, V.G.S., Nahm, K.S., 2013. Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 43, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>
- Lai, B., Tang, X., Li, H., Du, Z., Liu, X., Zhang, Q., 2011. Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 28, 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.050>
- Lapinsonnière, L., Picot, M., Poriel, C., Barrière, F., 2013. Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances. *Electroanalysis* 25, 601–605. <https://doi.org/10.1002/elan.201200351>
- Leopold, M.C., Bowden, E.F., 2002. Influence of Gold Substrate Topography on the Voltammetry of Cytochrome c Adsorbed on Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* 18, 2239–2245. <https://doi.org/10.1021/la011456c>
- Li, Baitao, Zhou, J., Zhou, X., Wang, X., Li, Baikun, Santoro, C., Grattieri, M., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., Schuler, A.J., 2014. Surface Modification of Microbial Fuel Cells Anodes: Approaches to Practical Design. *Electrochimica Acta* 134, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.136>
- Li, S., Cheng, C., Thomas, A., 2017. Carbon-Based Microbial-Fuel-Cell Electrodes: From Conductive Supports to Active Catalysts. *Adv. Mater.* 29, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/adma.201602547>
- Lidan, L., Yong, X., Yicheng, W., Bilian, C., Feng, Z., 2014. Electron Transfer Mediators in Microbial Electrochemical Systems. *Prog. Chem.* 26, 1859–1866. <https://doi.org/10.7536/PC140740>
- Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982–8989. <https://doi.org/10.1039/C2EE22459C>
- Liu, J. I., Lowy, D. a., Baumann, R. g., Tender, L. m., 2007. Influence of anode pretreatment on its microbial colonization. *J. Appl. Microbiol.* 102, 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03051.x>
- Liu, Y., Kim, H., Franklin, R., R. Bond, D., 2010. Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 3, 1782–1788. <https://doi.org/10.1039/C0EE00242A>
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>
- Lorenzetti, M., Dogša, I., Stošicki, T., Stopar, D., Kalin, M., Kobe, S., Novak, S., 2015. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 1644–1651. <https://doi.org/10.1021/am507148n>
- Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., Rotaru, A.-E., Holmes, D.E., Franks, A.E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K.P., 2011. *Geobacter*: the microbe electric’s physiology, ecology, and practical applications. *Adv. Microb. Physiol.* 59, 1–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>

- Lowy, D.A., Tender, L.M., Zeikus, J.G., Park, D.H., Lovley, D.R., 2006. Harvesting energy from the marine sediment–water interface II: Kinetic activity of anode materials. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2058–2063. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.033>
- Lu, M., Guo, L., Kharkwal, S., Wu, H., Ng, H.Y., Li, S.F.Y., 2013. Manganese–polypyrrole–carbon nanotube, a new oxygen reduction catalyst for air-cathode microbial fuel cells. *J. Power Sources* 221, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.08.034>
- Lu, M., Qian, Y., Huang, L., Xie, X., Huang, W., 2015. Improving the Performance of Microbial Fuel Cells through Anode Manipulation. *Chempluschem* 80, 1216–+. <https://doi.org/10.1002/cplu.201500200>
- Lu, N., Zhang, W., Weng, Y., Chen, X., Cheng, Y., Zhou, P., 2016. Fabrication of PDMS surfaces with micro patterns and the effect of pattern sizes on bacteria adhesion. *Food Control* 68, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.014>
- Lu, Z., Chang, D., Ma, J., Huang, G., Cai, L., Zhang, L., 2015. Behavior of metal ions in bioelectrochemical systems: A review. *J. Power Sources* 275, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.10.168>
- Maestro, B., Ortiz, J.M., Schrott, G., Busalmen, J.P., Climent, V., Feliu, J.M., 2014. Crystallographic orientation and electrode nature are key factors for electric current generation by *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry* 98, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.02.001>
- Marshall, K.C. (Ed.), 1984. *Microbial Adhesion and Aggregation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70137-5>
- Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971. Selective sorption of bacteria from seawater. *Can. J. Microbiol.* 17, 1413–1416. <https://doi.org/10.1139/m71-225>
- Matturro, B., Cruz Viggi, C., Aulenta, F., Rossetti, S., 2017. Cable Bacteria and the Bioelectrochemical Snorkel: The Natural and Engineered Facets Playing a Role in Hydrocarbons Degradation in Marine Sediments. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00952>
- Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L.Y., Wanner, O., Harms, H., 2002. Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. *Biofouling* 18, 193–203. <https://doi.org/10.1080/08927010290011370>
- Mehanna, M., Basseguy, R., Delia, M.-L., Bergel, A., 2009. Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels. *Electrochem. Commun.* 11, 568–571. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.12.019>
- Menshykau, D., Compton, R.G., 2009. Influence of Electrode Roughness on Stripping Voltammetry: Mathematical Modeling and Numerical Simulation. *J. Phys. Chem. C* 113, 15602–15620. <https://doi.org/10.1021/jp904187t>
- Menshykau, D., Streeter, I., Compton, R.G., 2008. Influence of Electrode Roughness on Cyclic Voltammetry. *J. Phys. Chem. C* 112, 14428–14438. <https://doi.org/10.1021/jp8047423>
- Monds, R.D., O’Toole, G.A., 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Müller, B., 2001. Impact of nanometer-scale roughness on contact-angle hysteresis and globulin adsorption. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanometer Struct. Process. Meas. Phenom.* 19, 1715–1720. <https://doi.org/10.1116/1.1392402>

- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313–322.
- Nyikos, L., Pajkossy, T., 1986. Diffusion to fractal surfaces. *Electrochimica Acta* 31, 1347–1350. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(86\)80160-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(86)80160-8)
- Oliot, M., Galier, S., Roux de Balman, H., Bergel, A., 2016. Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review. *Appl. Energy* 183, 1682–1704. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Pajkossy, T., Nyikos, L., 1989a. Diffusion to fractal surfaces—II. Verification of theory. *Electrochimica Acta* 34, 171–179. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(89\)87082-3](https://doi.org/10.1016/0013-4686(89)87082-3)
- Pajkossy, T., Nyikos, L., 1989b. Diffusion to fractal surfaces—III. Linear sweep and cyclic voltammograms. *Electrochimica Acta* 34, 181–186. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(89\)87083-5](https://doi.org/10.1016/0013-4686(89)87083-5)
- Parveen, Kant, R., 2016. Theory for Cyclic Staircase Voltammetry of Two Step Charge Transfer Mechanism at Rough Electrodes. *J. Phys. Chem. C* 120, 4306–4321. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00810>
- Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2017. Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* 244, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.019>
- Peng, L., You, S.-J., Wang, J.-Y., 2010. Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.002>
- Perni, S., Preedy, E.C., Prokopovich, P., 2014. Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci., Manuel G. Velarde* 206, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.008>
- Pfeifer, P., Wu, Y.J., Cole, M.W., Krim, J., 1989. Multilayer adsorption on a fractally rough surface. *Phys. Rev. Lett.* 62, 1997–2000. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.1997>
- Pham, T.H., Aelterman, P., Verstraete, W., 2009. Bioanode performance in bioelectrochemical systems: recent improvements and prospects. *Trends Biotechnol.* 27, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.005>
- Picot, M., Lapinsonnière, L., Rothballer, M., Barrière, F., 2011. Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output. *Biosens. Bioelectron.* 28, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.017>
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2012a. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652. <https://doi.org/10.1039/C2EE22429A>
- Pocaznoi, D., Erable, B., Délia, M.-L., Bergel, A., 2012b. Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability. *Energy Environ. Sci.* 5, 5287–5296. <https://doi.org/10.1039/C1EE01469B>
- Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012c. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 13332–13343. <https://doi.org/10.1039/C2CP42571H>

- Pons, Liz, Délia, M.-L., Basséguy, R., Bergel, A., 2011. Effect of the semi-conductive properties of the passive layer on the current provided by stainless steel microbial cathodes. *Electrochimica Acta* 56, 2682–2688. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.12.039>
- Pons, L., Délia, M.-L., Bergel, A., 2011. Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresour. Technol.* 102, 2678–2683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.138>
- Popat, S.C., Torres, C.I., 2016. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.136>
- Popov, K.I., Nikolić, N.D., Živković, P.M., Branković, G., 2010. The effect of the electrode surface roughness at low level of coarseness on the polarization characteristics of electrochemical processes. *Electrochimica Acta* 55, 1919–1925. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.10.085>
- Qiao, Y., Li, C.M., Bao, S.-J., Bao, Q.-L., 2007. Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *J. Power Sources* 170, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.03.048>
- Quan, X., Sun, B., Xu, H., 2015. Anode decoration with biogenic Pd nanoparticles improved power generation in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 182, 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.157>
- Rabaey, K., Girguis, P., Nielsen, L.K., 2011. Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.010>
- Rammelt, U., Reinhard, G., 1990. On the applicability of a constant phase element (CPE) to the estimation of roughness of solid metal electrodes. *Electrochimica Acta* 35, 1045–1049. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(90\)90040-7](https://doi.org/10.1016/0013-4686(90)90040-7)
- Real, S.G., Vilche, J.R., Arvia, A.J., 1992. The impedance response of electrochemically roughened platinum electrodes. Surface modeling and roughness decay. *J. Electroanal. Chem., An International Journal Devoted to all Aspects of Electrode Kinetics, Interfacial Structure, Properties of Electrolytes, Colloid and Biological Electrochemistry* 341, 181–195. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(92\)80483-K](https://doi.org/10.1016/0022-0728(92)80483-K)
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Fertig, S., Wang, W., 2001. Harvesting Energy from the Marine Sediment–Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* 35, 192–195. <https://doi.org/10.1021/es001223s>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R., 2008. Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. *Langmuir* 24, 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Rimboud, M., Bergel, A., Erable, B., 2016. Multiple electron transfer systems in oxygen reducing biocathodes revealed by different conditions of aeration/agitation. *Bioelectrochemistry* 110, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.03.002>
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* 16, 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/c4cp01698j>
- Ringeisen, B.R., Henderson, E., Wu, P.K., Pietron, J., Ray, R., Little, B., Biffinger, J.C., Jones-Meehan, J.M., 2006. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2629–2634. <https://doi.org/10.1021/es052254w>

- Rosenbaum, M., Zhao, F., Quaas, M., Wulff, H., Schröder, U., Scholz, F., 2007. Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Appl. Catal. B Environ.* 74, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.02.013>
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* 33, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.002>
- Sánchez-Molas, D., Esquivel, J.P., Sabaté, N., Muñoz, F.X., del Campo, F.J., 2012. High Aspect-Ratio, Fully Conducting Gold Micropillar Array Electrodes: Silicon Micromachining and Electrochemical Characterization. *J. Phys. Chem. C* 116, 18831–18846. <https://doi.org/10.1021/jp305339k>
- Santoro, C., Artyushkova, K., Gajda, I., Babanova, S., Serov, A., Atanassov, P., Greenman, J., Colombo, A., Trasatti, S., Ieropoulos, I., Cristiani, P., 2015. Cathode materials for ceramic based microbial fuel cells (MFCs). *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd Euro-Mediterranean Hydrogen Technologies Conference (EmHyTeC2014), 9–12 December 2014, Taormina, Italy 40, 14706–14715. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.054>
- Santoro, C., Guilizzoni, M., Correa Baena, J.P., Pasaogullari, U., Casalegno, A., Li, B., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., 2014. The effects of carbon electrode surface properties on bacteria attachment and start up time of microbial fuel cells. *Carbon* 67, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.071>
- Scheider, W., 1975. Theory of the frequency dispersion of electrode polarization. Topology of networks with fractional power frequency dependence. *J. Phys. Chem.* 79, 127–136. <https://doi.org/10.1021/j100569a008>
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Scott, K., Rimbu, G.A., Katuri, K.P., Prasad, K.K., Head, I.M., 2007. Application of Modified Carbon Anodes in Microbial Fuel Cells. *Process Saf. Environ. Prot.* 85, 481–488. <https://doi.org/10.1205/psep07018>
- Sharma, N., Goswami, N., Kant, R., 2017. Experimental corroboration of the theory of chronoamperometry at high roughness electrode for reversible charge transfer. *J. Electroanal. Chem.* 788, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.01.058>
- Sharma, T., Mohana Reddy, A.L., Chandra, T.S., Ramaprabhu, S., 2008. Development of carbon nanotubes and nanofluids based microbial fuel cell. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 6749–6754. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.112>
- Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R., Steinberg, D., 2010. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol.* 10, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-51>
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H.-Q., Fredrickson, J.K., 2016. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 651–662. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
- Shleev, S., Bergel, A., Gorton, L., 2015. Biological fuel cells: Divergence of opinion. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.006>

- Singh, A.V., Vyas, V., Patil, R., Sharma, V., Scopelliti, P.E., Bongiorno, G., Podestà, A., Lenardi, C., Gade, W.N., Milani, P., 2011. Quantitative Characterization of the Influence of the Nanoscale Morphology of Nanostructured Surfaces on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025029>
- Siu, C.P.B., Chiao, M., 2008. A Microfabricated PDMS Microbial Fuel Cell. *J. Microelectromechanical Syst.* 17, 1329–1341. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2008.2006816>
- Soussan, L., Erable, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2013. The open circuit potential of *Geobacter sulfurreducens* bioanodes depends on the electrochemical adaptation of the strain. *Electrochem. Commun.* 33, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.013>
- Stout, K., 2000. Development of methods for the characterisation of roughness in three dimensions, Rev. repr. ed. Penton Press, London.
- Streeter, I., Baron, R., Compton, R.G., 2007. Voltammetry at Nanoparticle and Microparticle Modified Electrodes: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. C* 111, 17008–17014. <https://doi.org/10.1021/jp076923z>
- Streeter, I., Compton, R.G., 2007. Diffusion-limited currents to nanoparticles of various shapes supported on an electrode; Spheres, hemispheres, and distorted spheres and hemispheres. *J. Phys. Chem. C* 111, 18049–18054. <https://doi.org/10.1021/jp076593i>
- Sun, M., Zhang, F., Tong, Z.-H., Sheng, G.-P., Chen, Y.-Z., Zhao, Y., Chen, Y.-P., Zhou, S.-Y., Liu, G., Tian, Y.-C., Yu, H.-Q., 2010. A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosens. Bioelectron.* 26, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.010>
- Tao, Y., Liu, Q., Chen, J., Wang, B., Wang, Y., Liu, K., Li, M., Jiang, H., Lu, Z., Wang, D., 2016. Hierarchically Three-Dimensional Nanofiber Based Textile with High Conductivity and Biocompatibility As a Microbial Fuel Cell Anode. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7889–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00648>
- Thung, W.-E., Ong, S.-A., Ho, L.-N., Wong, Y.-S., Ridwan, F., Oon, Y.-L., Oon, Y.-S., Lehl, H.K., 2016. Bioelectricity Generation in Batch-Fed Up-Flow Membrane-Less Microbial Fuel Cell: Effect of Surface Morphology of Carbon Materials as Aqueous Biocathodes. *Water. Air. Soil Pollut.* 227, 254. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2961-5>
- Torres, C.I., Marcus, A.K., Rittmann, B.E., 2008. Proton Transport Inside the Biofilm Limits Electrical Current Generation by Anode-Respiring Bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881. <https://doi.org/10.1002/bit.21821>
- Truong, V.K., Rundell, S., Lapovok, R., Estrin, Y., Wang, J.Y., Berndt, C.C., Barnes, D.G., Fluke, C.J., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Effect of ultrafine-grained titanium surfaces on adhesion of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 925–937. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1944-5>
- Ubbink, J., Schaer-Zammaretti, P., 2007. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.08.004>
- Van Oss, C.J., 1989. Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biophys.* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1007/BF02797387>
- Van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K., 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378–390. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90041-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90041-X)

- Vasudevan, R., Kennedy, A.J., Merritt, M., Crocker, F.H., Baney, R.H., 2014. Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.037>
- Wagner, R.C., Call, D.I., Logan, B.E., 2010. Optimal Set Anode Potentials Vary in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6036–6041. <https://doi.org/10.1021/es101013e>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Webb, H.K., Truong, V.K., Hasan, J., Fluke, C., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2012. Roughness Parameters for Standard Description of Surface Nanoarchitecture. *Scanning* 34, 257–263. <https://doi.org/10.1002/sca.21002>
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 9335–9344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>
- Whitehead, K.A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C., Verran, J., 2006. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 51, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.003>
- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 3418–3441. <https://doi.org/10.1039/C5EE01862E>
- Xu, H., Quan, X., Xiao, Z., Chen, L., 2018. Effect of anodes decoration with metal and metal oxides nanoparticles on pharmaceutically active compounds removal and power generation in microbial fuel cells. *Chem. Eng. J.* 335, 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.159>
- Yang, M., Ding, Y., Ge, X., Leng, Y., 2015. Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.010>
- Ye, Z., Ellis, M.W., Nain, A.S., Behkam, B., 2017. Effect of electrode sub-micron surface feature size on current generation of *Shewanella oneidensis* in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 347, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.032>
- Ye, Z., Hou, J., Ellis, M.W., Behkam, B., 2012. Effect of Anode Surface Roughness on Power Generation in Microbial Fuel Cells 1409–1414. <https://doi.org/10.1115/IMECE2012-88643>
- You, J., Santoro, C., Greenman, J., Melhuish, C., Cristiani, P., Li, B., Ieropoulos, I., 2014. Micro-porous layer (MPL)-based anode for microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 21811–21818. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.136>
- Zabihallahpoor, A., Rahimnejad, M., Talebnia, F., 2015. Sediment microbial fuel cells as a new source of renewable and sustainable energy: present status and future prospects. *RSC Adv.* 5, 94171–94183. <https://doi.org/10.1039/c5ra15279h>
- Zhao, C., Wang, Y., Shi, F., Zhang, J., Zhu, J.-J., 2013. High biocurrent generation in *Shewanella*-inoculated microbial fuel cells using ionic liquid functionalized graphene nanosheets as an anode. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 49, 6668–6670. <https://doi.org/10.1039/c3cc42068j>
- Zhou, Y., Zhou, G., Yin, L., Guo, J., Wan, X., Shi, H., 2017. High-Performance Carbon Anode Derived from Sugarcane for Packed Microbial Fuel Cells. *ChemElectroChem* 4, 168–174. <https://doi.org/10.1002/celec.201600510>

Zhu, X., Yates, M.D., Logan, B.E., 2012. Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms. *Electrochem. Commun.* 22, 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2012.06.013>





# *Chapitre 2: Matériels et méthodes*



## 1. INOCULA

Deux sources de micro-organismes différentes ont été utilisées. La majorité de la thèse a été effectuée sur la base de cultures pures (Chapitre 3 à 5) alors que la dernière phase a été menée à partir d'un inoculum provenant du milieu naturel (Chapitre 6).

### 1.1. *Geobacter sulfurreducens*

Pour la première partie de la thèse, il a été choisi d'inoculer les milieux et donc les électrodes par une culture pure afin de s'affranchir de la variabilité associée aux communautés microbiennes multi-espèces. Du fait de la complexité des phénomènes à étudier, le choix de travailler avec *Geobacter sulfurreducens* repose sur l'importante bibliographie disponible sur cette espèce. La souche de *G. sulfurreducens* est commandée chez DSMZ (Braunschweig, Allemagne). Il s'agit de la souche PCA (DSM n°12127), l'une des plus fréquemment rencontrée dans la littérature. Elle est livrée sous forme active en milieu liquide et conservée à 4°C. Le stock est régulièrement renouvelé.

### 1.2. Sédiments de marais salants

Dans un second temps, un inoculum multi-espèces est utilisé. Il s'agit de sédiments prélevés dans un étier de marais salants (Salins de Saint Martin, Gruissan ; coordonnées GPS : 43°05'33.4"N 3°04'59.0"E). Le prélèvement des sédiments est effectué à une profondeur de plus de 50 cm pour atteindre des couches sédimentaires fortement anaérobies. Les sédiments sont conservés dans un bidon étanche à température ambiante et sont remplacés tous les 6 mois. Des travaux de thèse antérieurs sur des sédiments prélevés au même endroit n'ont démontré aucune altération de la qualité microbiologique des inocula (Rousseau, 2013).

## 2. MILIEUX SYNTHÉTIQUES

L'ensemble des études est réalisé en milieux synthétiques étant donné que les travaux portent sur la compréhension de phénomènes sans une finalité de transposition directe en conditions réelles.

### 2.1. Milieu et mise en culture pour *Geobacter sulfurreducens*

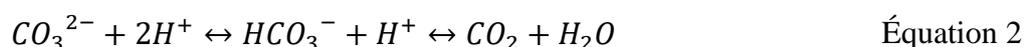
Pour les pré-cultures et les cultures de *Geobacter sulfurreducens*, le milieu synthétique utilisé est le milieu minimum utilisé précédemment au sein de l'équipe (Dumas et al., 2008c; Soussan et al., 2013b) pour les études concernant cette souche : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.6 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (1.5 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (2.5 g/L), KCl (0.1 g/L). De l'acétate de sodium est ajouté comme seul donneur d'électrons présent dans le milieu à 10 mM. La stérilisation du milieu s'effectue par autoclavage à 121°C et 1 bar pendant 20 minutes. Ce milieu est ensuite complété avec 10 mL/L d'une solution stérile de vitamines (ATCC MD-VS) et 10 mL/L d'une solution stérile de micronutriments (ATCC MD-TMS).

Lors de préparation de l'inoculum de *Geobacter sulfurreducens*, la préculture est effectuée en ajoutant du fumarate de sodium (50 mM) comme accepteur d'électrons. Le fumarate ne pouvant être autoclavé, une solution mère à 500 mM est filtrée stérilement à 0,22 µm et ajoutée à 10% (v/v) dans le milieu pour avoir une concentration de 50 mM. La préculture est préparée dans un flacon Schott stérile et fermé hermétiquement par un septum et une bague de serrage. Le milieu est désoxygéné par un bullage de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) pendant 10 minutes puis l'inoculation de la préculture avec la souche commerciale de *Geobacter sulfurreducens* est effectuée (2 % v/v). Le bullage est maintenu pendant 1 minute après ajout de bactéries puis la préculture est placée à 30°C pendant 3 jours.

L'inoculum ainsi préparé est en fin de phase active de croissance. Un volume de 2 mL de la préculture est prélevé et la densité optique (DO) est mesurée à 620 nm avant l'ensemencement des réacteurs. On ajuste le volume d'inoculation des réacteurs en fonction de la mesure de la DO afin d'obtenir une quantité de cellules inoculées identique à un volume de 30 mL présentant une DO de 0,4 à 620 nm. Le volume d'inoculation est ajusté en se basant sur la relation entre la concentration en cellules d'une suspension de *G. sulfurreducens* et la DO obtenue au cours des travaux de Claire Dumas (2007) :

$$C_{Geobacter} = DO_{620\text{ nm}} \times 472067 \quad (UFC.mL^{-1}) \quad \text{Équation 1}$$

Au sein des réacteurs, l'inoculation est effectuée dans un milieu identique à celui utilisé pour la pré-culture mais sans ajouter d'accepteur d'électrons sous forme de fumarate afin d'orienter les bactéries vers l'électrode. L'inoculation n'est réalisée qu'après 20 minutes de bullage de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) afin d'assurer les conditions anaérobies. Il est à noter que le dioxyde de carbone injecté dans ce mélange gazeux permet d'équilibrer le pH du milieu à 6,8 grâce au phénomène tampon lié à la prédominance des espèces ioniques en solution des carbonates :



## 2.2. Milieu synthétique pour les sédiments

Pour les expériences réalisées à partir de sédiments marins, un milieu de composition minimale et proche de celle l'eau de mer est utilisé. Sur la base du milieu de Starkey, la composition simplifiée utilisée est : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (1 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.1 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O (2 g/L) dans une solution de NaCl (45 g/L). Les sédiments sont ajoutés au milieu à différents taux en fonction des expériences (20%, 10%, 5% ou 2% v/v) et mélangés par agitation magnétique pendant une nuit avant d'être répartis dans les différents réacteurs (500 mL) pour homogénéiser l'inoculation. Deux donneurs d'électrons sont ajoutés : du lactate de sodium à 30 mM et de l'acétate de sodium à 40 mM. Le milieu est désoxygéné par bullage de N<sub>2</sub> pendant 20 minutes.

### 3. DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX

#### 3.1. Les électrodes

Les expériences ont été réalisées dans des montages classiques à trois électrodes. La surface d'anode étudiée comme électrode de travail est mise en œuvre avec une contre électrode composée d'une grille de platine et une électrode de référence commerciale au calomel saturé (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/KCl<sub>sat</sub>, ECS, Radiometer). Le potentiel de cette électrode est de  $+0.244 \pm 0.01$  V/ESH. Il est vérifié avant l'implantation dans le réacteur avec une électrode de référence ECS neuve.

De nombreuses anodes ont été utilisées au cours des expériences en culture pure ainsi qu'en inoculum « sédiments marins ». Les électrodes en feutre de carbone et graphite sont principalement utilisées comme témoins et valeurs références, les électrodes en or pour investiguer le comportement du biofilm et enfin les électrodes en cuivre pour des tests préliminaires.

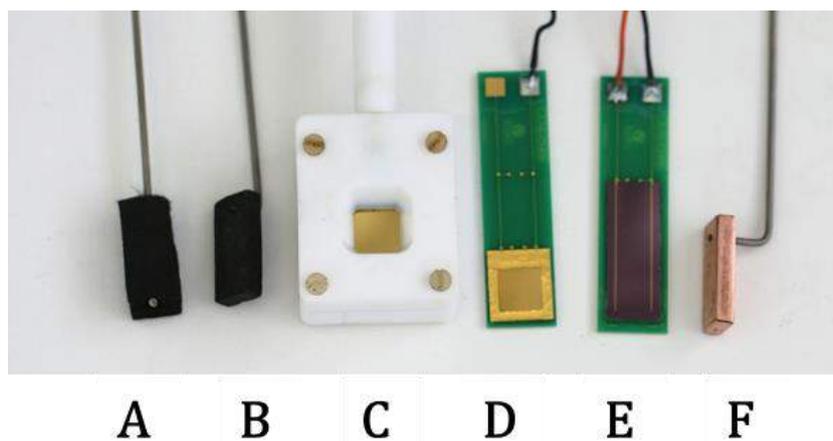


Figure 1 : Les différentes électrodes utilisées en anode au cours des travaux de thèse.  
(A) Feutre de carbone, (B) Graphite, (C) Or plan, (D) Or structuré, (E) Or en bandes, (F) Cuivre

##### 3.1.1. Anodes en carbone

Deux types d'électrodes à base de carbone sont utilisés. Du feutre de carbone (RVG 4000, Mersen, France) est employé comme anode pour les essais avec les sédiments marins. La surface projetée de l'électrode est de 3 cm<sup>2</sup>. Le feutre est une structure souple et poreuse constituée d'un enchevêtrement de fibres de carbone sur une épaisseur de 10 mm. La connectique est assurée par le passage d'une tige de titane (Alfa Aesar, diam. 2mm) au sein du réseau de fibres (Figure 1.A). L'autre matériau employé en anode pour les cultures pures de *Geobacter sulfurreducens* est du graphite plan, forme cristalline du carbone, (C000350, Goodfellow). Un coupon de surface projetée de 3 cm<sup>2</sup> et d'une épaisseur de 5 mm est taraudé et une tige de titane fileté est vissée au coupon pour assurer la connectique (Figure 1.B).

### 3.1.2. Anodes en or

Les différentes configurations des surfaces des électrodes en or ont été conçues en concertation avec nos partenaires du LAAS. La réalisation des surfaces d'or a été effectuée successivement par Cyril Renault-Sentenac et David Bourrier. Les surfaces réalisées résultent d'un compromis entre les contraintes de fabrication, les contraintes d'implantation au sein des réacteurs biotiques et des objectifs recherchés. La base des surfaces d'or est toujours la même, il s'agit d'un support de silicium Si(100) de type P (BT Electronics) de dimensions  $1.9 \times 1.6$  cm. Quatre catégories différentes d'électrodes ont été réalisées :

- Surfaces planes: SG pour Smooth Gold

Sur la base de silicium, une couche d'or de 250 nm d'épaisseur est déposée par évaporation. Cette surface, d'une rugosité moyenne  $S_a$  de 0,8 nm, constitue les électrodes notées SG. Pour être opérationnelles, ces électrodes ont été insérées dans un support en téflon qui sera décrit au paragraphe 3.1.3. (Figure 1.C)

- Surfaces rugueuses et poreuses : NG, MG et PG pour Nano-, Micro-rough et Porous Gold

A partir de la surface SG précédemment décrite, les électrodes notées NG, MG et PG sont formées par croissance électrolytique d'or. Les surfaces SG sont plongées dans un bain d'acide tétrachloraurique ( $\text{HAuCl}_4$ , 2 mM) et d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96%, 2 mM) comportant une contre-électrode. Une densité de courant est appliquée pendant 10 minutes afin de déposer l'or. Différentes densités de courant sont appliquées aux électrodes afin de former des dépôts d'or plus ou moins rugueux ou poreux. La surface d'or NG de 1,75  $\mu\text{m}$  d'épaisseur présentant une rugosité moyenne  $S_a$  de 4,5 nm est obtenue avec une densité de courant de 0,0074 A/cm<sup>2</sup>. En augmentant les densités de courant, des surfaces de plus en plus rugueuses sont obtenues. Ainsi les surfaces les plus rugueuses (MG-1 à MG-4) sont formées à des densités de courant croissantes (0,35 A/m<sup>2</sup> ; 0,69 A/m<sup>2</sup>, 1,39 A/m<sup>2</sup> and 2,08 A/m<sup>2</sup>) et une structure poreuse PG est obtenue pour une densité de courant de 5 A/m<sup>2</sup>.

- Surfaces micro-structurées avec piliers :  $\mu\text{PNG}$  pour microPillar Nano-rough Gold

Une couche de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de résine époxy photosensible (SU-8 3050, MicroChemicals Corporation) est déposée sur la base de silicium. Un masque est créé avec des trous carrés de  $100 \times 100 \mu\text{m}$  plus ou moins espacés. Le masque correspond à l'implantation souhaitée des piliers. La résine est ensuite exposée à un rayonnement UV à travers le masque. La révélation par une solution de SU8-developer (MicroChemicals Corporation) permet de conserver uniquement les parties ayant été exposées au rayonnement. La surface de silicium est ainsi structurée en un réseau de piliers d'une hauteur de 500  $\mu\text{m}$  et de 100  $\mu\text{m}$  de côté. Trois réseaux différents de piliers ont été formés pour le projet avec des espacements de 100, 125 et 200  $\mu\text{m}$  entre les piliers sur une zone de 1 cm<sup>2</sup>. Les surfaces sont ensuite chauffées pour fixer définitivement la résine époxy. La métallisation du réseau de piliers est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps des couches minces de chrome (100 nm) et de cuivre (200 nm) sont pulvérisées sur le réseau de piliers pour constituer une couche d'accroche, puis dans un second temps une électrodéposition d'or est effectuée de la même façon que pour les surfaces NG. Trois types d'électrodes sont formés avec des réseaux de micro-piliers espacés de 100, 125

et 200  $\mu\text{m}$  recouvert d'une couche d'or similaire à celle obtenue sur NG. Ces électrodes sont notées  $\mu\text{P100NG}$ ,  $\mu\text{P125NG}$  et  $\mu\text{P200NG}$  (Figure 1.D et Figure 2).

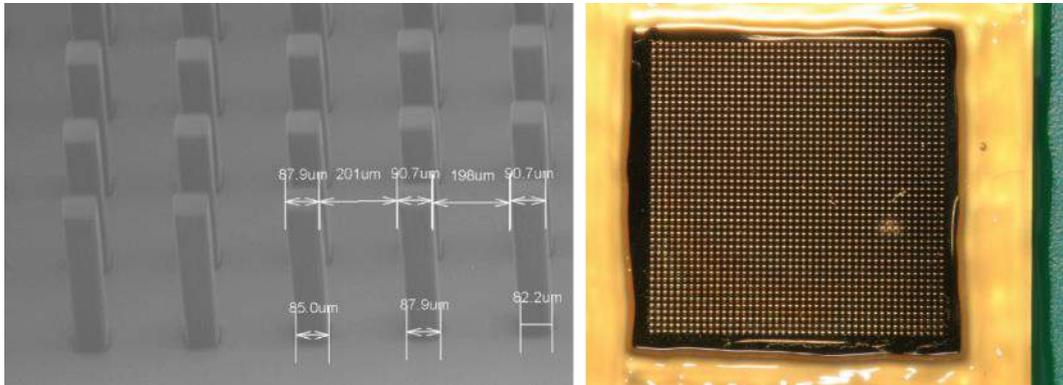


Figure 2 : Image MEB (gauche) et photographie (droite) d'un réseau de piliers espacés de 200  $\mu\text{m}$ .

- Surfaces micro-structurées avec des bandes

Ici les dimensions du support de silicium sont de  $3,6 \times 1,6$  cm. Des couches minces de chrome (100 nm) puis d'or (100 nm) sont formées par évaporation puis une croissance électrolytique d'or est réalisée de la même manière que pour les surfaces NG. Ensuite grâce à une résine ECI 2,5 $\mu\text{m}$  (MicroChemicals Corporation) des zones aux dimensions des bandes souhaitées sont protégées. Une gravure chimique est réalisée afin d'ôter l'or et le chrome non protégés. Enfin, la résine est dissoute dans un bain d'acétone. La surface ainsi obtenue est une surface de silicium oxydé présentant deux bandes de 3 cm de long avec des largeurs de 25, 50 ou 200  $\mu\text{m}$  et des espacements entre bandes de 100, 200, 500  $\mu\text{m}$  ou 9 mm (Figure 1.E et 3).

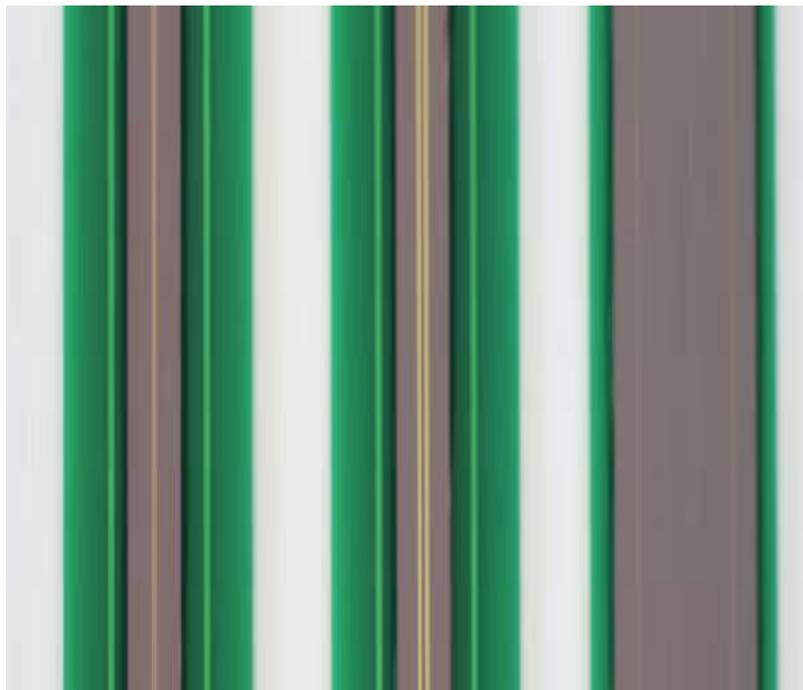


Figure 3 : Photographie de 3 électrodes avec des espacements et des tailles de bandes variables

### 3.1.3. Support des surfaces d'or

Les surfaces d'or testées sont obtenues en recouvrant d'une couche d'or des supports de silicium de  $1,9 \times 1,6$  cm. Pour les utiliser en anode, il faut satisfaire aux contraintes d'une électrode, c'est-à-dire pouvoir les connecter et les mettre en œuvre en milieu liquide dans un réacteur. Cette étape du passage de la surface à l'électrode a été un des verrous de l'étude. Il s'est effectué en deux temps. Le premier dispositif utilisé est un dispositif en Téflon enserrant la surface d'or. Les contraintes expérimentales ont conduit à le modifier et dans un second temps, les électrodes d'or ont été fixées sur un support en polychlorobiphényle (PCB).

- Dispositif en Téflon (Figure 1.C et Figure 4)

Pour une partie des expériences présentées dans le Chapitre 3 et dans la publication 3 (Chapitre 5, section 2), les surfaces d'or sont déposées dans une niche ayant la même taille dans le fond d'un support Téflon, la niche étant entourée d'un joint périphérique (Figure 4). Ce support est vissé au deuxième élément du dispositif présentant une ouverture de  $1 \text{ cm}^2$  (surface active d'électrode souhaitée) entourée d'un second joint. Cette ouverture permet de mettre en contact  $1 \text{ cm}^2$  de la surface recouverte d'or avec le milieu de culture contenu dans le réacteur. La présence des joints permet d'assurer l'étanchéité et de délimiter ainsi la surface d'or exposée. Il est indispensable d'assurer une bonne connexion entre l'électrode et le potentiostat. Cette connexion est effectuée via un fil de cuivre dont l'extrémité est reliée à un ressort. L'assemblage du support par serrage vient comprimer le ressort sur la surface conductrice d'or et assure ainsi la connexion. Il est à noter que la mise en place de ce dispositif est délicate et ne permet pas une connexion optimale. En début d'expériences, les voltammétries cycliques (CV) initiales réalisées pour caractériser le système ont parfois montré une forte résistivité du dispositif. Les électrodes ont dû être retirées des réacteurs afin de régler les problèmes de connectique avant de relancer la phase de désoxygénation et les CV initiales. Ce dispositif complexifie la mise en œuvre. De plus, une fois l'inoculation de *Geobacter sulfurreducens* effectuée, il est très difficile de ressortir l'électrode sans créer une entrée d'oxygène létale pour les bactéries. Il s'est avéré que la stabilité de la connexion n'est pas très fiable, de l'oxydation a été observée en fin d'expérience entre le ressort et le fil. Cela a donc fait l'objet d'une optimisation de la connectique et conduit à l'utilisation de supports en PCB (Figure 1.D et 1.E).

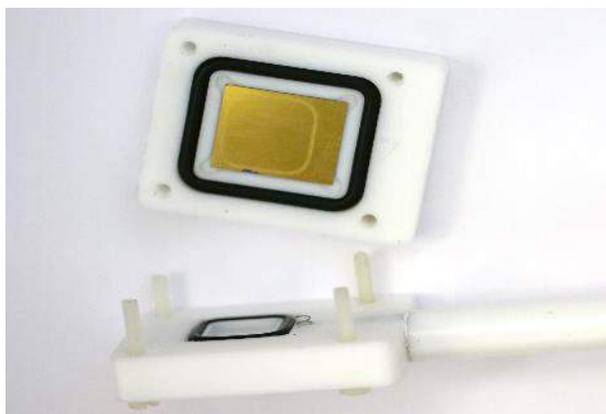


Figure 4 : Photographie du dispositif en Téflon pour l'implémentation des électrodes d'or

- Support PCB (Figure 1.D, 1.E et 3)

Un support en PCB a été utilisé pour fixer les surfaces actives d'or comme présenté en Figures 1 et 3. Il mesure  $7 \times 1,8$  cm et comporte : 2 gros plots de soudure en or en haut connectés en interne au PCB à deux petits plots de soudure situés au-dessus de l'emplacement de la surface d'or à étudier. La surface d'or est collée sur le support PCB puis des soudures (micro-soudeuse KnS 4526) sont réalisées entre les petits plots et la surface d'or. La connexion est alors assurée avec la partie supérieure du support. Les petits plots, les soudures et une partie de la surface d'or sont passivés avec une couche de silicone biocompatible (Loctite 4562) afin de limiter la surface active à  $1 \text{ cm}^2$  d'or (surface projetée). Au niveau des gros plots de soudures, des fils de cuivre sont soudés avec un alliage étain/plomb 60/40 et la soudure est passivée avec un vernis isolant (Electrofuge 200-ND, RS Components). L'électrode est alors opérationnelle.

### **3.1.4. Anodes en cuivre**

Des surfaces de cuivre sont testées comme bioanodes en présence de *Geobacter sulfurreducens*. Elles consistent en des coupons de cuivre de  $3 \text{ cm}^2$  de surface projetée et de 5 mm d'épaisseur. Les coupons sont taraudés et vissés sur une tige de titane fileté (Figure 1.F). Avant la mise en place dans le réacteur, les surfaces sont poncées avec du papier de verre fin (P#120) afin d'enlever la couche d'oxydes qui aurait pu se former.

## **3.2. Réacteurs anaérobies pour *Geobacter sulfurreducens***

Les réacteurs utilisés pour les expériences en culture pure sont des réacteurs mono compartiment en forme de cristallisateur de 500 mL (Figure 5). Les réacteurs sont fermés de façon hermétique par un couvercle en Téflon usiné avec une gorge latérale contenant un joint torique bloquant le couvercle contre la paroi de verre. Le couvercle est troué de six piquages, chacun contenant une gorge et un joint torique ou un septum pour l'étanchéité. Trois des piquages sont destinés aux 3 électrodes, un autre permet la mise en place d'un fritté pour assurer le bullage de gaz. Les deux derniers piquages sont fermés par des septa, l'un permettant la sortie des gaz via une aiguille et l'autre pour effectuer les prélèvements.

Les réacteurs sont remplis avec 300 mL de milieu et un bullage permanent de  $\text{N}_2\text{-CO}_2$  (80-20%) est mis en place pour assurer l'anaérobiose des réacteurs. Afin d'éviter l'évaporation du milieu, le gaz passe préalablement dans un flacon de garde rempli d'eau distillée stérile afin de saturer le gaz en eau. Les réacteurs et flacons de gardes sont placés dans un bain thermostaté à  $30^\circ\text{C}$ .

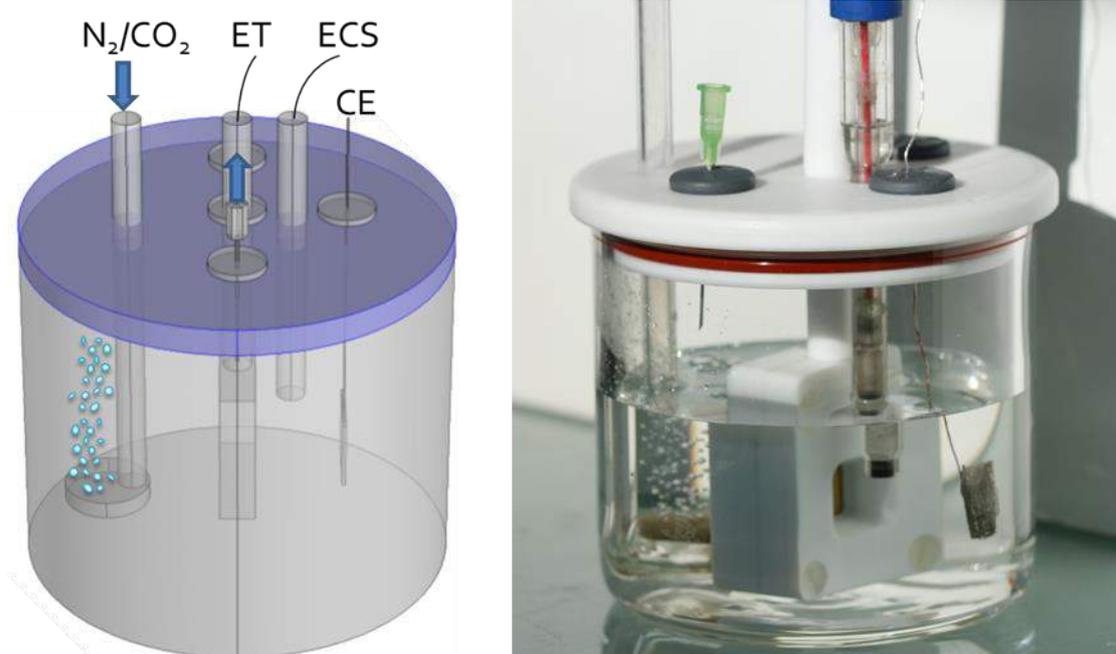


Figure 5 : Schéma du réacteur anaérobie, montage à trois électrodes : ET - électrode de travail, ECS - électrode au calomel saturé, CE- contre électrode.

### 3.3. Réacteurs sédimentaires

Les expériences avec les sédiments marins sont effectuées également dans des réacteurs mono compartiment. Ils sont composés d'une bouteille de type Schott à col large d'une contenance de 600 mL. Un bouchon vissé est équipé avec les 3 électrodes et un septum pour les prélèvements grâce à 4 piquages GL18. Dans certains cas, plusieurs électrodes de travail sont installées dans le même réacteur et les bouchons sont usinés spécialement pour accepter le bon nombre d'électrodes.

Les bouteilles sont remplies avec 500 mL de milieu. Pour assurer une bonne étanchéité, les réacteurs sont fermés hermétiquement avec du silicone au niveau de l'ensemble des ouvertures. Ils sont initialement désoxygénés par un bullage de  $N_2$  pendant 20 minutes. Les réacteurs sont maintenus dans un bain thermostaté à 30°C.

## 4. TECHNIQUES D'ANALYSES

### 4.1. Techniques d'analyses électrochimiques

Les mesures électrochimiques sont effectuées par un multi-potentiostat (VPM, Bio-Logic S.A., France) via le logiciel EC-Lab (version 10.2). Deux techniques électrochimiques ont été utilisées au cours de ce travail : la chronoampérométrie (CA) et la voltammétrie cyclique (CV).

#### 4.1.1. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie consiste à fixer un potentiel pour l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le courant électrique délivré est mesuré au cours du temps. Les performances d'une électrode peuvent être exprimées en intensité (A) ou en densité de courant (A/m<sup>2</sup>) par rapport à la surface projetée ou la surface active de l'électrode. La chronoampérométrie est utilisée afin de suivre la production de courant des anodes au cours du temps. Sauf indication contraire, les anodes ont été polarisées à +0,1 V/ECS.

Les efficacités coulombiques sont calculées à partir de ces mesures de courant. L'efficacité coulombique, aussi appelée rendement faradique, calcule la performance d'un procédé en termes de conversion d'énergie. Dans le cas d'une anode, l'efficacité coulombique compare l'énergie électrique fournie au circuit au niveau de l'électrode à l'énergie apportée sous forme chimique. En ce qui concerne les bioanodes présentées dans les différentes séries d'expériences, l'efficacité coulombique correspond au taux de conversion de l'acétate, donneur d'électrons, en courant électrique:

$$\text{Efficacité coulombique (\%)} = \frac{\text{Charge transférée au circuit (C)}}{\text{Charge consommée en acétate (C)}} \quad \text{Equation 1}$$

Pour l'ensemble des réacteurs, les efficacités coulombiques ont été calculées en intégrant le courant mesuré au cours du temps pour avoir la charge transférée en coulomb (C) et en calculant la charge consommée en acétate d'après la formule :

$$\text{Charge consommée en acétate} = (C_0 - C_t)nFV \quad \text{Equation 2}$$

Avec  $C_0$  et  $C_t$  les concentrations en acétate initiale et à un temps  $t$  (mol/L),  $n$  le nombre de moles d'électrons produits par l'oxydation de l'acétate (8 mol e<sup>-</sup>/mol),  $F$  la constante de Faraday (96500 C/mol e<sup>-</sup>) et  $V$  le volume du réacteur (L).

#### 4.1.2. Voltammétrie cyclique

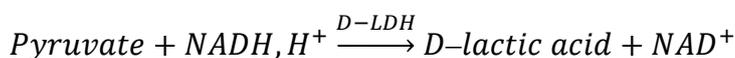
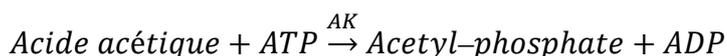
La méthode de voltammétrie repose sur la mesure du courant délivré par l'électrode de travail lors d'un balayage en potentiel. Le balayage est effectué de façon linéaire entre une valeur initiale et une valeur limite nommée potentiel d'inversion. Au niveau du potentiel d'inversion, si la voltammétrie continue avec un sens de balayage inversé, elle est dite voltammétrie cyclique (CV). La même plage de potentiel est donc balayée dans les deux sens pour revenir à la valeur initiale de potentiel. La vitesse de variation du potentiel, aussi appelée vitesse de balayage, peut être adaptée en fonction de l'analyse souhaitée. Dans les travaux présentés, la plupart des CV ont été réalisées avec une vitesse de balayage de 1 mV/s. Dans le cas contraire, la vitesse de balayage est spécifiée. Les bornes de potentiels sont choisies en fonction de l'objectif de la CV et de la réaction étudiée. Dans ce travail, lors du suivi de la formation d'une anode, les bornes utilisées sont de -0,6 à +0,2 V/ECS. Sauf précision, trois CV sont enregistrées lors du suivi d'une anode. La première est effectuée à  $t=0$  après désoxygénation mais avant le début des chronoampérométries et l'inoculation. Une seconde

CV est effectuée lorsque l'électrode est colonisée et active, c'est-à-dire que le courant est proche de sa valeur maximale, et une dernière lorsque le courant de l'anode retombe à zéro avec un biofilm formé à sa surface. Le terme de CV catalytique ou « turn-over » est employé pour parler d'une CV effectuée sur une anode active, par exemple oxydant le substrat présent dans le milieu. A l'inverse, si l'anode ne réalise plus d'oxydation, le terme de CV non-catalytique ou « non turn-over » est employé.

## 4.2. Techniques d'analyses chimiques et biochimiques

### 4.2.1. Dosage enzymatique de l'acétate

Le dosage des concentrations d'acétate est effectué après le prélèvement et la filtration à 0,22 µm de 2 mL de milieu. Le kit K-ACETAK (Libios) permet de doser l'acétate grâce à trois solutions différentes : une solution tampon (pH 7,4), une solution de cofacteur NADH, d'adénosine triphosphate (ATP) et de phosphoenolpyruvate (PEP) et une solution d'enzymes contenant de l'acétate kinase (AK), de la pyruvate kinase (PK) et de la D-lactate déshydrogénase (D-LDH). Une série de trois réactions est mise en jeu dans le dosage (Equations 3). L'acide acétique et l'ATP échangent un groupement phosphate pour former de l'acétylphosphate et de l'ADP. L'ADP récupère ensuite un groupement phosphate auprès du phosphoenolpyruvate afin de former de l'ATP et du pyruvate. Enfin le pyruvate est hydrogéné en acide lactique par le cofacteur NADH, H<sup>+</sup>. La quantité de NADH restante dans l'échantillon est dosée par absorbance à 340 nm (spectromètre JENWAY 7315) après 10 minutes de réaction. La concentration en NADH est inversement proportionnelle à la quantité d'acide acétique que l'on cherche à doser. En effectuant un étalonnage à partir de solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes allant de 0 à 500 mg/L, il est alors possible d'obtenir la concentration dans l'échantillon.



### 4.2.2. Dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Des prélèvements filtrés à 0,22 µm sont analysés en HPLC (ThermoFisher Scientific, France) afin de doser les concentrations en quatre composés : l'acétate, le fumarate, le succinate et le glycérol. La mesure est effectuée sur une colonne Rezex ROA-Organic acid H<sup>+</sup> (8%), 250\*4.6 mm (Phenomenex, France) thermostatée à 30°C. Un détecteur UV et un réfractomètre sont utilisés pour la détection et la quantification. La colonne est traversée par une phase mobile d'acide sulfurique 10 mM (pH 2,2) à un débit de 170 µL/min.

Une gamme d'étalonnage est réalisée pour le calibrage à partir d'une solution mère composée d'acétate (10 mM), de fumarate (50 mM), de glycérol (30 mM) et de succinate (30 mM). Trois dilutions par 2, 5 et 10 complètent la gamme d'étalonnage. Les temps de rétention des différents composés sont indiqués dans la table 1.

*Table 1 : Temps de rétention des espèces dosées en HPLC*

Espèces	Temps de rétention (min)
Succinate	16,6
Glycérol	17,3
Acétate	19,3
Fumarate	21,3

#### **4.2.3. Protocole d'extraction du contenu cellulaire**

En vue du dosage par HPLC des concentrations intracellulaires des espèces étudiées, un protocole de lyse cellulaire a été mis en place afin de récupérer le contenu cellulaire. Un volume de 2 mL de suspension bactérienne à une DO de 0,4 (ou équivalent selon l'adaptation de volume proposée pour l'inoculation en section 2.1) est prélevée dans un tube eppendorf. L'échantillon est centrifugé à 12 000 RPM pendant 5 minutes puis le surnageant est éliminé. Les cellules sont lavées par remise en suspension du culot dans 2 mL d'eau distillée puis centrifugées à nouveau pendant 5 minutes à 12 000 RPM. Le surnageant est éliminé puis le culot est à nouveau remis en suspension dans 1,7 mL d'eau distillée et 200 µL de Triton X-100 à 2%. Un volume de 100 µL de microbilles de verre est ajouté pour assurer une lyse mécanique et les tubes sont passés au vortex pendant 5 minutes. Enfin les échantillons sont centrifugés à 12 000 RPM pendant 5 minutes et le surnageant est récupéré et filtré à 0,22 µm dans un vial en vue du passage à l'HPLC.

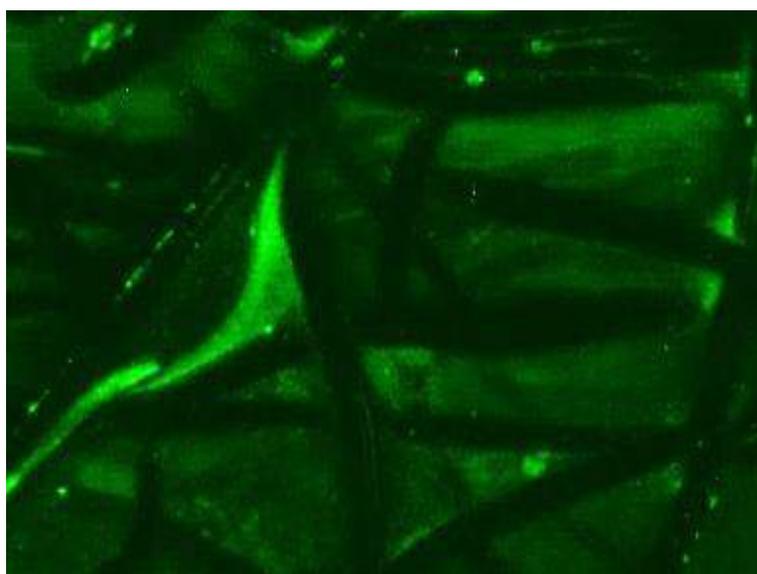
### **4.3. Techniques de microscopie**

#### **4.3.1. Microscopie en épifluorescence**

L'observation des biofilms en microscopie à épifluorescence a été réalisée grâce au marquage des électrodes avec un fluorochrome spécifique des acides nucléiques cellulaires. Deux fluorochromes ont été utilisés : l'acridine orange à 0,01 % (A6014, Sigma) et le Syto9 à 2.5 µM (S34854, ThermoFisher Scientific). Le marquage consiste à recouvrir les électrodes de la solution de fluorochrome pendant 10 min puis à rincer doucement les électrodes avec de l'eau physiologique. Les échantillons sont ensuite laissés 12 heures minimum à température ambiante avant observation.

Les biofilms ont été observés à l'aide d'un microscope Carl Zeiss Axio ImagerM2 et équipé avec une source de lumière (HBO 200), un filtre Zeiss 09 (excitateur HP450-490, réflecteur FT-10, filtre barrière LP520) et une caméra monochrome numérique (Evolution VF) ou d'un

microscope confocal LEICA TCS SP8 équipé d'un laser 20 W Argon et d'un filtre CS2 UV Optics 1 et d'un détecteur PMT (500 nm – 600 nm). Les analyses au microscope confocal sont effectuées à la plateforme de microscopie FR AIB implantée sur le campus INRA d'Auzerville-Tolosane avec l'aide de Cécile Pouzet. Les microscopes sont motorisés en Z ce qui permet d'obtenir des « stacks », ensemble de n images effectuées aux mêmes coordonnées x et y mais prises régulièrement le long de l'axe z. Au moyen du logiciel Zen pour le microscope Zeiss et le logiciel LAS X pour le microscope Leica, les images sont traitées pour obtenir des projections, des reconstructions 3D, le taux de recouvrement des électrodes (Figure 6).



*Figure 6 : Biofilm de sédiments marins formés au milieu des fibres dans un feutre de carbone observé par microscopie à épifluorescence.*

Le taux de recouvrement du biofilm à la surface de l'électrode a pu être estimé. Pour chaque image constituant un même « stack », la portion de surface recouverte par le biofilm sur l'image  $\theta_i$  peut être mesurée. Le taux de recouvrement est obtenu en divisant la somme des portions recouvertes par le biofilm sur les n images par le nombre d'images. Afin d'obtenir une valeur moyenne, le taux de recouvrement est calculé sur de multiples acquisitions. La quantité d'acquisitions nécessaire est ajustée par l'expérimentateur en fonction de l'uniformité observée du biofilm sur l'électrode avec un minimum de 3 acquisitions.

#### **4.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les observations MEB sont effectuées à la plateforme d'analyse du LGC sous la supervision de Marie-Line De Solan. Lors d'une observation en microscopie électronique à balayage, l'échantillon à observer est bombardé d'électrons qui viennent s'intercaler dans les atomes de l'échantillon. Des électrons secondaires sont alors émis, leur détection retransmet une image de l'échantillon (Figure 7). Afin de pouvoir observer ce phénomène, l'échantillon doit subir un traitement en trois phases successives : une fixation, une déshydratation et une métallisation.

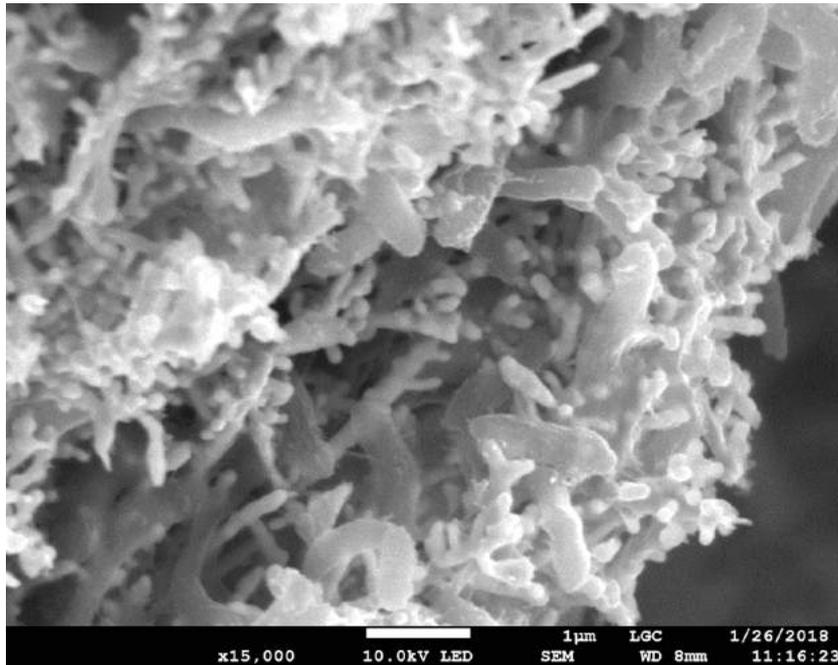


Figure 7 : Image MEB de bactéries *Geobacter sulfurreducens* sur un dépôt d'or

La fixation s'effectue par immersion des échantillons dans un bain contenant 33% d'une solution de glutaraldéhyde à 8% vol., 33% d'une solution de tampon phosphate (0.4 M - pH 7.4) et 33% d'eau distillée. Le temps de fixation est variable selon l'électrode, entre 20 minutes et 2 heures. Après la fixation, une solution contenant 50% d'une solution de saccharose à 0.6 M, 25% de tampon phosphate (0.4 M - pH 7.4) et 25% d'eau distillée est utilisée pour rincer les échantillons.

Afin de préserver au mieux les cellules, une déshydratation chimique est effectuée de manière progressive. L'échantillon est déshydraté par des immersions successives de 5 minutes dans des mélanges eau/acétone de plus en plus concentrés en acétone (50/50, 30/70) puis dans une solution d'acétone 100%. La dernière étape consiste à plonger l'échantillon dans un mélange acétone/hexaméthylidisilazane (HMDS) à 50/50 jusqu'à évaporation puis dans du HMDS 100 %. L'échantillon est alors laissé sous hotte jusqu'à évaporation totale et conservé sous vide pour éviter une réhydratation.

Au moment de l'observation, l'échantillon nécessite une métallisation de surface. En effet, le biofilm étant peu conducteur, les électrons envoyés en faisceau sur l'échantillon vont entraîner une charge de la surface du biofilm qui dégrade fortement la qualité de l'image. L'échantillon est donc métallisé avec une couche mince d'or (10/20 nm) par pulvérisation cathodique à froid, ce qui permet d'éviter ce phénomène de charge par conduction des électrons hors de la surface ciblée par le faisceau.

### 4.3.3. Microscopie pour les mesures de surface

La rugosité de surface des échantillons est déterminée par un profilomètre de surface 3D optique (S Neox Sensofar) regroupant un outil d'interférométrie optique capable de mesurer une rugosité de surface de l'ordre de 0,1 nm et un outil de balayage confocal pour les rugosités plus élevées de l'ordre de la centaine de nanomètres. Ces analyses sont effectuées au CIRIMAT avec l'aide de Vincent Baylac. Les mesures des électrodes SG et NG ont été effectuées par interférométrie optique, qui consiste à observer une différence dans la distance parcourue par la lumière entre la surface de l'échantillon et un capteur. Un point de l'échantillon est ciblé par différents faisceaux lumineux qui vont donc être réfléchis et former une image au niveau d'un capteur d'image CCD (Charge Coupled Device : système à transfert de charges). En comparant les images des différents faisceaux, par rapport à des faisceaux de référence, la hauteur du point ciblé est obtenue. En multipliant les mesures, l'ensemble de la surface est ainsi mesurée. Les autres électrodes MG et PG présentent des rugosités plus élevées et sont analysées par balayage confocal. Cette technique d'imagerie repose sur la maîtrise de l'ouverture du diaphragme au niveau du plan confocal de l'objectif. Cela permet d'éliminer la lumière des zones hors foyer, c'est-à-dire qui ne sont pas dans le plan focal choisi et ainsi d'associer aux points lumineux une hauteur à partir du plan focal ciblé. En répétant l'opération par balayage de l'échantillon le long de l'axe z, l'ensemble des valeurs de hauteurs sont obtenues pour la zone étudiée. Un traitement informatique (logiciel SensoSCAN) permet de reformer une image 3D de la surface (Figure 8) à partir des valeurs de hauteur obtenues et de calculer de nombreux paramètres de rugosité.

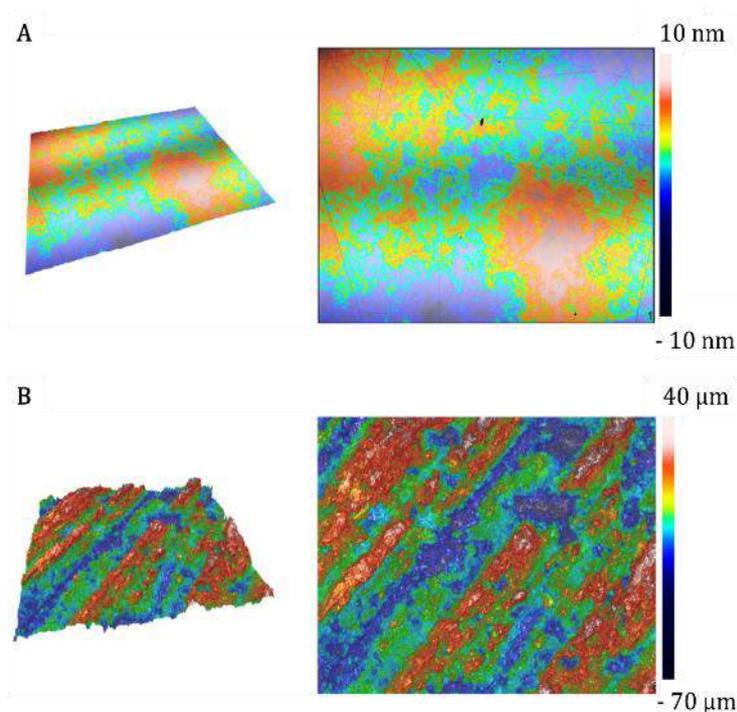


Figure 8 : Reconstruction 3D de surface (A) par interférométrie sur une surface d'or lisse SG et (B) par balayage confocal sur une surface de graphite.

#### 4.4. Détermination de l'hydrophobie de surface par mesure d'angle de contact

Afin de caractériser la mouillabilité des électrodes, les surfaces sont soumises à un test de goutte posée. L'analyse est effectuée à l'aide d'un tensiomètre DSA100 (Krüss). Les surfaces sont nettoyées à l'éthanol comme lors de la mise en œuvre dans les réacteurs. Une goutte d'un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure est délicatement déposée sur la surface. L'angle de contact formé par la goutte est observé par microscopie optique comme présenté sur la figure 9.

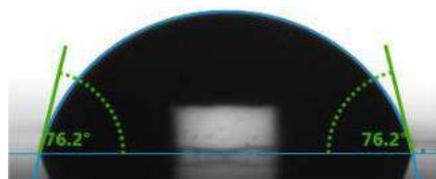


Figure 9 : mesure de l'angle de contact

#### 4.5. Analyses de populations microbiennes par pyroséquençage

Pour l'identification des populations, le pyroséquençage et les analyses bio-informatiques sont sous-traités au laboratoire Research and Testing Laboratory (RTLab) situé à Lubbock (Texas). Seules les extractions d'ADN ont été réalisées au LGC.

Afin d'identifier les micro-organismes se développant en planctonique ou à la surface des bioanodes, une extraction d'ADN est effectuée. La première étape consiste à récupérer et concentrer les micro-organismes planctoniques ou adhérents à l'électrode. Pour décrocher le biofilm présent sur l'électrode, celle-ci est placée dans un tube Falcon de 50 mL et immergée dans 10 mL d'eau distillée stérile. Le biofilm est détaché par sonication (3 minutes à une puissance de 80 W). Les tubes sont centrifugés à 10 000 RPM pendant 5 minutes. Le surnageant est délicatement prélevé puis le culot est re-suspendu dans 2 mL de solution. A l'aide d'une pipette, 1,5 mL de la solution concentrée sont prélevés et conditionnés dans des tubes à bouchons vissant d'une contenance de 2 mL certifiés exempt d'ADN, d'ADNase et ARNase. Pour les échantillons planctoniques, les tubes sont directement remplis avec 1,5 mL de milieu.

L'extraction de l'ADN est réalisée à la faculté de pharmacie de l'Université Paul Sabatier à Rangueil dans les locaux du LGC avec l'aide de Sophie Pecastaings et Manon Oliot. L'extraction d'ADN est effectuée en suivant le protocole du kit PowerBiofilm® DNA Isolation Kit (Mobio). Une fois l'ADN extrait, il est placé dans un tube clairement identifié pour chaque échantillon et envoyé en express dans un colis contenant des pains de glace à RTLab en charge du pyroséquençage et des analyses bio-informatiques. Le pyroséquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides composant une portion d'ADN. Une fois l'enchaînement déterminé, la séquence est traitée par des outils bio-informatiques qui permettent par comparaison de déterminer la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce du micro-organisme dont provient ce fragment d'ADN. Le pourcentage de correspondance entre la séquence en banque de données et l'échantillon analysé détermine le niveau taxonomique retenu. Une fois les résultats obtenus, ils sont analysés afin de déterminer les abondances relatives au sein de l'échantillon en choisissant le niveau taxonomique le plus significatif.



*Chapitre 3 :*  
*Performances de bioanodes*  
*formées sur différents*  
*matériaux d'électrode*



L'objectif de ce chapitre 3, est de définir les matériaux d'anodes les plus souhaitables pour les travaux d'optimisation de la surface. Après un bref retour dans la section 1 sur les discussions qui ont étayé quelques choix initiaux, les tests préliminaires abiotiques qui ont permis de caractériser électrochimiquement les électrodes d'or et de cuivre sont présentés dans la section 2. Les premiers tests en réacteur électrochimique en présence de *Geobacter sulfurreducens* sont décrits dans la section 3. Ils ont démontré l'efficacité de l'or et l'absence de production de courant sur les électrodes en cuivre. Les reproductions de ces tests ont mis en évidence une perte d'électroactivité de la souche suite à des repiquages successifs, présentée dans la section 4. Des solutions pour remédier à cette perte d'électroactivité ont été étudiées afin de pouvoir assurer une certaine stabilité de l'inoculum. Enfin, les électrodes choisies ont été implémentées dans un réacteur inoculé avec des sédiments marins. Ces expériences ont mis en évidence des difficultés dans la colonisation des électrodes d'or malgré un comportement intéressant en matière de stabilité électrochimique de ce matériau. Ces premiers résultats ont amené à proposer différentes voies d'optimisation pour l'utilisation d'électrodes d'or et à faire des choix pour la suite de l'étude qui sont résumés dans la section 4.

## 1. CHOIX INITIAUX DES MATERIAUX D'ELECTRODE

Le projet Koropokkuru vise à obtenir une augmentation des densités de puissance délivrées par une PCM via l'optimisation de la surface de l'anode. Les solutions proposées doivent de plus être en adéquation avec les contraintes techniques du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS), partenaire du projet, en charge de l'élaboration des électrodes.

Comme présenté dans la section 6 du chapitre 1, le matériau de l'anode est un facteur clé de l'optimisation des performances dans les systèmes électrochimiques microbiens. Il joue un rôle de support pour l'activité microbienne donc sa biocompatibilité est essentielle, mais la nature et la structure de l'anode peuvent également affecter les transferts d'électrons au sein du biofilm.

Dans le but d'obtenir la meilleure bioanode, il faut choisir un matériau et une architecture qui réalisent le meilleur équilibre possible entre les paramètres suivants : conductivité, biocompatibilité, stabilité chimique et mécanique, accessibilité des substrats et évacuation des produits des réactions métaboliques. Dans le domaine des bioanodes, les études sont principalement centrées sur les matériaux carbonés qui constituent la grande majorité des surfaces testées (Li et al., 2017). Ils présentent des caractéristiques très intéressantes, dont en particulier une bonne biocompatibilité envers les bactéries, une grande stabilité chimique et physique, une bonne conductivité et des coûts de revient relativement bas. De plus, les phénomènes d'oxydation et de réduction des cytochromes à la surface du carbone ont été caractérisés comme électrochimiquement réversibles (Richter et al., 2009). En termes d'optimisation des conditions hydrodynamiques et de diffusion à la surface, l'usage des matériaux à base de carbone permet, là encore, d'accéder à une large gamme de structures et donc de tester de nombreuses configurations.

Cependant, certains résultats ont montré le potentiel des électrodes métalliques telles que l'or, le cuivre, l'argent ou le nickel (Baudler et al., 2015). Écartés dans un premier temps du fait de leur activité antimicrobienne, il a été démontré que les Geobacteraceae et certaines autres espèces électroactives n'étaient pas sensibles à cette action antimicrobienne (Kargi et Eker, 2007; Patil et al., 2010). Les métaux sont ainsi redevenus des candidats à l'élaboration de bioanodes. En effet, la toxicité des métaux est attribuée à leur aptitude à catalyser des réactions d'oxydoréduction, conduisant à la formation d'espèces moléculaires très réactives qui peuvent causer la peroxydation des lipides membranaires (Brown et al., 1991). Les bactéries électroactives ont la capacité de catalyser les réactions inverses, ce qui les protège de cette action antimicrobienne. Les matériaux métalliques ont une conductivité supérieure à celle des matériaux carbonés (Table 1), ce qui est un avantage considérable lorsqu'il s'agit de déployer des électrodes de grande surface. De plus, la facilité d'usiner des matériaux métalliques ouvre une plus grande panoplie de structures possibles pour des électrodes de grande taille commercialisables à moindre coût. Dans ce contexte, le projet Koropokkuru cherche à coupler les avantages des matériaux métalliques avec les possibilités de structuration des surfaces offertes par les microtechnologies. En effet les possibilités offertes par ces technologies pour structurer les surfaces métalliques de l'échelle nano à millimétrique en font une voie d'optimisation extrêmement attractive.

Tableau 1 : Conductivité des matériaux envisagés pour la formation de bioanode

Matériau	Argent	Cuivre	Or	Nickel	Carbone
Conductivité ( $10^6$ S/m)	62,1	58,2	44,2	14,3	0,063

Les caractéristiques de ces quatre métaux ont été examinées afin de définir lequel ferait serait finalement utilisé au cours de ces travaux. L'or, le cuivre et le nickel sont des métaux très bien maîtrisés par les partenaires du LAAS qui sont responsables de la réalisation des électrodes métalliques structurées et dans le domaine des microtechnologies en général. Au contraire l'argent pouvait présenter quelques complications de mise en œuvre. Malgré la forte conductivité de l'argent, il n'a donc pas été retenu.

Dans un second temps, le nickel a été écarté à cause du gain de conductivité plus faible qu'il apportait par rapport au carbone en comparaison de l'or et du cuivre (Tableau 1). De plus, en se basant sur la seule étude comparative existante dans le cadre des systèmes électrochimiques microbiens (Baudler et al., 2015), il apparaît que les bioanodes formées sur le cuivre et l'or donnent des densités de courant bien plus élevées ( $1500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et  $1175 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) que celles développées sur du nickel ( $384 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

Il a donc été décidé de tester le cuivre et l'or. Le cuivre n'apparaît que dans deux études (Kargi et Eker, 2007; Baudler et al., 2015) où il présente d'excellentes performances. Toutefois, ces études utilisent des inocula multi-espèces provenant d'eaux usées alors que les travaux sont effectués en culture pure de *G.sulfurreducens*. Des tests complémentaires avec *G.sulfurreducens* semblaient donc nécessaires. L'or en revanche a déjà fait l'objet de plusieurs

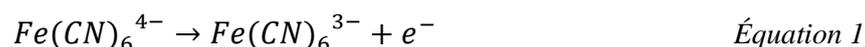
études dans des systèmes électrochimiques microbiens inoculés avec *Geobacter sulfurreducens*. L'efficacité en tant que support de biofilm de *G.sulfurreducens* électroactif est avérée (Richter et al., 2008; Liu et al., 2010; Maestro et al., 2014). Ces expériences ont conduit à des densités maximales de courant respectivement de 1, 4 et 14 A/m<sup>2</sup>. Liu et al ont même atteint 16 A/m<sup>2</sup> en utilisant des microélectrodes d'or. D'autres inocula ont aussi démontré une colonisation efficace d'électrodes d'or avec *Shewanella oneidensis* produisant 0.22 A/m<sup>2</sup> (Sun et al., 2010), et un inoculum d'eaux usées qui a fourni 11,75 A/m<sup>2</sup> (Baudler et al., 2015).

Les premiers tests ont consisté à caractériser les surfaces d'or et de cuivre dans le milieu de culture de *G.sulfurreducens* par la réalisation de voltammétries cycliques (CV). Ces données seront analysées en comparaison avec le graphite choisi comme référence. Dans un second temps, les électrodes sont testées avec un montage à trois électrodes au sein d'un réacteur électrochimique de 500 mL, en conditions anaérobies et inoculé avec *Geobacter sulfurreducens* (dispositif décrit dans le chapitre 2, section 3.2), puis au sein d'un réacteur électrochimique de 600 mL avec un inoculum multi-espèces constitué de sédiments marins (dispositif décrit dans le chapitre 2, section 3.3).

## 2. TEST ABIOTIQUES DE L'OR, DU CUIVRE ET DU GRAPHITE

Le dispositif en téflon muni d'une électrode d'or plane NG (Chapitre 2, section 3.1) a été placé dans un réacteur contenant une solution de KCl 100 mM, NaCl 100 mM afin d'assurer une conductivité suffisante et de ferrocyanure de potassium K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mM. Le milieu était sous bullage constant de N<sub>2</sub> afin d'éviter la présence d'oxygène. Les CV effectuées à différentes vitesses de balayage des potentiels de 10 mV.s<sup>-1</sup> à 1000 mV/s sont présentées sur la Figure 1.

Le courant d'oxydation correspond à l'oxydation de l'hexacyanoferrate (III) en l'hexacyanoferrate (IV) :



Le voltammogramme n'est pas symétrique car il n'y avait pas de ferricyanure (hexacyanoferrate (IV)) initialement en solution. En réduction, seule une partie du ferricyanure qui a été formé lors de l'oxydation est disponible pour réagir avec l'électrode. On observe en outre en réduction un second phénomène électrochimique dû à la réduction de l'oxygène dissous.

Si le transfert électronique est rapide à la surface de l'électrode, l'équilibre de Nernst entre les formes oxydées et réduites de l'espèce réactive est vérifié. Alors l'intensité du pic I<sub>p</sub> doit être proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage selon l'équation de Randles-Sevcik :

$$I_p = 0,4463 \frac{(nF)^{3/2}}{(RT)^{1/2}} SD^{1/2} v^{1/2} C^{sol} \quad \text{Équation 2}$$

où  $n$  est le nombre d'électrons échangés,  $F$  la constante de Faraday (96 485 C/mole),  $R$  la constante des gaz parfaits (8,3144621 J/(mol.K)),  $T$  la température (K),  $S$  la surface de l'électrode (cm<sup>2</sup>),  $D$  le coefficient de diffusion de l'espèce qui réagit à l'électrode (cm<sup>2</sup>/s),  $v$  la vitesse de balayage des potentiels (V/s) et  $C^{sol}$  la concentration de l'espèce réactive en solution (mol/cm<sup>3</sup>).  $S$ ,  $D$ ,  $v$  et  $C^{sol}$  doivent être exprimés respectivement en cm<sup>2</sup>, cm<sup>2</sup>/s, V/s et mol/cm<sup>3</sup> afin que le facteur 0,4463 soit valide. A 30°C, on obtient donc :

$$I_p = (2,66 \times 10^5) n^{3/2} S D^{1/2} v^{1/2} C^{sol} \quad \text{Équation 3}$$

Comme présenté dans la Figure 1.B, on observe une corrélation linéaire ( $R^2=0.9973$ ) entre la racine carrée de la vitesse de balayage et le courant obtenu au pic. Cela traduit le bon comportement électrochimique de la surface d'or, le transfert d'électrons pouvant être supposé suffisamment rapide pour assurer l'équilibre de Nernst à la surface. En outre, d'un point de vue pratique, le montage, bien que relativement complexe, n'introduit pas de résistance électrique significative et après démontage il a été vérifié que le système était bien étanche et protégeait ainsi les connexions électriques du contact avec la solution.

En conclusion, ces observations ont permis de confirmer que les surfaces d'or déposées électrochimiquement étaient parfaitement appropriées à l'usage en électrochimie et que le montage était adapté à leur mise en œuvre.

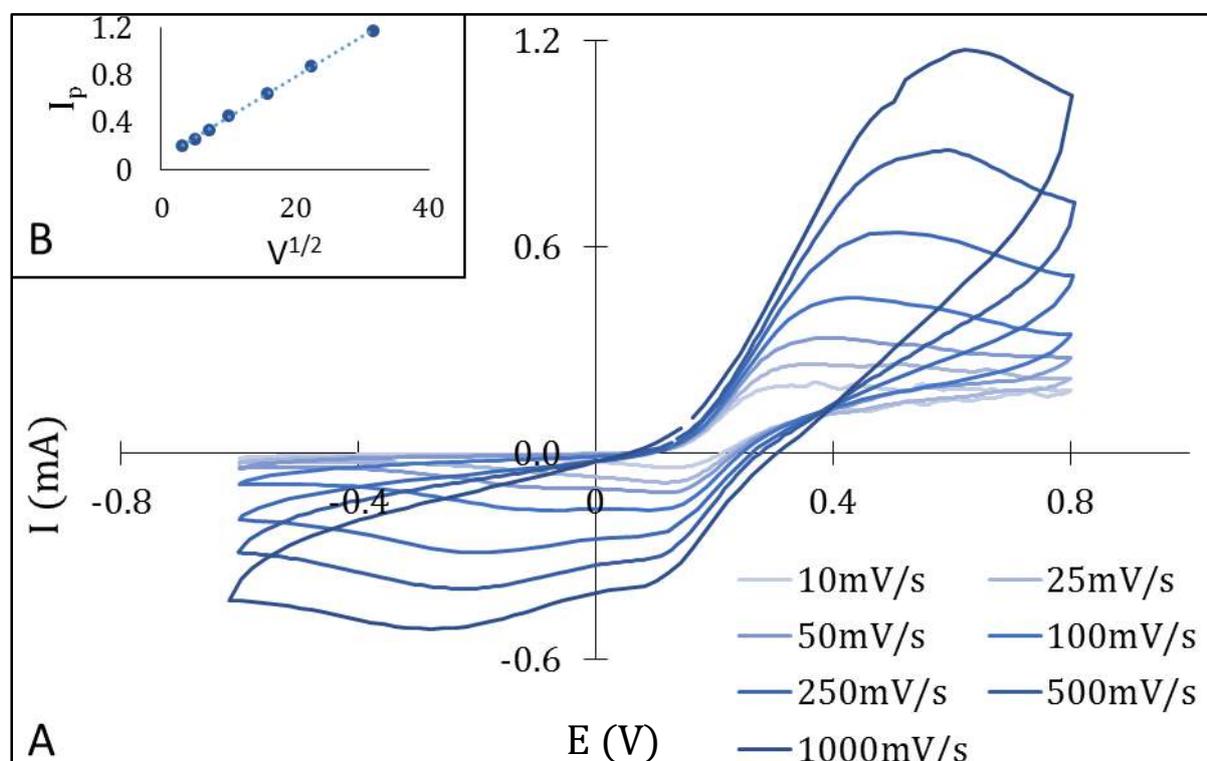


Figure 1 : Voltammogrammes cycliques (A) d'une électrode d'or dans un milieu KCl 100 mM/NaCl 100 mM en présence de ferrocyanure 5 mM à des vitesses de balayage des potentiels de 10 à 1000 mV/s. En encart (B), la corrélation entre l'intensité du pic  $I_p$  et la racine carrée de la vitesse de balayage  $V^{1/2}$ .

Le dispositif a ensuite été testé en conditions abiotiques dans le milieu de culture désoxygéné, en comparaison avec le graphite (Figure 2). On observe un courant capacitif plus élevé sur les électrodes de graphite que sur les électrodes d'or, sans doute lié à la surface plus rugueuse du graphite. Mis à part cela, les deux surfaces d'or et de graphite se comportent de façon similaire et aucun élément redox provenant des matériaux d'électrode ou du milieu de culture n'est observable dans l'intervalle de -0.6 V à 0.4 V/ECS.

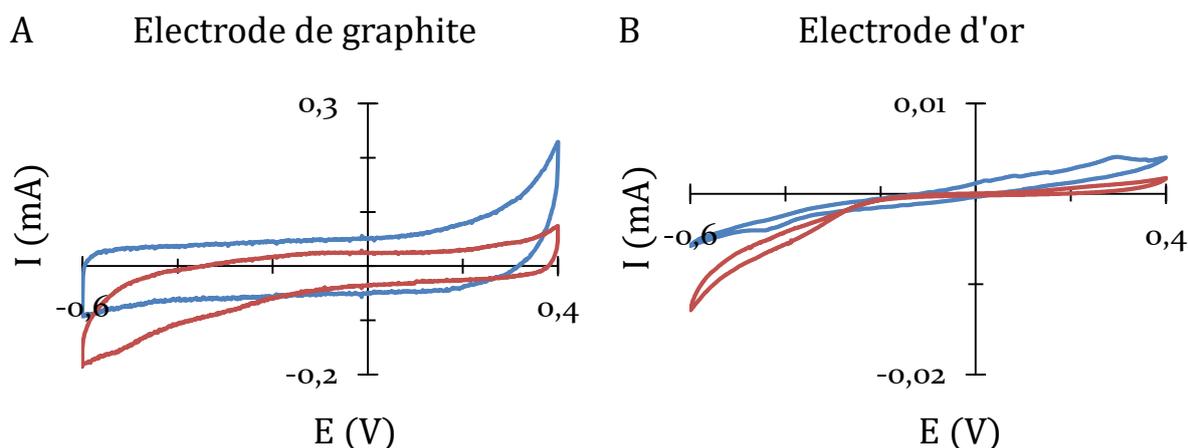


Figure 2 : Voltammogrammes cycliques du graphite (A) et de l'or (B) au sein des réacteurs, dans le milieu de culture de *Geobacter sulfurreducens* en conditions anaérobies.

Pour le cuivre, les premières CV effectuées entre -0,6 et 0,2 V/ECS (Figure 3.A) font apparaître des pics d'oxydation et de réduction, qui s'accompagnent d'une coloration bleu-vert de la solution et de l'altération de la surface des électrodes. Il est probable qu'aux potentiels les plus élevés, le cuivre soit oxydé en ions cuivre ( $E^0_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}} = 0.1 \text{ V/ECS}$ ) qui réagissent avec les ions chlorures présents dans le milieu pour former du chlorure de cuivre. Les CV ont donc été effectuées par la suite entre -0.6 et -0.2V/ECS contrairement aux autres surfaces qui ont été testées entre -0.6 et 0.4V/ECS.

Dans un second temps, le dispositif a été maintenu à -0,2 V/ECS pendant 20 heures afin de tester la stabilité des coupons de cuivre. Après 20 h d'expérience, l'observation des électrodes et le tracé des CV n'indiquent aucune altération des surfaces (Figure 3). Le comportement du cuivre dans le milieu est alors stable et proche de ceux observés pour le graphite et l'or. Le courant de réduction mesuré en début d'expérience a légèrement diminué, du fait de la désoxygénation du milieu qui est lente.

La polarisation à un potentiel de -0.20 V/ECS évite la dégradation des électrodes de cuivre et la libération d'ions cuivre. Il était important de s'en assurer pour un passage serein en condition biotique car le cuivre en solution possède des propriétés antimicrobiennes. Même si certaines études semblent prouver la résistance de *Geobacter sulfurreducens* à cette activité antimicrobienne, il est préférable d'éviter la présence d'ions cuivre.

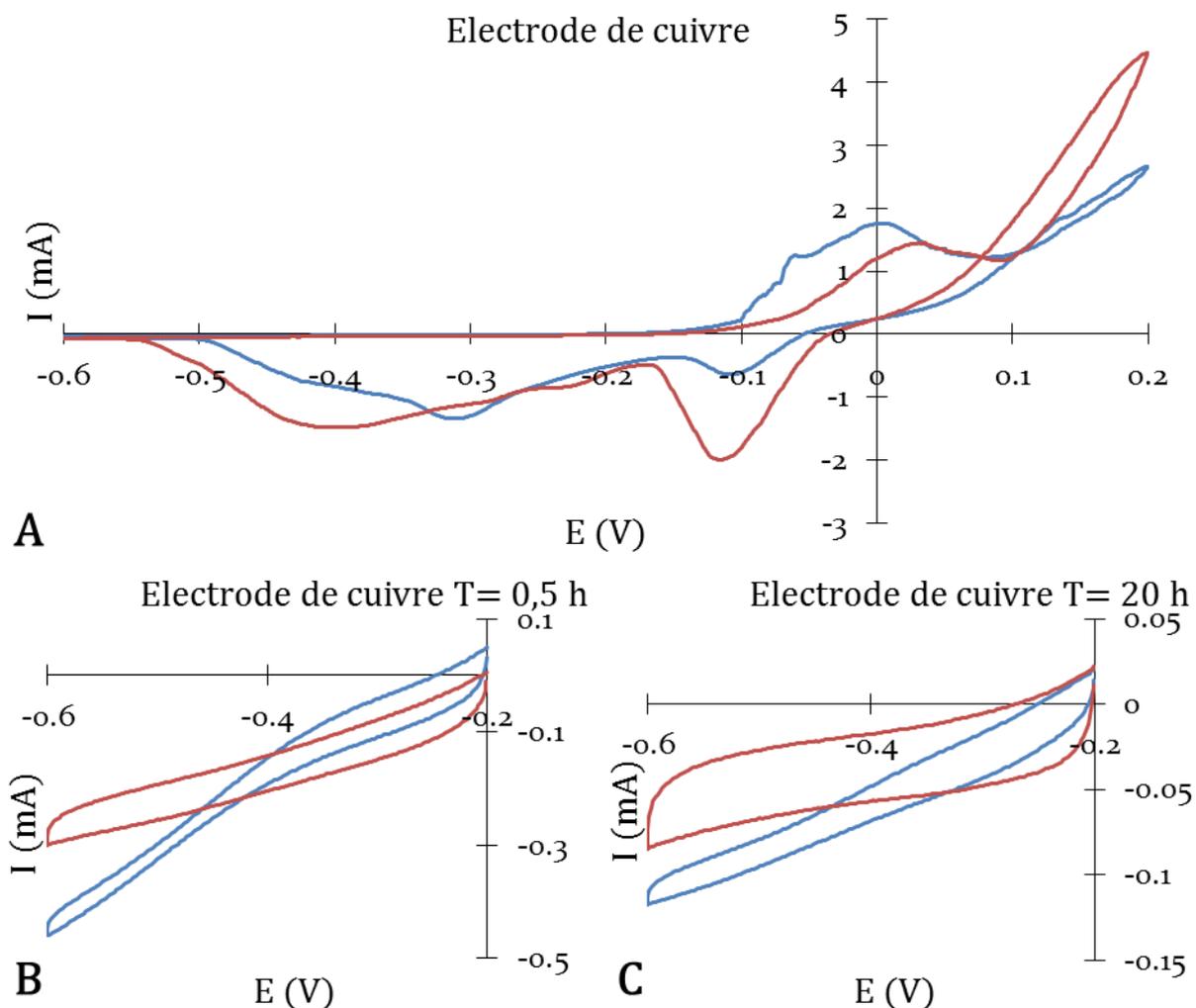


Figure 3 : Voltammogrammes d'électrodes de cuivre dans le milieu de culture de *Geobacter sulfurreducens* (A) entre 0,2 et -0,6 V/ECS puis, pour éviter la libération d'ions cuivres, entre -0,2 et -0,6 V/ECS (B) en début de désoxygénation ( $T=0,5$  h) et (C) en condition anaérobie ( $T=20$  h).

### 3. FORMATION DE BIOFILMS ELECTROACTIFS DE G. SULFURREDUCENS

#### 3.1. Electrodes de graphite

Afin de définir une référence pour la suite des travaux, les premiers tests sont réalisés avec des électrodes en graphite plan de  $3 \times 1$  cm et épais de 0,5 cm. Des CV sont effectuées au jour 0 juste avant l'inoculation et l'ajout d'acétate, au jour 5 et en fin d'expérience (Figure 4).

Les premières expériences réalisées dans ce système l'ont été avec une électrode de référence Ag/AgCl formée par un dépôt de chlorure d'argent sur un fil d'argent et non pas avec une électrode au calomel saturée (ECS) comme présenté ci-dessus. L'objectif était de mettre en œuvre des électrodes de références très fines et flexibles permettant de réduire au maximum l'espace entre la référence et l'électrode de travail. Cela permet d'obtenir des mesures plus précises. Ces expériences ont présenté de nombreuses difficultés de mise en place. Lors de la

première série de tests, après 1 à 2 jours de polarisation, alors que les électrodes commençaient à produire du courant (1 A/m<sup>2</sup> et 12 A/m<sup>2</sup>), le courant est brutalement tombé à 0 en 2 heures. On a observé en fin d'expérience le détachement du dépôt d'Ag/AgCl qui a entraîné la déviation de l'électrode de référence. Après un ajustement du protocole de dépôt du chlorure d'argent, les électrodes utilisées dans les deux séries d'expériences suivantes n'ont pas montré de déviation. Cependant, ces deux séries d'expériences n'ont donné aucun courant d'oxydation de l'acétate malgré la croissance planctonique de *Geobacter sulfurreducens*. Ces échecs ont été imputés au repiquage de la souche. Les 6<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> générations avaient été utilisées pour inoculer ces réacteurs. Ces problèmes de repiquage se sont reproduits pour plusieurs expériences qui sont discutés dans la section 4. Enfin, une dernière expérience réalisée dans les mêmes conditions a donné lieu à de la croissance planctonique sans aucun courant d'oxydation, voire même un léger courant de réduction. En fin d'expérience, les électrodes au chlorure d'argent avaient à nouveau largement dévié de leur potentiel initial démontrant leur instabilité dans ces conditions d'utilisation. Il a donc été décidé de reprendre le processus de tests avec des électrodes commerciales au calomel saturées et une nouvelle souche de *Geobacter sulfurreducens* ne provenant pas de repiquages successifs.

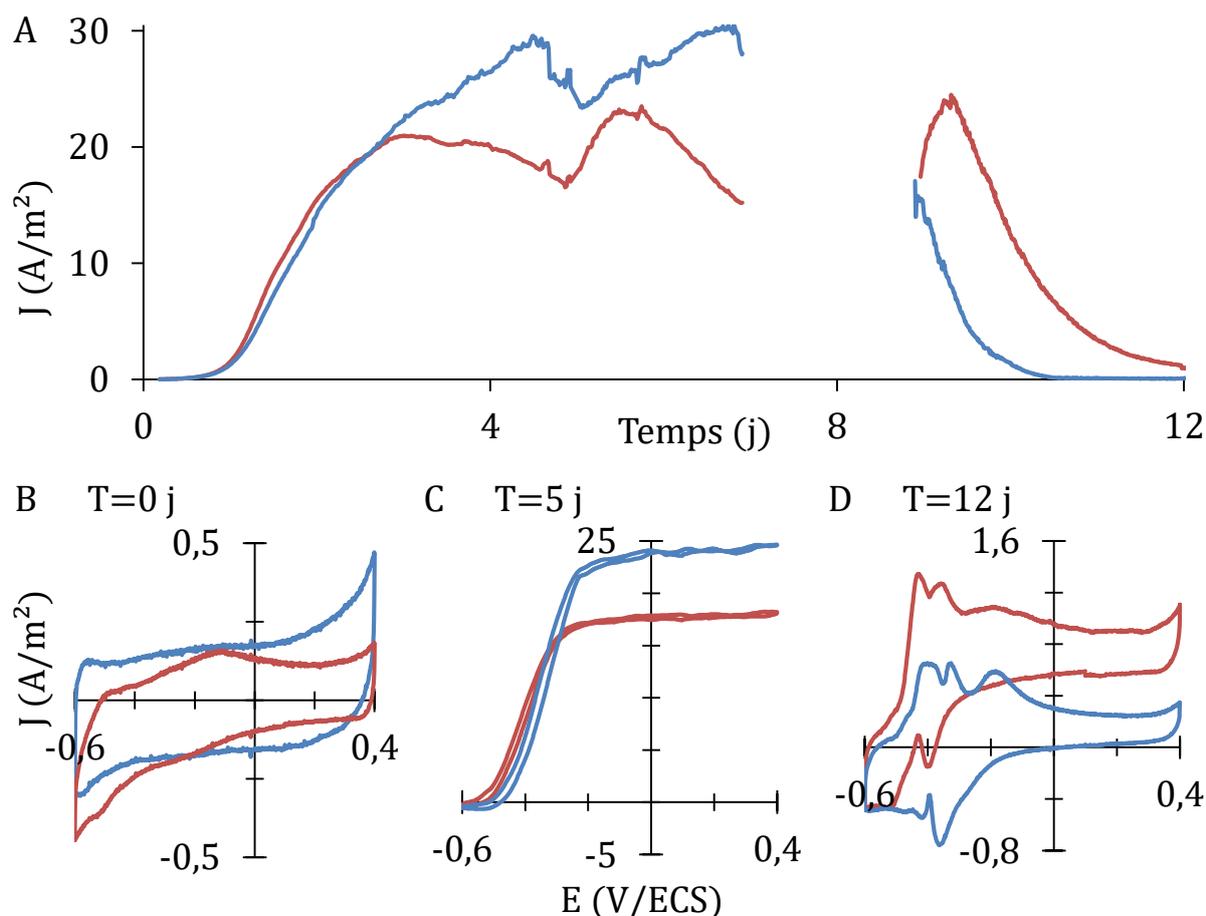


Figure 4 : Chronoampérogrammes (A) et voltammogrammes (Jours 0, 5 et 12 ; B, C et D) obtenus avec des électrodes de graphite inoculées à 10% avec *Geobacter sulfurreducens* et 10 mM d'acétate comme substrat. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

Deux nouveaux réacteurs sont inoculés avec une souche commerciale de *Geobacter sulfurreducens* préparée en levain selon le protocole décrit dans la section 2.1 du chapitre 2. Le courant d'oxydation apparaît dès le jour 1 et augmente rapidement au niveau des deux électrodes pour atteindre un maximum aux jours 3 et 4 (Figure 4). Les deux électrodes produisent des densités de courant de 20 A/m<sup>2</sup> et 30 A/m<sup>2</sup>. La réalisation d'une CV au jour 5 relance l'augmentation de courant. L'interruption de l'acquisition des jours 7 à 9 est due à une coupure de courant. Le réacteur est alors resté sans polarisation mais en condition anaérobie. L'interruption de la polarisation n'a eu que peu d'influence sur les performances. Les électrodes de graphite assurent de bonnes densités de courant par rapport à l'état de l'art, qui rapporte des valeurs de 20 A/m<sup>2</sup> (Soussan et al., 2013b). De plus, en observant les CV réalisées au jour 5, il est à noter que la production de courant est pratiquement maximale dès -0.3 V/ECS. Enfin les CV effectuées en fin d'expériences, alors que pratiquement tout l'acétate a été consommé, permettent de mettre en évidence les pics d'oxydation et de réduction qui correspondent aux systèmes redox identifiés chez *Geobacter sulfurreducens*. Après l'arrêt des réacteurs, les électrodes ont été marquées à l'acridine orange pour observer la colonisation de la surface. L'observation au microscope à épifluorescence a mis en évidence une colonisation uniforme et complète de la surface de graphite par un biofilm d'une épaisseur d'environ 20 µm.

Ces expériences offrent une base de comparaison pour les électrodes d'or et de cuivre. Elles indiquent l'importance de travailler avec une souche fraîchement repiquée. De plus, elles montrent que la souche *G.sulfurreducens* atteint presque son maximum de performance à une polarisation de -0.30 V/ECS. Il devrait donc être possible de l'utiliser avec des électrodes de cuivre polarisées à -0,20 V/ECS.

### 3.2. Electrodes d'or et de cuivre

Les conditions opératoires et les mesures réalisées sont identiques à celles présentées ci-dessus pour les électrodes de graphite à l'exception du potentiel de polarisation qui est abaissé à -0,2 V/ECS dans le cas de l'électrode de cuivre.

Les électrodes d'or plan NG (rugosité de 4,5 nm) sont mises en œuvre avec le support téflon (Chapitre 2, section 3.1). De la même manière que lors des expériences sur électrodes de graphite, on observe une augmentation rapide du courant à partir du jour 1, jusqu'à environ 3 A/m<sup>2</sup> au jour 3 (Figure 5). Au niveau du jour 3, une baisse du débit de bullage de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> semble être la cause de la diminution temporaire du courant dans les deux réacteurs. Suite à cette perturbation, l'un des réacteurs continue de produire plus de courant pour atteindre 6,2 A/m<sup>2</sup> au jour 6, alors que l'autre réacteur ne dépasse pas les 3 A/m<sup>2</sup> et entame une lente diminution de la production de courant. Ce réacteur a probablement subi une oxygénation légère et temporaire, mais suffisante pour entraîner la mort d'une partie des cellules constituant le biofilm. Toutefois, les densités de courant obtenues sont de bon niveau en comparaison avec les densités de courant rapportées jusqu'alors dans la bibliographie pour de l'or plan qui sont respectivement de 1 A/m<sup>2</sup>, 4 A/m<sup>2</sup> et 14 A/m<sup>2</sup> (Richter et al., 2008; Liu et al., 2010; Maestro et al., 2014). Il est important de noter que l'étude qui a donné des valeurs supérieures à celles obtenues ici utilisait un taux d'inoculation de 25 % et une alimentation en continu de milieu avec des concentrations en acétate de 20 mM. Dans ce système inoculé à 10% avec un unique batch d'acétate à 10 mM,

des densités de courant de 3 et 6 A/m<sup>2</sup> sont donc des résultats satisfaisants, comparable à l'étude de Richter et al, présentant pourtant une inoculation à 40% et une concentration d'acétate de 40mM.

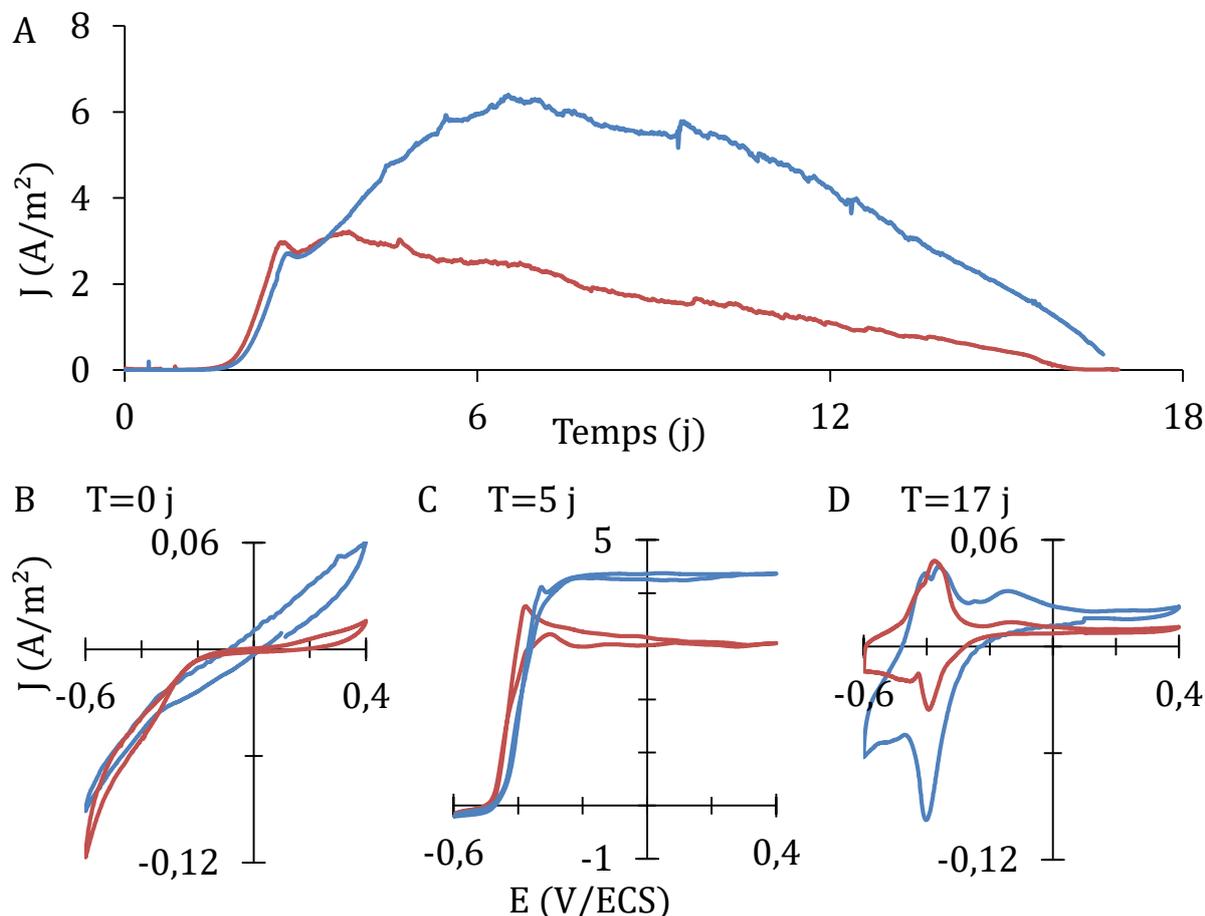


Figure 5 : Chronoampérogrammes (A) et voltammogrammes (Jours 0, 5 et 12 ; B,C et D) obtenus avec des électrodes d'or inoculées à 10% avec *Geobacter sulfurreducens* et 10 mM d'acétate comme substrat. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

Les voltammogrammes sont similaires à ceux obtenus avec le graphite. La courant maximal est atteint dès -0,3 V/ECS pour la CV réalisée au jour 5. En fin d'expérience, les CV présentent également les pics d'oxydo-réduction correspondant aux systèmes redox de *Geobacter sulfurreducens*. Le marquage des biofilms au SYTO 9 permet d'observer une colonisation uniforme des électrodes. Le biofilm semble cependant moins épais que sur le graphite. De plus, lors de la sortie des électrodes du réacteur et du dispositif de connexion, une partie du biofilm a glissé de l'électrode. Cela traduit un attachement plus faible que sur le graphite à la surface duquel le biofilm était resté solidement adhérent. L'or est donc une surface appropriée pour cette étude mais qui semble légèrement plus délicate à mettre en place.

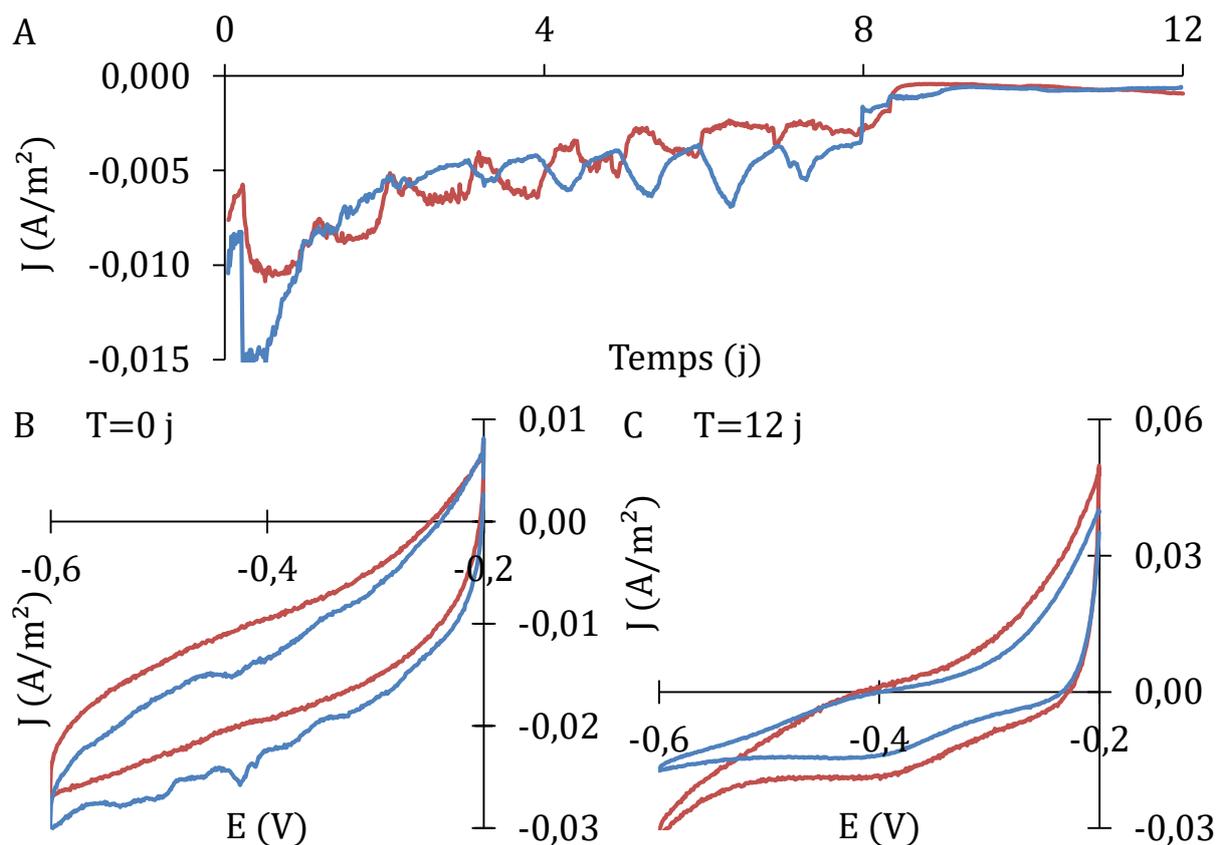


Figure 6 : Chronoampérommes (A) et voltammogrammes (B : Jour 0 ; C : Jour 12) obtenus avec des électrodes d'or inoculées à 10% avec *Geobacter sulfurreducens* et 10 mM d'acétate comme substrat. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

Les CV initiales réalisées avec les électrodes de cuivre, sont conformes aux observations faites dans la partie 3.2. Lors du lancement des chronoampérommes, on observe un faible courant de réduction sur les deux électrodes (Figure 6). Ce courant de réduction diminue au cours du temps mais on n'observe pas d'apparition d'un courant d'oxydation, ce qui signifie qu'aucun biofilm électroactif ne s'est développé sur les électrodes. De plus, les CV effectuées après 12 jours montrent une légère modification des électrodes. Elles présentent un courant d'oxydation à partir de -0,4 V/ECS alors qu'il n'apparaissait qu'à -0,2 V/ECS initialement. Une observation importante effectuée lors de ces expériences est l'absence de croissance planctonique dans les réacteurs. Avec les électrodes de graphite et d'or, la croissance planctonique était présente dans l'ensemble des réacteurs, même en absence de production de courant. Ici, avec les électrodes de cuivre, il n'y a pas de croissance visible de *G.sulfurreducens*. L'effet antimicrobien du cuivre, pourtant supposé être négligeable sur des *Geobacteraceae*, est donc sûrement à l'œuvre dans les réacteurs. Il est à noter que pour les expériences démontrant l'efficacité des électrodes de cuivre, Baudler et al. ont utilisé une électrode de 1,5 cm<sup>2</sup> dans 250 mL de solution, alors que les électrodes utilisées ici ont la surface en contact avec le milieu est de 10 cm<sup>2</sup> pour un volume de 300 mL. Le rapport surface/volume est environ 5 fois plus élevé, ce qui pourrait conduire à un effet antimicrobien accru dans les réacteurs. En outre, ces expériences ont été réalisées en cultures mixtes, qui sont peut-être plus aptes à développer des

systèmes de résistance à l'effet antimicrobien des ions cuivre que *G.sulfurreducens* en culture pure.

Une optimisation des conditions d'utilisation de cette surface est sûrement nécessaire pour une utilisation future de ce matériau car il reste un candidat intéressant qui a démontré des résultats prometteurs dans d'autres études. Toutefois pour la suite des études le choix a été fait d'abandonner le cuivre.

Ces tests préliminaires ont amené à écarter le cuivre comme surface d'étude mais ont confirmé l'efficacité de l'or et son comportement comparable au graphite. Ils ont aussi mis en évidence l'instabilité des électrodes de référence au chlorure d'argent dans les conditions de ces expériences et ont donc amené à privilégier les électrodes commerciales au calomel saturées pour la suite des études. Enfin, la répétition de ces tests a souligné un problème de reproductibilité des résultats dans le cas de repiquages de *G.sulfurreducens* qui est discuté dans la partie 3.4.

#### 4. PERTE D'ELECTROACTIVITE DE GEOBACTER

Comme présenté dans la section 3.1, la stabilité des propriétés de croissance et d'électroactivité de *G.sulfurreducens* est essentielle au succès des expériences et de leur reproductibilité. Dans un premier temps, il a été envisagé de conserver une souche active de *G.sulfurreducens* comme généralement effectué en microbiologie, via une technique de repiquages successifs effectués pendant la phase active de croissance de la souche. Il a été choisi de maintenir la souche par un repiquage hebdomadaire dans un milieu synthétique spécifique avec de l'acétate comme substrat de croissance et du fumarate en tant qu'unique accepteur final d'électrons (Chapitre 2, section 2.1). Ce milieu et ces conditions de repiquage sont conformes aux indications de la bibliographie (Bond et Lovley, 2003) et ont déjà été utilisés avec succès dans l'équipe (Soussan et al., 2013b). Cependant, les tests électrochimiques effectués avec un inoculum de *G.sulfurreducens* ayant subi 6 et 8 repiquages successifs à partir de la souche commerciale n'ont donné aucune production de courant (Section 3.1), malgré une évidente croissance planctonique. Des expériences réalisées avec un inoculum de 4<sup>ème</sup> génération, qui ne sont pas décrites ici, ont montré une augmentation du temps nécessaire à l'établissement du courant. L'hypothèse qui a été formulée est que la technique de repiquage, du fait de l'absence prolongée d'accepteur solide d'électrons, réduit les capacités de transfert extracellulaire des cellules. Au fur et à mesure des repiquages, les cellules n'entretiennent plus la machinerie moléculaire nécessaire au transfert extracellulaire d'électrons, dont elles n'ont pas besoin et cette voie de transfert disparaît petit à petit. La capacité des cellules à effectuer ces transferts reste présente au niveau génétique mais son activation n'est pas aussi rapide que dans le cas de bactéries ayant conservé cette machinerie moléculaire.

Le fait de recevoir de la part du fournisseur une souche active en termes de transfert électronique démontre la possibilité de maintenir l'électroactivité des bactéries. Cela a amené des essais de conservation de l'électroactivité en mettant en œuvre un réacteur électrochimique en fed-batch. Cette technique permettrait d'assurer le maintien de la voie de transfert

extracellulaire des électrons au sein de levains et de s'affranchir ainsi de cette source de variation.

A la suite des expériences réalisées sur les électrodes de graphite présentées dans la partie 3.3.1, le réacteur ayant produit un courant de 20 A/m<sup>2</sup> qui était encore légèrement productif au jour 12 est conservé et réalimenté avec 10 mM d'acétate. La production de courant est rapidement rétablie et dépasse même la production de courant observée lors du premier apport d'acétate (Figure 7). On obtient alors une densité de courant de 27 A/m<sup>2</sup>. Deux autres ajouts d'acétate effectués aux jours 7 et 18, lorsque les densités de courant chutent, permettent une reprise de la production de courant mais avec des maximums qui restent légèrement en deçà, de 20 et 10 A/m<sup>2</sup>. Observant cette diminution progressive des performances, il a été décidé de procéder, lors de l'ajout d'acétate au jour 29, à un renouvellement de 50% du milieu de culture afin de rehausser les concentrations en vitamines et micronutriments. Ce renouvellement a eu un effet positif permettant de hausser la densité de courant maximale de 10 à 15 A/m<sup>2</sup>.

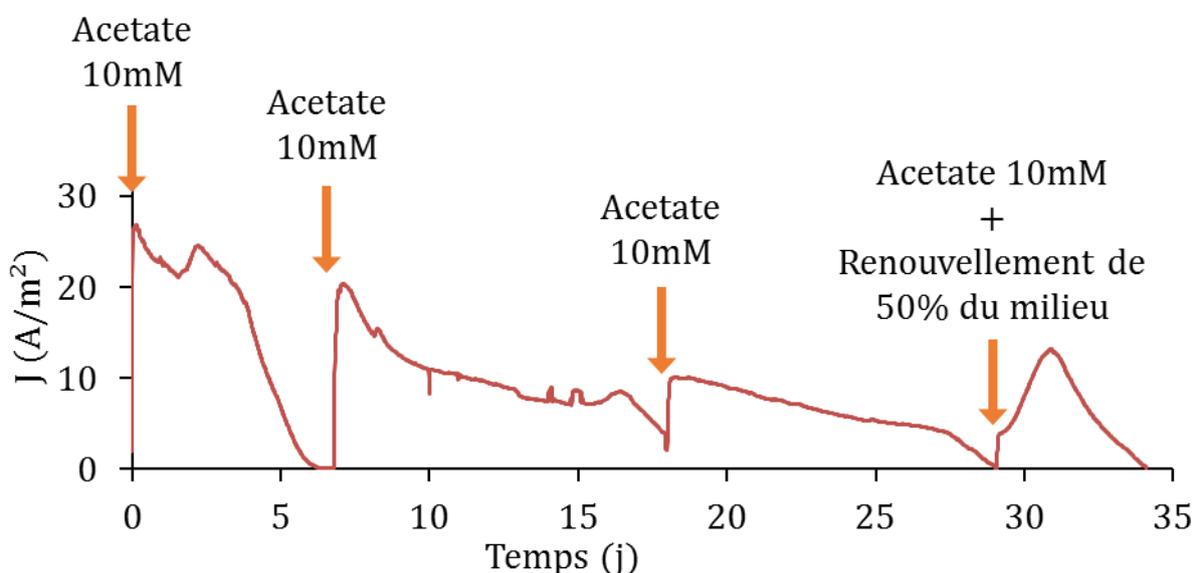


Figure 7 : Chronoampérogramme du réacteur de la Figure 4 maintenu en fed-batch via des ajouts successifs d'acétate aux jours 0, 7, 18 et 29. Au jour 29, 150 mL de milieu sont pompés du réacteur et remplacés par 150 mL de milieu frais préalablement désoxygéné.

Un prélèvement de *Geobacter sulfurreducens* a été effectué au jour 10. L'acquisition est stoppée et la surface de la bioanode est grattée au moyen d'une aiguille connectée à une seringue préalablement désoxygénée, tout en aspirant légèrement. On réalise ainsi un prélèvement provenant directement du biofilm électroactif. Ce prélèvement est mis en levain puis utilisé pour inoculer deux réacteurs selon la technique habituelle (Chapitre 2, section 3.2).

Après une croissance normale dans le levain, cette culture est inoculée dans deux réacteurs avec électrodes de graphite. Les performances, présentées sur la Figure 8, sont largement inférieures (10 et 6 A/m<sup>2</sup>) à celles obtenues avec une inoculation provenant de la souche commerciale (30 et 20 A/m<sup>2</sup>). De plus, alors que la première série d'expériences avait montré

un démarrage rapide de la production de courant après 1 jour seulement, il faut ici attendre 4 jours avant d'observer un courant d'oxydation.

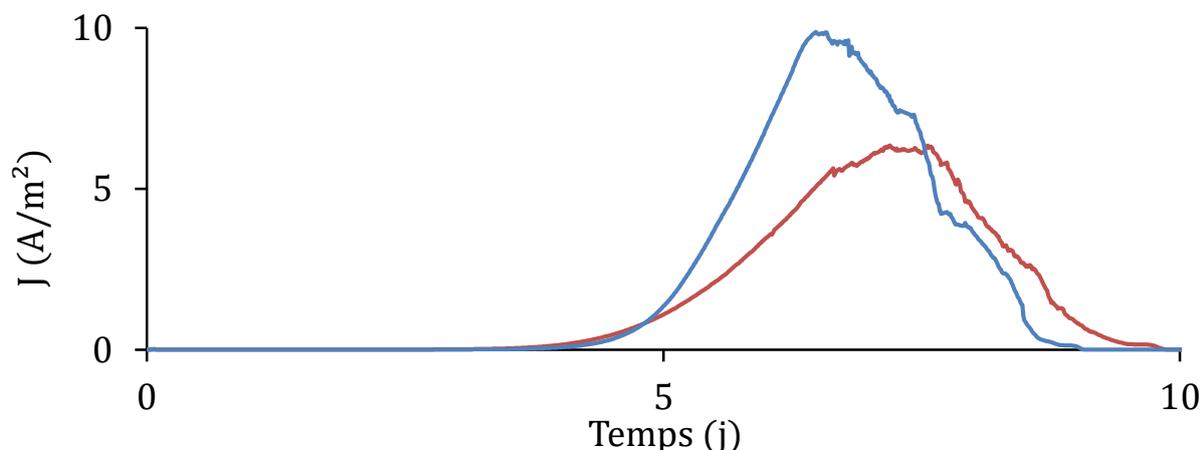


Figure 8 : Chronoampérogrammes des électrodes de graphite inoculées à 10% avec *Geobacter sulfurreducens* provenant du réacteur présenté dans la Figure 7 et 10 mM d'acétate comme substrat. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

Ces deux expériences apportent des enseignements importants. En premier lieu, le maintien d'un réacteur dans le temps montre des limitations en termes de courant produit. En 30 jours, les densités de courant ont été divisées par 3 environ. Cela laisse à penser que sur une période plus longue, par exemple les 36 mois de durée d'une thèse, le maintien d'un réacteur nécessiterait de nombreuses optimisations afin de conserver une activité électroactive stable pour être utilisée comme source d'inoculum. Le renouvellement de 50% du milieu a donné des résultats significatifs, mais limités et l'opération est délicate du fait de la nécessité de l'apport d'un milieu désoxygéné pour assurer l'anaérobiose. De plus, l'utilisation comme inoculum de la souche prélevée sur l'électrode de ce réacteur a induit un retard important dans la production de courant par rapport à la souche commerciale. Le choix a donc été fait de conserver une technique d'inoculation basée sur la souche commerciale. Cependant, les difficultés rencontrées lors de ces tests préliminaires ont mis en avant l'importance de la standardisation de l'inoculation afin de s'assurer de la reproductibilité des expériences en culture pure.

Un protocole plus strict a donc été mis en place pour tenter de standardiser la technique d'inoculation. Comme présenté dans la section 2.1 du chapitre 2, ce protocole consiste à fixer une durée de 3 jours pour la réalisation du levain, durée qui correspond à la fin de la phase de croissance. La densité optique de l'inoculum est mesurée juste avant l'inoculation. D'après des travaux effectués précédemment au sein de l'équipe (Dumas, 2007), la densité optique est liée à la concentration cellulaire du levain par la relation :

$$C_{Geobacter} = DO_{620nm} \times 472067 \text{ (UFC. mL}^{-1}\text{)}$$

Le volume inoculé dans les réacteurs, initialement fixé à 30 mL, est adapté par une règle de trois afin d'apporter la même quantité de cellules. Grâce à ce protocole et à l'usage de la souche commerciale, l'inoculation est constante et stable.

## 5. FORMATION DE BIOFILMS ELECTROACTIFS DE SEDIMENTS

Une première série de tests a été effectuée avec un inoculum multi-espèces provenant de sédiments de marais salants. Cet inoculum a démontré dans des études précédentes une excellente capacité pour former des biofilms électroactifs. Il rentre dans le cadre des applications du projet Koropokkuru orienté vers la conception d'une pile microbienne en milieu marin. De plus, l'utilisation d'un inoculum provenant d'un milieu très salin assure la présence de bactéries tolérantes à des fortes teneurs en sel. Ce paramètre est important car la forte teneur en sel assure une bonne conduction ionique du milieu et minimise donc la chute ohmique au sein du dispositif. L'objectif de ces tests est d'évaluer la capacité des différentes électrodes à former des bioanodes avec cet inoculum.

Des électrodes de graphite plan et de feutre de carbone, déjà largement étudiées dans l'équipe, sont utilisées comme références pour les comparer aux électrodes d'or. Les électrodes sont polarisées à 0,1 V/ECS au sein de réacteurs contenant 500 mL de milieu de culture pour sédiments marins (Chapitre 2, section 3.3). Les réacteurs sont alimentés avec un mélange de substrats à 40 mM d'acétate et 30 mM de lactate afin de favoriser la diversité des métabolismes et des espèces se développant au sein du biofilm électroactif. En effet, des études ont montré que les biofilms issus d'inocula multi-espèces sont plus efficaces que les cultures pures du fait de la diversité des métabolismes mis en jeu.

### 5.1. Electrodes en graphite plan et feutre de carbone

Les résultats obtenus sur les électrodes en graphite plan et en feutre de carbone sont assez similaires (Figure 9). Les densités de courant sont calculées par rapport à la surface projetée des électrodes, c'est-à-dire 3 cm<sup>2</sup>. Le courant commence à être significatif au jour 3 et augmente rapidement jusqu'à des valeurs maximales de densité de courant de 15 et 20 A/m<sup>2</sup> pour le graphite plan et 16 et 22 A/m<sup>2</sup> pour le feutre de carbone. Cependant ces performances sont de courte durée avec seulement 4 à 6 jours de production de courant dans les deux cas, pour des rendements faradiques de 4.8 et 10.1 % pour le graphite plan et 7.8 et 13.2 % pour le feutre de carbone. Cela pourrait être dû au développement d'espèces non-électroactives qui prennent le pas sur les espèces catalysant les transferts électroniques. Les CV effectués au jour 6, quasiment au maximum de production de courant, indiquent un comportement différent entre les électrodes de graphite plan et en feutre de carbone. Alors que la production de courant sur les feutres ne démarre que pour des potentiels supérieurs à -0,2 V/ECS, on observe une production de courant à partir de -0,4 V/ECS sur le graphite plan. Le comportement du graphite plan se rapproche de ce qui était observé précédemment avec *Geobacter sulfurreducens* en souche pure, qui atteignait la densité de courant maximale dès -0,3 V/ECS. Au contraire, avec les électrodes en feutre de carbone, la production de courant continue à croître avec le potentiel. Il est à noter que les CV sur feutre de carbone plafonnent à cause d'une limitation en courant du potentiostat. C'est un problème technique qui n'est pas lié au comportement des bioanodes. Heureusement, ce plafonnement n'intervient qu'à partir de 0,2 V/ECS, c'est-à-dire à des potentiels plus élevés que le potentiel de polarisation utilisé ici. Ce problème technique ne perturbe donc pas les chronoampérométries.

La différence des cinétiques des bioanodes formées sur graphite plan et sur feutre de carbone pourrait être imputée soit aux transferts d'électrons entre le biofilm et l'électrode soit à la composition des communautés microbiennes. La deuxième hypothèse supposerait que le matériau d'électrode exerce une forte sélectivité sur les espèces bactériennes qui composent le biofilm. Une telle sélectivité n'a jamais été observée sur les expériences effectuées au laboratoire dans des conditions très similaires. La première hypothèse semble la plus crédible. Les transferts à l'interface biofilm/électrode semblent plus rapides sur le graphite plan que sur le feutre de carbone. Il faut donc une surtension plus importante avec le feutre de carbone pour obtenir la même valeur de courant. Toutefois, à haut potentiel, le maximum de densité de courant accessible est plus important sur feutre de carbone. Il devrait dépasser  $35 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  au-delà de  $0.20 \text{ V/ECS}$  alors que le maximum sur graphite plan n'excède pas  $20 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ . Sans doute faut-il voir là l'effet d'une plus grande quantité de biomasse colonisant la structure poreuse du feutre de carbone.

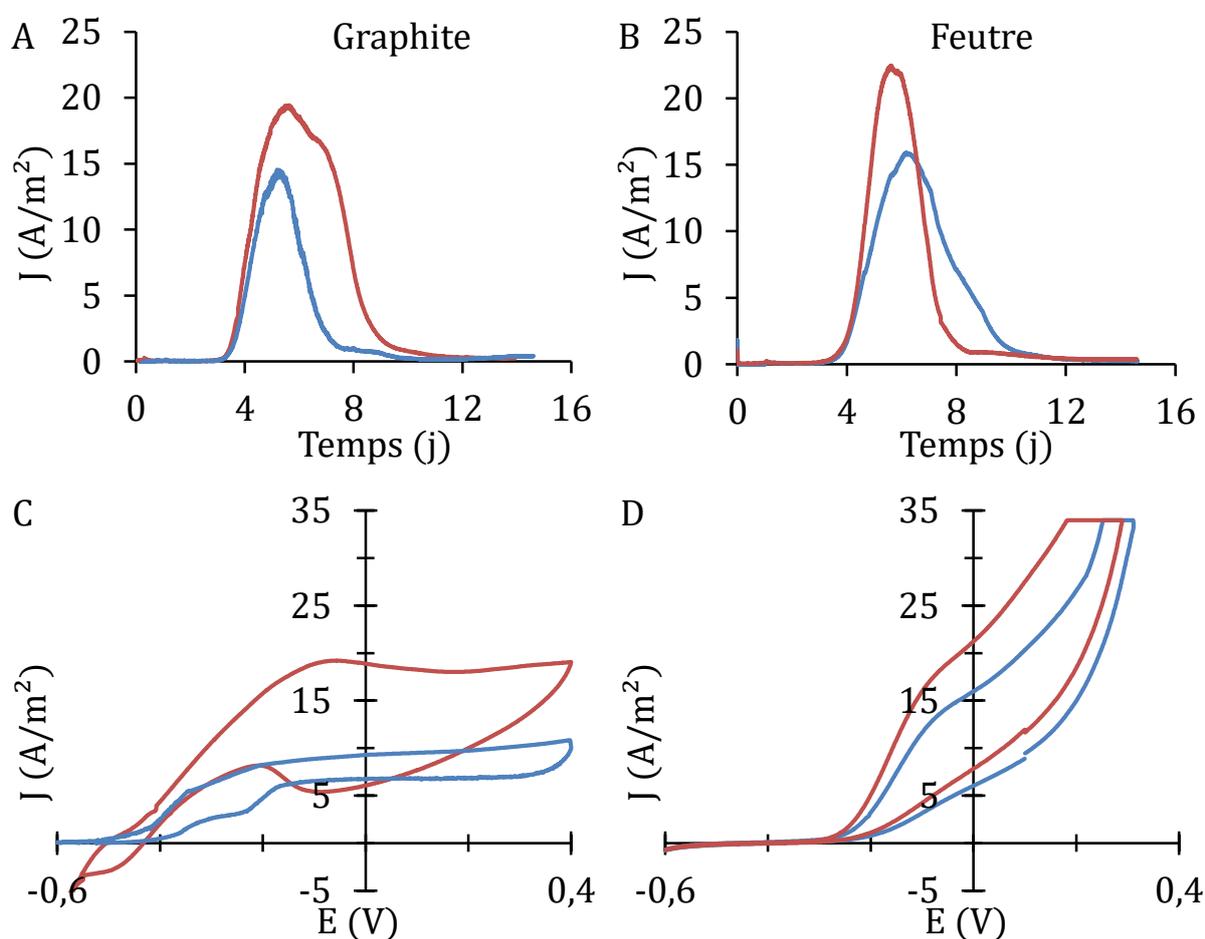


Figure 9 : Chronoampérogrammes (A et B) et voltammogrammes au jour 6 (C et D) des électrodes de graphite et de feutre de carbone inoculées à 10% avec des sédiments marins. 40 mM d'acétate et 30 mM de lactate sont fournis comme substrats. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

En fin d'expérience, les biofilms sont marqués à l'acridine orange afin d'observer leurs structures. Sur les électrodes de graphite, le biofilm recouvre toute la surface avec cependant des zones non colorées par l'acridine donc ne contenant pas d'ADN (Figure 10). Certains éléments organiques sont inclus dans la matrice du biofilm. La composition du biofilm est assez hétérogène. Les électrodes en feutre de carbone présentent un biofilm principalement développé en surface qui n'a que très peu pénétré au sein du réseau de fibres de carbone. Le biofilm semble assez hétérogène et ne recouvre pas totalement la surface des fibres mais se développe plutôt entre les fibres. Ces observations apportent quelques pistes de réflexion quant aux structurations de surface que nous souhaitons réaliser. Des structures trop profondes et trop resserrées pourraient causer le colmatage du haut des structures par le biofilm et empêcher sa pénétration, ce qui priverait de l'effet d'augmentation de surface souhaité.

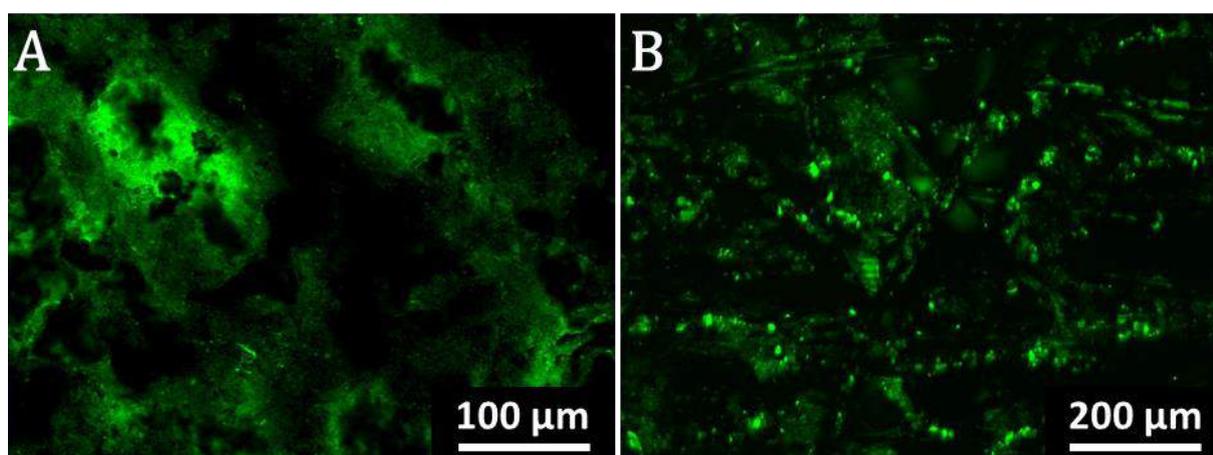


Figure 10 : Electrodes de graphite plan (A) et de feutre de carbone (B) observées en épifluorescence après marquage à l'acridine orange.

Ces deux séries d'expériences confirment l'efficacité d'une inoculation avec des sédiments marins sur des surfaces carbonées. Les courants produits sont comparables à ceux obtenus en culture pure mais la production de courant reste limitée en durée. En effet, la consommation d'acétate dans le réacteur est plus rapide du fait de l'intervention de micro-organismes non-électroactifs. L'imagerie par microscopie a mis en évidence le développement d'un biofilm très hétérogène et sûrement parsemé d'inclusions non bactériennes, de débris organiques ou minéraux provenant des sédiments. Ces observations suggèrent que l'utilisation d'un milieu moins chargé en sédiment, en limitant la présence de bactéries non-électroactives et d'éléments salissant, pourrait amener à une électroactivité accrue des bioanodes en favorisant la formation d'un biofilm plus homogène et en limitant la compétition trophique. Des voies d'amélioration dans ce sens sont présentées dans la section 2 du chapitre 6. Avant de passer à la phase d'optimisation du procédé en inoculation sédimentaire, il reste à confirmer la possibilité pour cet inoculum multi-espèces de former des biofilms électroactifs sur des électrodes d'or.

## 5.2. Electrodes d'or

La majorité des bioanodes formées sur des électrodes d'or utilisait comme inoculum une souche pure de bactéries connues pour leur électroactivité. Une étude fait état de l'inoculation d'une surface d'or avec un inoculum multi-espèces mais il s'agit d'inoculum provenant d'une pile à combustible microbienne, donc en partie acclimaté (Alatraktchi et al., 2012). Cet inoculum n'a conduit qu'à des densités de courant de  $0,6 \text{ A/m}^2$ , ce qui est assez faible par rapport aux valeurs obtenues ici avec l'inoculum de sédiments marins sur les électrodes de carbone.

Les électrodes d'or polarisées à  $0,1 \text{ V/ECS}$  et inoculées avec les sédiments marins n'ont conduit à aucune production de courant. Dans ce premier cas, l'échec est attribué aux surfaces d'or proposées comme électrode. L'une d'elles consistait en une surface d'or lisse avec une rugosité de  $0,8 \text{ nm}$  qui, à l'observation en épifluorescence, ne semblait pas avoir permis la croissance d'un biofilm ni même l'adhésion importante de bactéries. L'autre électrode consistait en un dépôt d'or sur une languette de plexiglass. Ce dispositif était destiné à simplifier les manipulations en s'affranchissant du dispositif en téflon (Chapitre 2, section 3.1). A la suite de l'expérience, comme il peut être observé sur la Figure 11, le dépôt d'or était partiellement détaché.



Figure 11 : Premières tentatives d'électrodes d'or. A gauche l'électrode avant implémentation dans un réacteur, à droite après implémentation. Le dépôt est rongé.

La deuxième série d'expériences a utilisé des électrodes d'or avec une rugosité plus élevée, de  $4,5 \text{ nm}$ , disposées au sein du support téflon qui, malgré certaines difficultés de mises en œuvre, restait la meilleure solution disponible. Deux électrodes d'or sont implémentées au sein

de deux réacteurs inoculés à 10% en sédiments marins. Le suivi de l'intensité du courant montre une initiation rapide (Figure 12). Alors que le graphite nécessite 3 jours pour initier la production de courant, l'or ne prend que 1,5 jours. Cependant les performances restent basses avec des valeurs maximales de densités de courant de 1 et 2 A/m<sup>2</sup>. De plus, la production de courant dans le réacteur limité à 1 A/m<sup>2</sup> présente d'importantes perturbations. On aurait pu penser que l'établissement rapide des populations électroactives leur permettrait de prendre le pas sur les micro-organismes non-électroactifs permettant ainsi au biofilm d'atteindre des densités de courant plus élevées. On observe par contre une production de courant quasiment stable pendant 8 jours minimum avec les électrodes d'or, alors qu'elle n'était que de 4 à 6 jours avec les électrodes de graphite. Dans le cas d'une culture pure, cela serait uniquement expliqué par la consommation plus lente des substrats pour une activité catalytique plus faible. Dans le cas présent, avec un inoculum multi-espèces, la consommation des substrats par les bactéries électroactives ne représente qu'une proportion minimale de la consommation. En effet les rendements faradiques ne dépassent pas 13.2 % dans le réacteur le plus performant.

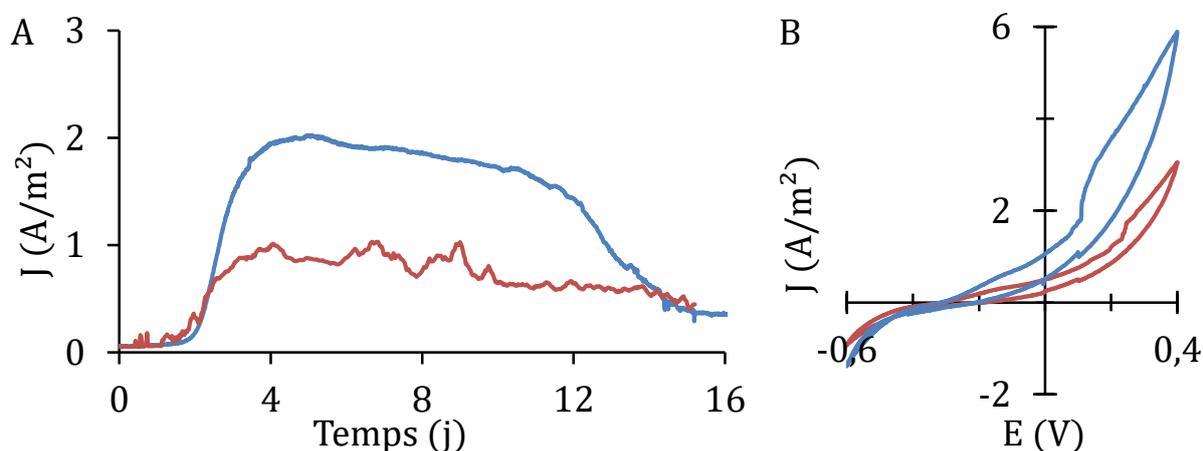


Figure 12 : Chronoampérogramme (A) et voltammogramme au jour 6 (B) des électrodes d'or inoculées à 10% avec des sédiments marins. 40 mM d'acétate et 30 mM de lactate sont fournis comme substrats. Les réacteurs sont maintenus à 30°C en condition anaérobie.

Des CV sont réalisées au jour 6 comme pour les expériences avec les électrodes en carbone. Les CV obtenues avec les électrodes d'or sont plus proches de ceux tracés avec les électrodes en feutre de carbone que de ceux tracés avec les électrodes de graphite plan. La production de courant n'apparaît que pour des potentiels assez élevés d'environ -0,2 V/ECS. Les transferts d'électrons à l'interface seraient donc plus faciles sur une électrode en graphite que sur les surfaces en or. Cela va à l'encontre de ce qui a été observé en culture pure avec les surfaces d'or colonisées par *G.sulfurreducens*.

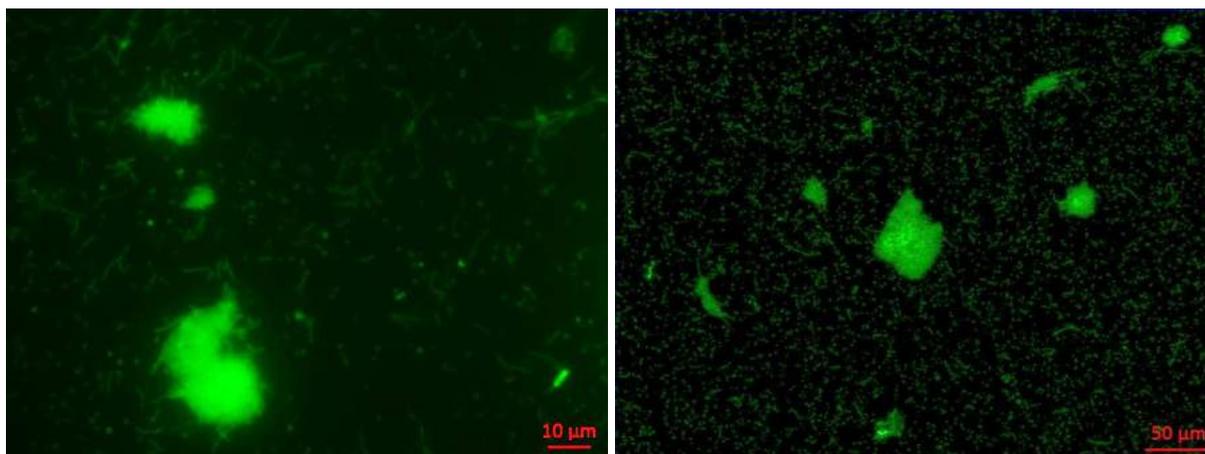


Figure 13 : Electrodes d'or observées en épifluorescence après marquage à l'acridine orange.

En fin d'expériences les électrodes sont observées en épifluorescence après un marquage à l'acridine orange. On observe le développement de micro-colonies assez denses, mais aucune formation de biofilm uniforme (Figure 13). Il est à noter que lors de la sortie des électrodes du réacteur et du marquage à l'acridine, une partie des dépôts a été décrochée de la surface d'or. L'adhésion des bactéries sur les surfaces d'or est donc fragile. Cependant, par rapport à la quantité de bactéries adhérees sur la surface, les densités de courant obtenues sont encourageantes. En effet, on peut penser qu'avec un biofilm recouvrant la surface et fortement adhééré, les électrodes d'or permettraient d'obtenir des densités de courant similaires à celles observées avec les électrodes carbonées.

L'utilisation d'électrodes d'or pourrait peut-être mener à une production de courant plus rapide et plus durable que ce qui a été observé avec les électrodes de graphite plan et de feutre de carbone. La surface d'or semble avoir induit une adaptation plus précoce des micro-organismes électroactifs. Les performances sont pourtant assez faibles, du fait du manque d'accroche du biofilm sur cette surface d'or qui reste peu rugueuse (4,5 nm). Les perspectives offertes par l'or pour former des bioanodes restent donc ouvertes. Pour les confirmer un point essentiel sera d'optimiser la topographie de surface afin d'augmenter l'adhésion bactérienne et favoriser la formation du biofilm.

## 6. CONCLUSION ET CHOIX D'ETUDE

Les expériences préliminaires décrites dans ce chapitre ont permis de faire un certain nombre de choix de base avant d'aborder le cœur de l'étude. Le matériau d'électrode a été le principal objet d'étude. Le nickel et l'argent ont été rapidement écartés après une discussion sur leurs caractéristiques et la complexité de leurs mises en œuvre au sein du projet Koropokkuru. Le choix s'est donc porté sur l'or et le cuivre. Une série de caractérisations électrochimiques abiotiques a confirmé les avantages potentiels de ces matériaux. Dans le cas du cuivre, il a cependant été nécessaire d'abaisser le potentiel prévu pour la formation des bioanodes de +0.1 à -0,2 V/ECS afin d'éviter l'oxydation de la surface.

Les surfaces d'or et de cuivre ont alors été testées au sein de réacteurs électrochimiques inoculés avec une culture pure de *Geobacter sulfurreducens*. Des électrodes de graphite plan ont systématiquement servi de comparaison. Le cuivre, n'a conduit à aucun courant caractéristique d'une activité bactérienne électroactive. Nous sommes persuadés que le cuivre reste un bon candidat pour la formation de bioanodes mais dans le cadre du projet de thèse, l'optimisation des conditions d'utilisation du cuivre se serait montrée trop chronophage pour être poursuivie. L'or a donné des résultats encourageants avec des densités de courant entre 3 et 6 A/m<sup>2</sup>. Cet écart significatif des performances traduit une variabilité importante sans doute due au dispositif. La comparaison avec le graphite qui assure des densités de courant de 20 à 30 A/m<sup>2</sup> est en défaveur de l'or. Les difficultés rencontrées avec le montage expérimental (résistivité du support téflon, efficacité du bullage ...) ainsi que la faible adhésion du biofilm sur la surface d'or sont les principales raisons de la variabilité observée et des performances en deçà du graphite. Ces premiers tests sur des électrodes d'or relativement lisses doivent donc amener à conclure que les possibilités d'optimisation sont importantes. Ces résultats préliminaires ont permis d'orienter les réflexions, en partenariat avec l'équipe du LAAS, selon deux axes. Dans un premier temps, il est apparu indispensable de développer un dispositif plus adapté pour l'implémentation et la connexion des surfaces d'or. Ensuite, comme envisagé dans le projet Koropokkuru, une optimisation de la topographie de surface est nécessaire afin d'assurer une meilleure adhésion des bactéries sur l'électrode et ainsi favoriser les transferts électroniques.

En parallèle ces expériences ont mis en évidence la perte d'électroactivité de la souche au fur et à mesure des repiquages effectués au laboratoire. La possibilité de conserver une souche active au sein d'un réacteur maintenu en acétate a été envisagée. Bien que l'électroactivité soit maintenue grâce au repiquage depuis ce réacteur, les performances ne sont pas à la hauteur de celles obtenues suite à une inoculation provenant de la souche commerciale (10 et 6 A/m<sup>2</sup> contre 30 et 20 A/m<sup>2</sup>). La capacité de garder à l'inoculum des propriétés constantes tout au long du travail de thèse est une condition essentielle afin de pouvoir comparer efficacement les surfaces testées. Il aurait sans doute été possible de stabiliser la souche par un maintien en réacteur électrochimique, mais cela aurait supposé un travail dédié important pour parvenir à améliorer les premiers résultats. Nous avons donc préféré écarter cette piste. La stabilité de l'inoculation sera donc assurée par la suite par l'utilisation sans repiquage de la souche commerciale et une standardisation de la quantité de bactérie injectée à chaque inoculation.

Dans un second temps, une série de tests a été effectuée en inoculum multi-espèces. Les électrodes carbonées ont montré de bonnes performances électrochimiques en produisant des densités de courant de 15 et 20 A/m<sup>2</sup> pour le graphite plan et 16 et 22 A/m<sup>2</sup> pour le feutre de carbone. L'utilisation d'un inoculum multi-espèces entraîne une compétition au sein des réacteurs entre les espèces électroactives et d'autres espèces consommant le substrat. En outre, les biofilms formés dans ces conditions sont hétérogènes en composition et en structure, cela causant sûrement des limitations dans la conductivité du biofilm et ses performances catalytiques. Ces deux observations ont amené à envisager des solutions d'épuration du milieu afin de mieux contrôler le développement bactérien au sein des réacteurs inoculés avec des sédiments marins. Différentes études dans ce sens sont présentées dans la section 2 du chapitre 6.

Enfin, les électrodes d'or inoculées avec ces sédiments provenant de marais salants ont produit des densités de courant assez faibles en comparaison des électrodes carbonées (6 et 3 A/m<sup>2</sup>) mais ont démontré des propriétés intéressantes en vue de l'optimisation envisagée dans cette thèse. En effet, l'efficacité des surfaces d'or utilisées dans ce chapitre est principalement limitée par la faible adhésion des bactéries mais la vitesse d'installation du biofilm électroactif en fait un matériau prometteur pour une utilisation en milieu complexe.



*Chapitre 4 :  
Optimisation de la rugosité  
de surface pour la  
formation de biofilms*



Bien que la formation de biofilms électroactifs soit possible sur des surfaces lisses (Richter et al., 2008; Ye et al., 2017), de nombreuses études indiquent que la rugosité de la surface permet d'augmenter les performances électroactives (Dumas et al., 2008a; Erable et al., 2009, 2010; In Ho et al., 2011; Cercado-Quezada et al., 2011; Ye et al., 2012; Bombelli et al., 2012; He et al., 2012; Kim et al., 2014; You et al., 2014; Guo et al., 2014; Thung et al., 2016; Tao et al., 2016). La rugosité de surface accroît l'adhésion des micro-organismes sur l'électrode, augmente la surface d'échange et améliore la vitesse des transferts électroniques.

Ce chapitre 4 présente dans la section 1 les objectifs du projet Koropokkuru en termes d'amélioration et de compréhension des interactions entre la rugosité d'une surface d'électrode et les micro-organismes électroactifs. Une discussion sur les paramètres appropriés caractériser la topographie d'une surface est présentée dans la section 2. Afin de posséder le plus d'informations possible sur les surfaces étudiées, une méthode de mesure des surfaces actives est normalisée dans la section 3. Ces deux axes de caractérisation des surfaces sont ensuite mis en œuvre pour l'étude de bioanodes formées sur des électrodes en or de rugosité variable. Les résultats sont rédigés sous forme d'une publication présentée dans la section 4. et discutée dans la section 5. Les conclusions générales de ces travaux sur la rugosité des électrodes sont énoncées dans la section 6.

## 1. OBJECTIFS ET CHOIX D'ETUDE

La revue bibliographique présentée dans la section 6 du Chapitre 1 fait apparaître comme évident que le contrôle de la topographie et de la structuration de la surface des électrodes constitue une des voies majeures vers l'exploitation optimale des micro-organismes électroactifs. C'est une des voies privilégiées au sein du projet Koropokkuru. Dans cet objectif il est tout d'abord nécessaire d'identifier les grandes lignes qui régissent les interactions entre les micro-organismes et les surfaces dans les systèmes électromicrobiens. C'est l'objet principal de l'étude présentée dans ce chapitre.

Une gamme d'électrodes présentant des rugosités croissantes a été réalisée au LAAS par électrodéposition d'or à des densités de courant croissantes. Au regard des conclusions tirées de l'étude bibliographique (Chapitre 1, section 6), les rugosités ciblées varient dans la gamme de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres car elles sont les plus impactantes sur la formation de biofilm. Il aurait été intéressant de pousser l'étude vers des rugosités plus élevées mais des limitations techniques ont empêché de poursuivre dans cette direction. En effet, comme décrit dans la suite dans ce chapitre, la plus forte rugosité étudiée présente une surface qui tend vers une structure poreuse. De par la technique de formation des rugosités par électrodéposition d'or, augmenter encore les densités de courant n'entraîne pas la formation de rugosité plus importante mais d'une structure poreuse. L'utilisation d'électrodes poreuses est un sujet largement abordé dans la littérature (Kumar et al., 2013; Xie et al., 2015) car elles offrent de grandes surfaces actives par rapport à leur encombrement. L'étude de telles électrodes sera abordée dans la section 4 du chapitre 5 et fait en outre l'objet d'une thèse menée par Poehere Chong au sein de notre équipe. De la même façon, dans la partie basse de la gamme de rugosité, en dessous du micromètre, les techniques de formation des électrodes sont

différentes et moins maîtrisées ce qui nous a amené à nous concentrer sur des rugosités micrométriques.

Une fois la gamme de rugosité à étudier définie, le travail s'est porté sur la caractérisation de ces surfaces. Un nombre important d'études traitant de l'incidence de la morphologie de surface sur les bioanodes n'utilise qu'une caractérisation partielle, voire uniquement une observation, des surfaces pour tirer des conclusions. Afin d'obtenir des conclusions plus solides, il a paru important d'appuyer les analyses sur une description précise et complète des surfaces. La sélection des paramètres appropriés constitue une étape essentielle vers la compréhension de leur capacité à servir de support à un biofilm électroactif.

## 2. CHOIX POUR LA CARACTERISATION DE LA RUGOSITE

Dans le domaine de la géographie, la généralisation cartographique est un processus qui en partant d'une carte la plus détaillée possible consiste à simplifier le contenu afin de conserver uniquement un nombre limité de paramètres pertinents, dirigé vers un objectif d'étude prédéfini. Le but est de réduire la quantité d'information en restant fidèle à l'information initiale afin de mettre en valeur les caractéristiques les plus importantes pour une étude donnée. A une échelle bien plus réduite, ce processus de généralisation peut être transféré à la caractérisation de surfaces pour l'étude de l'adhésion microbienne.

La cartographie des surfaces d'électrode la plus précise accessible dans le cadre de la thèse est fournie par les observations effectuées au microscope électronique à balayage (MEB) par l'équipe du LAAS. Ces observations, effectuées à des échelles allant d'une dizaine à une quelques micromètres (Figure 1), offrent une vision complète de la morphologie de la surface. Elles vont donc constituer notre outil de base pour la caractérisation des surfaces et la définition des paramètres de rugosité à utiliser dans cette étude.

De nombreux paramètres ont été développés afin de mesurer la rugosité d'une surface. Dans l'industrie, ces mesures sont harmonisées par les normes afin d'uniformiser les caractérisations. Dans le domaine de la recherche, les paramètres utilisés varient en fonction des besoins des études et de la capacité des équipes de recherche à mesurer ces paramètres. Par exemple, les mesures peuvent s'effectuer sur un profil de rugosité en deux dimensions, alors que d'autres instruments permettent la mesure en trois dimensions. La différence entre rugosité linéaire (paramètres  $R_i$ ) et surfacique (paramètres  $S_i$ ) réside dans l'exactitude de la caractérisation. Là où la rugosité linéaire définit un profil ou une moyenne sur un nombre restreint de profils, la rugosité surfacique définit une moyenne sur l'ensemble du champ de mesure. La rugosité surfacique donne des paramètres moyennés sur un plus grand échantillon et donc plus précis.

Dans un premier temps, les électrodes d'or testées dans cette étude étaient caractérisées par le LAAS grâce à un profilomètre mécanique, fournissant une valeur de rugosité linéaire. La comparaison avec les observations faites au MEB a fait apparaître ces mesures faussées par le manque de précision de l'appareil. En effet, l'écart type calculé sur les 3 mesures effectuées pouvait atteindre 25% de la valeur de la rugosité (électrode MG-1, Figure 1). De plus, dans certains cas, les valeurs de rugosités mesurées étaient de l'ordre de la centaine de nanomètres alors que sur les images MEB, même s'il est difficile d'évaluer la hauteur des aspérités,

montraient des cavités avec une profondeur supérieure au micromètre (électrode MG-4, Figure 1). Suite à ces observations, il a été décidé de faire de nouvelles mesures de rugosité, de type surfacique, afin d'obtenir une meilleure précision et de diversifier les paramètres.

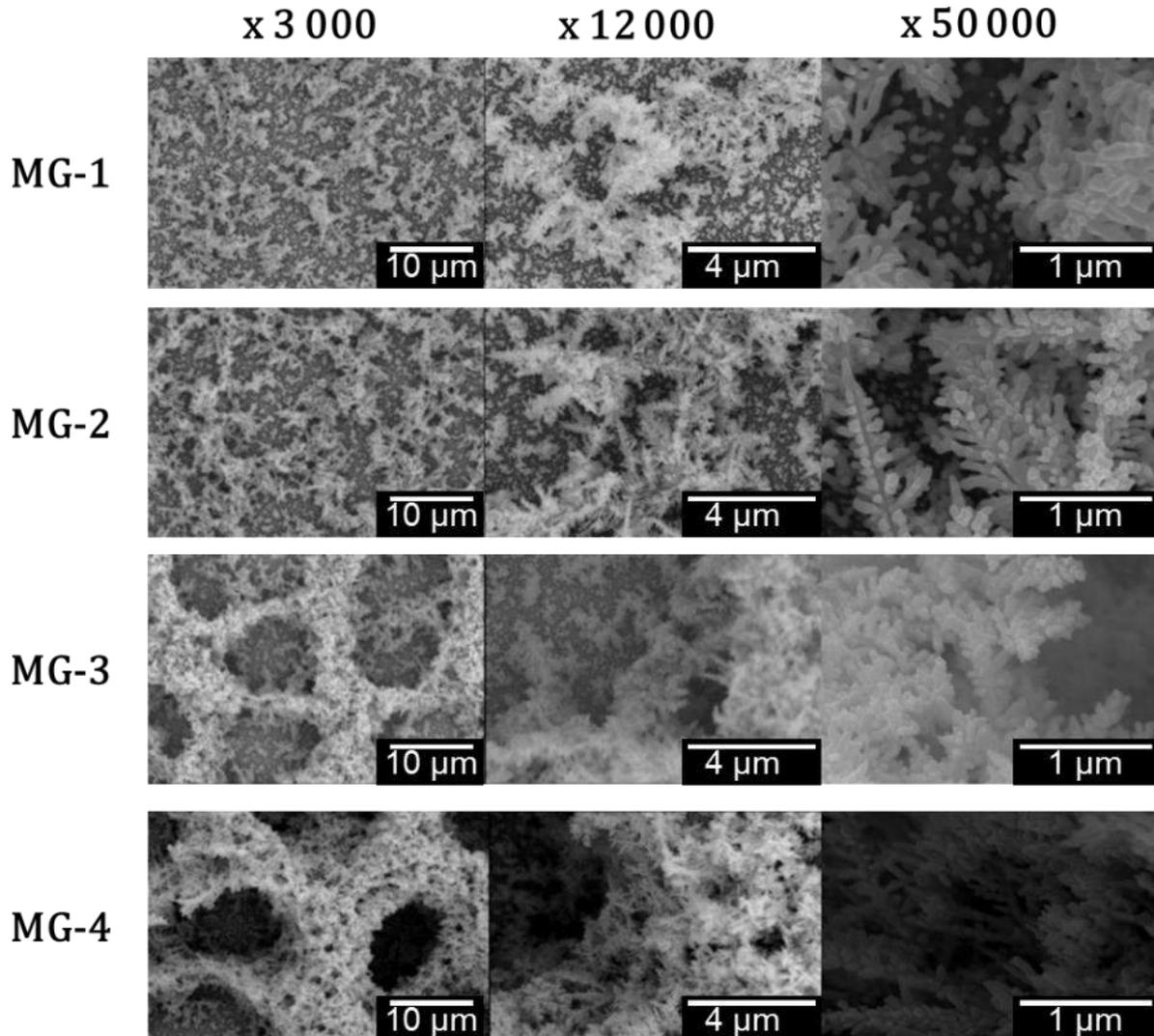


Figure 1 : Vue au MEB de la gamme de rugosité des électrodes d'or (MG-1 à MG-4) à trois grossissements différents ( $x 3\ 000$ ,  $x 12\ 000$  et  $x 50\ 000$ ). Les électrodes sont élaborées par électrodéposition avec 3 densités de courant différentes (voir conditions décrites dans la section 3.1 du chapitre 2).

Ces mesures ont été effectuées avec un profilomètre surfacique à imagerie confocale. Elles donnent accès à une dizaine de paramètres de rugosité, principalement ceux présentés dans la Table 1 de la revue bibliographique (Chapitre 1, section 6). L'objectif est de réduire ce nombre aux 4 ou 5 paramètres les plus représentatifs de nos surfaces. La plupart des études utilisent le  $R_a$  ou  $S_a$  car c'est un paramètre facile à obtenir qui constitue la référence en termes de mesure de rugosité. Il est défini comme la rugosité moyenne, c'est-à-dire la moyenne arithmétique, en valeur absolue, de la différence de hauteur de chaque point par rapport au plan moyen de la surface :

$$S_a = \frac{1}{A} \iint_A |z_{(x,y)}| dx dy \quad \text{Équation 1}$$

A est l'aire de la surface de mesure, x et y les coordonnées surfaciques et z la coordonnée perpendiculaire à la surface.

Ce paramètre est régulièrement associé au  $R_q$  ou  $S_q$  qui est la moyenne quadratique de la différence des hauteurs :

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{A} \iint_A z^2_{(x,y)} dx dy} \quad \text{Équation 2}$$

De par son calcul, en présence d'aspérités de grande amplitude, le  $R_q$  ou  $S_q$  présente des variations plus élevées que le  $R_a$  ou  $S_a$ . Les valeurs de  $S_a$  et  $S_q$  sont utilisées dans cette étude car elles offrent une indication sur la taille et la variation des rugosités et permettent une comparaison facile avec les autres études. Cependant, des surfaces différentes peuvent présenter les mêmes  $S_a$  et  $S_q$  (Figure 2), d'autres paramètres sont donc nécessaires pour affiner la caractérisation. En effet, ces paramètres ne traduisent qu'une moyenne mais ne donnent pas d'information sur la forme des pics, leur nombre ou encore leur uniformité.

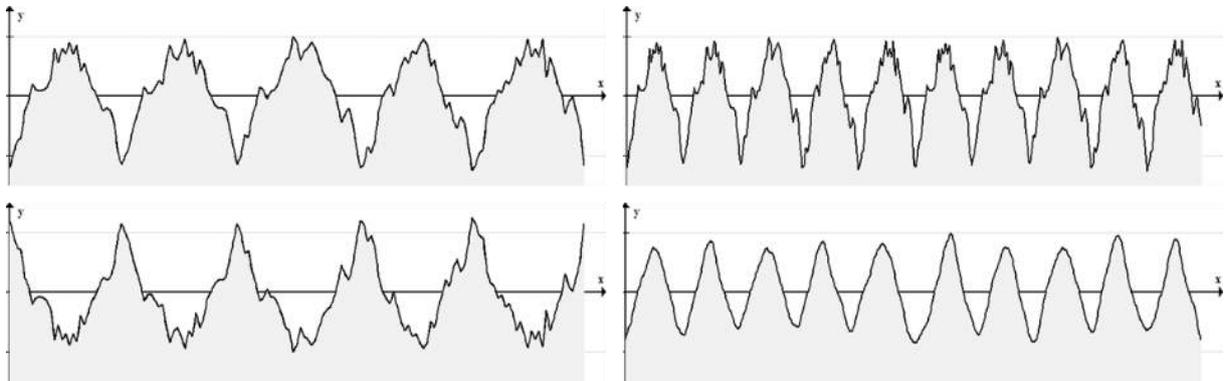


Figure 2 : 4 profils topographiques distincts présentant les mêmes  $R_a$  et  $R_q$ .

La mesure de l'amplitude des variations de rugosité  $S_z$  est aussi utilisée :

$$S_z = \max_A z_{(x,y)} - \min_A z_{(x,y)} \quad \text{Équation 3}$$

Cette grandeur, mise en relation avec le  $S_a$ , souligne l'homogénéité de la rugosité de surface. L'augmentation de l'écart entre  $S_a$  et  $S_z$  traduit la présence d'irrégularités importantes.

Les trois paramètres  $S_a$ ,  $S_q$  et  $S_z$  permettant d'apprécier la taille des rugosités, deux autres paramètres leur sont associés visant à assigner une valeur numérique à la morphologie des aspérités. Le paramètre  $S_{sk}$  (pour skewness en anglais) mesure l'asymétrie des aspérités par rapport aux creux :

$$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \iint_A z^3(x,y) dx dy \quad \text{Équation 4}$$

$S_{sk}$  détermine la prédominance des pics ou des creux. Lorsque la valeur de  $S_{sk}$  est négative, la surface est principalement constituée de creux et à l'inverse un  $S_{sk}$  positif traduit la présence dominante de pics. Ce paramètre a été sélectionné suite à l'observation des images au grossissement x 3 000 qui montrent deux structures différentes : un dépôt épars pour les électrodes MG-1 et MG-2 alors que les dépôts sont reliés entre eux et forment des cavités d'une dizaine de micromètres pour les électrodes MG-3 et MG-4 (Figure 1). Le paramètre  $S_{sk}$  devrait permettre d'identifier numériquement l'importance de ces cavités sur les différentes surfaces d'électrodes.

Le paramètre  $S_{ku}$  (pour kurtosis en anglais) détermine l'aspect plat ou pointu des aspérités de surface :

$$S_{ku} = \frac{1}{S_q^4} \left[ \frac{1}{A} \iint_A z^4(x,y) dx dy \right] \quad \text{Équation 5}$$

Des surfaces présentant des pics élevés et des vallées profondes donnent un  $S_{ku}$  supérieur à 3 alors que des surfaces avec des aspérités moins marquées ont un  $S_{ku}$  inférieur 3.

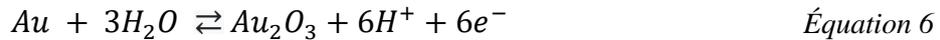
Cet ensemble de cinq paramètres ( $S_a$ ,  $S_q$ ,  $S_z$ ,  $S_{ku}$ ,  $S_{sk}$ ) apporte donc une caractérisation complète des surfaces en associant des mesures moyennes de rugosité, d'amplitude et de morphologie des aspérités. Deux autres paramètres avaient paru intéressants pour la description des surfaces d'or : la densité des pics  $S_{pd}$ , qui correspond au nombre de pics par unité de surface, et le rapport d'aspect de texture  $S_{tr}$ , qui mesure l'uniformité de la texture de surface. Ces deux mesures auraient permis de compléter le jeu de paramètres choisis en ajoutant des informations sur la texture de la rugosité. Il n'a pas été possible de mesurer ces paramètres. L'observation au MEB reste donc nécessaire à la caractérisation précise des surfaces. En effet, il est notable sur les images que la texture des électrodes devient de plus en plus homogène lorsque la rugosité augmente.

### 3. MISE AU POINT D'UNE MESURE ELECTROCHIMIQUE DES SURFACES ACTIVES

L'augmentation de la surface active des électrodes est un objectif important pour accroître la surface des biofilms électroactifs. Les observations et mesures effectuées grâce à la microscopie ont mis en évidence une augmentation importante de cette surface mais ne permettent pas de la mesurer. Il a donc fallu mettre en place une mesure de surface en veillant à ce qu'elle n'entraîne pas de modification ou dégradation de la surface. En effet, le nombre d'électrodes à notre disposition très réduit, ne permet pas de découpler les caractérisations de surface et les tests en réacteurs.

L'équipe du LAAS a suggéré d'utiliser une détermination électrochimique qui est non destructrice. Cette technique repose sur la formation de couches d'oxyde à la surface de l'or

pendant un balayage de potentiel (Rand et Woods, 1971; Burke et Nugent, 1997). L'or est oxydé selon la réaction :



Les potentiels de cette réaction varient de 1,213 à 1,267 V/ECS en fonction de l'hydratation de l'oxyde formé (Latimer, 1952) mais il a été montré expérimentalement que l'oxydation apparait à partir de 1,120 V/ECS (Wakkad et Din, 1954). L'oxydation a donc lieu sur une large gamme de potentiels ce qui ne permet pas d'identifier facilement le phénomène sur un balayage de potentiels dans cette gamme de valeurs de 1 à 1,5 V/ECS. En revanche, lorsque ces oxydes sont formés, le balayage retour présente un pic de réduction unique et bien défini à un potentiel de 0,896 V/ECS. L'intégration de ce pic de réduction donne la charge transférée directement proportionnelle à la quantité d'oxydes formés. Rand et Woods ont montré que cette mesure de charge donne la surface active des électrodes en appliquant un facteur de conversion selon la relation :

$$\text{Surface active (cm}^2\text{)} = \frac{\text{Charge transférée } (\mu\text{C})}{\text{Facteur de conversion } (\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2})} \quad \text{Équation 7}$$

Un facteur de conversion de 386  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  est utilisé régulièrement au LAAS d'après les publications de Rand et Woods 1971 et Burke et al, 1997.

D'un point de vue pratique, la mesure consiste à placer l'électrode à étudier en tant qu'électrode de travail au sein d'un montage à 3 électrodes en utilisant comme électrolyte une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,5 mol/L. 25 cycles successifs sont réalisés entre 0 et 1,8 V/ECS à une vitesse de 50 mV/s. Le signal se stabilise après une dizaine de cycles et les mesures sont donc effectuées sur les 10 derniers cycles. Les premières mesures sont effectuées sur des électrodes d'or nano-rugueuses (NG) montées sur le support téflon qui permet d'exposer à la solution une surface projetée de 1  $\text{cm}^2$  (Chapitre 2, section 3.1). Un exemple de voltammogramme est présenté sur la Figure 3. Conformément à la théorie, on observe une oxydation entre 1,1 et 1,8 V/ECS puis une réduction lors du balayage retour à 0,896 V/ECS. Le pic de réduction est intégré entre 0,8 et 1 V/ECS. En moyennant les mesures effectuées du cycle 15 au cycle 25 et en utilisant le facteur de conversion de 386  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , la surface active mesurée est de  $2,76 \pm 0,05 \text{ cm}^2$ . Cette mesure est assez éloignée de la surface géométrique de 1  $\text{cm}^2$  alors que l'électrode est peu rugueuse avec un  $R_a$  de 4,5 nm. Il semble que la méthode de mesure surestime la surface.

Avant de caractériser les électrodes micro-rugueuses MG-1 à MG-4, il a été décidé de vérifier cette méthode de mesure en utilisant une électrode d'or de rugosité identique à 4,5 nm mais structurée avec des micro-piliers hauts de 500  $\mu\text{m}$ , larges de 100  $\mu\text{m}$  et espacés de 200  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P200NG}$ ) qui sera utilisée dans l'étude présentée dans le chapitre 5. Une électrode de 1  $\text{cm}^2$  comporte 1156 piliers et sa surface géométrique est ainsi augmentée pour atteindre 3.31  $\text{cm}^2$ . La mesure électrochimique donne une surface de  $9,23 \pm 0,10 \text{ cm}^2$ , là encore largement supérieure à la surface géométrique.

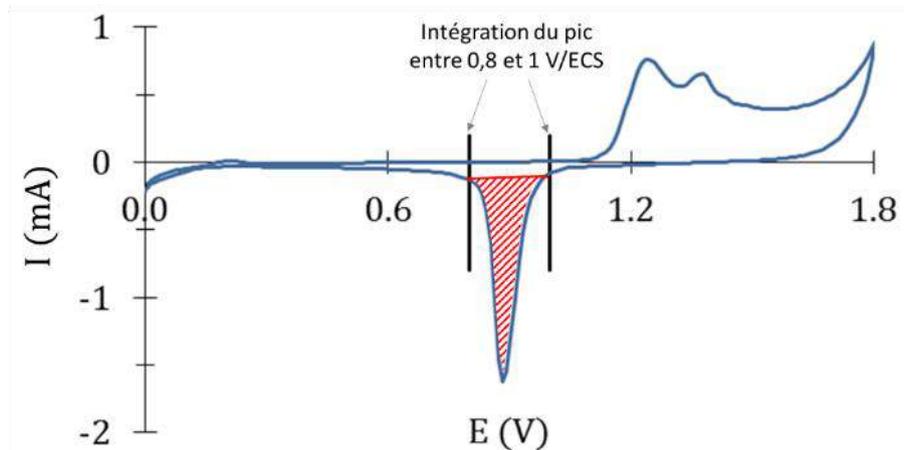


Figure 3 : Voltammogramme au cycle 25 d'une surface d'or nano-rugueuse (NG) dans une solution d' $H_2SO_4$  0,5 M. Le pic observé en réduction entre 0,8 et 1 V/ECS traduit la réduction des oxydes d'or formés en oxydation entre 1,1 et 1,8 V/ECS.

Il apparaît que le rapport entre les surfaces géométrique et mesurée est pratiquement identique pour ces deux mesures (2,76 et 2,79 respectivement pour NG et  $\mu$ P200NG). Une rugosité de 4,5 nm étant peu susceptible d'augmenter presque par 3 la surface active d'une électrode, l'hypothèse est faite que le facteur de conversion n'est pas adapté à notre type de surface. En effet, la publication de référence utilisée par le LAAS (Rand et Woods, 1971) indique que le facteur de conversion de  $386 \mu C/cm^2$  est une supposition faite pour une monocouche d'oxyde formée sur de l'or monocristallin plan Au(100). D'autres équipes ont démontré que cette valeur n'était pas identique pour de l'or monocristallin orienté différemment ou de l'or polycristallin (Brummer et Makrides, 1964; Oesch et Janata, 1983; Angerstein-Kozłowska et al., 1986, 1987). Dans notre cas, l'or électrodéposé n'est sûrement pas monocristallin et cela peut entraîner une variation dans le coefficient de conversion à utiliser. Les valeurs mesurées sur les électrodes NG et  $\mu$ P200NG sont donc utilisées pour définir un nouveau facteur de conversion empirique adapté à cette étude.

Le facteur de conversion utilisé pour les prochaines mesures de surfaces effectuée dans la thèse sera donc de  $1065 \mu C/cm^2$ . Il correspond à prendre comme surface de standard la surface nano-rugueuse ( $Ra = 4,5$  nm) dont la surface active est prise égale à la surface projetée.

Suite à cette normalisation de la méthode de mesure, les électrodes MG-1 à MG-4 sont mises en place dans le dispositif. Avant même de lancer les acquisitions, un problème évident apparaît. Du fait de la rugosité de l'or, les surfaces induisent la formation de nombreuses bulles d'air. Différentes solutions ont été envisagées afin d'éviter la formation de ces bulles. La sonication par ultra-sons est souvent utilisée pour faire s'échapper des bulles de gaz emprisonnées sur des surfaces rugueuses. Cette option a été rapidement écartée car bien que le dépôt d'or semble solide, le passage des électrodes aux ultrasons risquerait de le détériorer. Une seconde option consiste à faire partiellement le vide dans le réacteur pour favoriser le dégazage des surfaces. Là encore, cette option a été écartée après quelques tests qui ont prouvé la difficulté à réaliser le vide, même partiel, dans notre dispositif. Le vide atteint n'était pas suffisant pour détacher les bulles d'air. La dernière solution explorée est l'augmentation de

l'hydrophilie de la surface qui permettrait d'assurer sa mouillabilité totale après immersion. Plusieurs traitements chimiques de nettoyage des électrodes sont connus pour augmenter l'hydrophilie: un nettoyage à l'acétone et un nettoyage à l'acétone puis avec une solution dite « piranha » ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$ , 1:1). Ces nettoyages sont peu agressifs pour les surfaces d'or, ils ont donc été testés. Le nettoyage à l'acétone et à la solution piranha, associé à une immersion initiale à l'horizontale, a permis d'éviter la formation de bulles et donc d'effectuer les mesures de surface sur les dépôts d'or. Ce traitement a été utilisé par la suite lors de l'implémentation des électrodes en réacteur biotique.

Les voltammogrammes obtenus sont semblables à ceux tracés avec les surfaces d'or nano-rugueuses NG (Figure 4). Le facteur de conversion de  $1065 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  est utilisé pour déterminer la surface. La formation de rugosité permet une augmentation de la surface active de 9 à 40 fois pour les électrodes MG-1 à MG-4 par rapport à l'or NG.

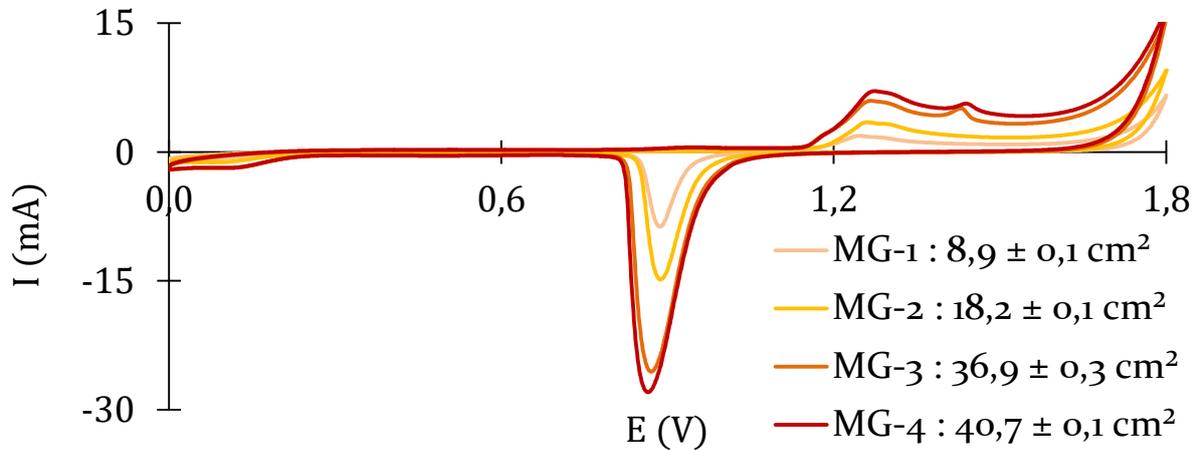


Figure 4 : Voltammogrammes au cycle 25 des électrodes d'or rugueuses MG-1 à MG-4 dans une solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,5M. Les moyennes et écarts-types des surfaces mesurées sont donnés en légende.

La mise au point de cette technique a permis d'obtenir des mesures précises des surfaces actives des électrodes, l'écart-type maximal étant de  $0,3 \text{ cm}^2$  sur les 10 cycles ayant servi à la mesure. La normalisation de la mesure par rapport à l'or nano-rugueux de  $R_a = 4,5 \text{ nm}$  apporte un bon paramètre de comparaison et est cohérente car l'ensemble des surfaces sont formées sur une base d'or à  $4,5 \text{ nm}$ .

#### 4. PERFORMANCE ANODIQUE SELON UNE GAMME DE MICRO-RUGOSITE

Les bioanodes ont été formées en inoculant les électrodes d'or micro-rugueuses avec une culture de *Geobacter sulfurreducens* au sein de réacteurs électrochimiques anaérobies. Des densités de courant maximales allant de  $5,8$  à  $14,3 \text{ A}/\text{m}^2$  ont été mesurées. Après la caractérisation des surfaces d'or rugueuses grâce aux paramètres de rugosité présentés dans la section 2 et les mesures de surfaces présentées dans la section 3, l'efficacité des bioanodes est étudié au-travers du prisme des interactions entre surface et biofilms. Cette étude a été soumise dans *Electrochimica Acta*.

## Impact of surface micro-roughness on biofilm formation and current production of microbial anodes

Pierre Champigneux, Cyril Renault-Sentenac, David Bourrier, Carole Rossi, Marie-Line Delia, Alain Bergel

Submitted to *Electrochimica Acta* in April 2018

### Abstract

The early formation of electroactive biofilms was investigated with gold electrodes inoculated with *Geobacter sulfurreducens*. Biofilms were formed under an applied potential of 0.1 V/SCE with a single batch of acetate 10 mM. Gold electrodes were elaborated with different surface roughnesses in such a way that roughness was the only parameter that affected the biofilm formation. Surface micro-roughness with arithmetical mean height  $S_a$  ranging from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$  increased the current density by a factor of more than 4 with respect to smooth electrodes ( $S_a < 0.01 \mu\text{m}$ ). In the micro-roughness range, the current density increased linearly with  $S_a$ . The roughness morphology also proved to play a part. Cyclic voltammetry suggested that nano-sized dendrite ramifications, which corresponded to values of the kurtosis parameter ( $S_{ku}$ ) above 2, could enhance electron transfers. In contrast, superimposed micro-cavities, around 10- $\mu\text{m}$  in size, accelerated the biofilm growth locally but did not have an effect on the current density in addition to that of the increase in  $S_a$ .

**Keywords:** Bioanode; surface roughness; *Geobacter sulfurreducens*; gold; microbial fuel cell; bioelectrochemical system.

### 1. Introduction

Over the past fifteen years, the electroactive properties of microorganisms have motivated a profusion of inspiring work in bioelectrochemical systems (Bajracharya et al., 2016; Schröder and Harnisch, 2017). Microbial anodes have been the main focus, especially in microbial fuel cells (MFCs), and have given rise to wide range of applications (Wang and Ren, 2013). Microbial anodes are core elements of many innovative processes, such as microbial electrolysis cells for hydrogen production (Escapa et al., 2016; Roubaud et al., in press), methane production (Geppert et al., 2016) or metal recovery (Dominguez-Benetton et al., 2018), microbial autonomous biosensors (Pasternak et al., 2017), and a microbial snorkel for environmental bioremediation (Erable et al., 2011).

Although great advances have been made in terms of electrode material, reactor design and understanding of the metabolic pathway, the research community is still facing many challenges concerning both biotic and abiotic obstacles. One of the major issues is the optimization of the electrode/bacteria interface. The predominant role of electrode topography has been pointed out in many studies (ter Heijne et al., 2008; Sun et al., 2010; Peng et al., 2010; Fan et al., 2011; Pons et al., 2011; Pocaznoi et al., 2012; Ye et al., 2012; Maestro et al.,

2014; Kalathil and Pant, 2016) but controversial results have been reported, which do not yet highlight clear tendencies. For instance, it has been claimed that the difference of current density obtained with two different electrode materials is related more to the difference in surface roughness of the two electrodes than to the difference in the electrode materials (Dumas et al., 2008b). Stainless steel electrodes inoculated with *Geobacter sulfurreducens* have shown that increasing the average surface roughness from 2 to 4  $\mu\text{m}$  increases the biofilm coverage and the current production, but has no effect at lower values, ranging from 0.1 to 2  $\mu\text{m}$  (Pons et al., 2011). In contrast, another study that inoculated stainless steel electrodes with a complex inoculum reported no positive effect of 5  $\mu\text{m}$  roughness vs. a smooth surface (Pocaznoi et al., 2012). The variability of the effect of roughness between these two cases may be attributed to other differences in the two systems: a pure culture in a minimal synthetic medium in the former study vs. a multi-species inoculum in a chemically-rich medium in the latter. A third study, which used flame oxidation to increase the roughness of stainless steel electrodes from 75 to 151 nm, reported higher current and better biofilm coverage with higher roughness. Nevertheless, in this case, it was difficult to unravel the impact of surface topography from that of the chemical modification of the surface (Guo et al., 2014). These few examples show that, on the one hand, variation of roughness is often linked to variation in surface chemistry and that, on the other hand, the variability of techniques used to modify surface roughness does not allow direct comparisons of the different studies. For these reasons, several research teams have turned to surface structuration as a way to control the surface topography by minimizing the changes of other surface properties (Champigneux et al., 2018; Inoue et al., 2012; Kano et al., 2012; Kim et al., 2014; Siu and Chiao, 2008).

The purpose of the present work was to advance in the basic understanding of the influence of surface roughness on the early stage of biofilm formation. In order to focus as accurately as possible on the actual impact of the topography, gold electrodes were used. Gold has been demonstrated to be suitable for forming efficient microbial anodes (Chiao et al., 2006; Liu et al., 2010; Malvankar et al., 2011; Richter et al., 2008) and it allows accurate control of the surface roughness, for example, by using electrodeposition to prepare the electrode surface. In addition, confocal microscopy and MEB imaging were used to characterize the surface topography as precisely as possible. Microbial anodes were formed with pure cultures of *Geobacter sulfurreducens*, which is a widely-used model electroactive bacterium (Bond and Lovley, 2003).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Preparation of gold electrode with different surface roughness values**

Nano-rough gold (NG) surfaces 1  $\text{cm}^2$  in area were formed on Si (100), P-type silicon wafers. The electrodes were formed by evaporation of a 250 nm thick gold layer followed by electrolytic deposition of gold to achieve a 1.75  $\mu\text{m}$  thick gold layer. The average roughness, measured by AFM, was 4.5 nm for the NG surfaces. Then, surface roughening was achieved by electrolytic growth of an additional gold layer. The 4.5 nm rough gold substrates were immersed in a bath of chloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ , 2 mM) and sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96%, 2 mM). Four different current densities were applied: 0.35  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , 0.69  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , 1.39  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  and 2.08  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  in order to achieve different gold deposition rates, which led to 4 different electrode topographies with micro-rough surfaces, named MG-1 to MG-4. Each electrode was produced in duplicate.

## 2.2. Electrochemical set-up

The microbial anodes were formed in single compartment reactors that contained 300 mL of culture medium. The reactors were tightly sealed and a gaseous mix of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (80:20) was continuously and gently sparged into the solution to ensure anaerobic conditions. The gas sparger was located behind the auxiliary electrode and directed towards the reactor wall to avoid disturbance of the working electrode by gas bubbling. The temperature was kept at 30 °C with a water-bath. Two series of experiments were performed with each type of electrode.

Gold surfaces were tested as the working electrodes in a 3-electrode configuration after being mounted on a polychlorobiphenyl (PCB) support. The gold surfaces were connected to the contact pads on the PCB using a micro-welding machine KnS 4526 and passivation was performed with a biocompatible silicon (Loctite 4562). A platinum grid (Heraeus SAS, Germany) was used as the auxiliary electrode and a saturated calomel electrode as the reference (SCE, potential +0.24 V/SHE). A constant polarization of 0.1 V/SCE was applied to the working electrodes (VSP potentiostat, Bio-Logic SA, France). Current densities were expressed with respect to a projected surface area of the anodes of 1 cm<sup>2</sup>. The chronoamperograms were analysed by determining the maximum current density that was reached ( $J_{\max}$ ) and the time required for the electrodes to start to produce current. This starting time was defined as the time at which current density reached 10% of  $J_{\max}$ . The rate of current establishment was assessed by the average derivative of the current vs. time calculated over 1 day around the inflection point of the chronoamperograms. Cyclic voltammeteries between -0.6 and 0.1 V/SCE were also performed at 1 mV/s to characterize the electrodes initially, at day 6 and at the end of the experiment.

## 2.3. Inocula and media

*Geobacter sulfurreducens* (ATCC 51573) purchased from DSMZ was grown in specific growth medium that contained, per litre: 0.1 g KCl, 1.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.82 g CH<sub>3</sub>COONa. This medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes. After sterilization, the medium was completed with 8 g/L sodium fumarate filtered at 0.22 µm, 10 mL/L Wolfe's vitamin solution (ATCC MD-VS) and 10 mL/L modified Wolfe's minerals (ATCC MD-TMS). A pre-culture of *G. sulfurreducens* was prepared for 3 days in a fresh deoxygenated culture medium (2% v/v, 30 °C) to reach a final absorbance of around 0.4 at 620 nm. Reactors were filled with growth medium, vitamin solution and modified Wolfe's minerals and constantly sparged with N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) for deoxygenation. After 20 minutes of deoxygenation under open circuit potential, the electrodes were characterized by an initial cyclic voltammetry. Then, reactors were inoculated with the pre-culture. The inoculation volume was adjusted to obtain the cell density in each reactor that corresponded to an inoculation ratio of 10% v/v with an inoculum at 0.4 absorbance. After the inoculation, acetate 10 mM was added to the medium as the sole electron donor; no fumarate was present.

## 2.4. Microscopic imaging and electrode characterization

The electrode surfaces were observed on a Hitachi S-4800 scanning electron microscope (SEM) in low vacuum mode at an accelerating voltage of 15 kV and an intensity of 15 µA. Various magnifications and locations were used to characterize the surfaces. Using a non-contact 3D optical profiler (S-Neox, Sensofar), different spatial surface roughness parameters

were determined: arithmetical mean height ( $S_a$ ), root mean square height ( $S_q$ ), maximum height ( $S_z$ ), skewness ( $S_{sk}$ ) and kurtosis ( $S_{ku}$ ). The parameter values were averaged on 20% of each surface.

The electrochemically active surface area of the electrodes was measured following the technique described by Burke et al. (Burke and Nugent, 1997). The electrodes were first soaked in an  $H_2O_2/H_2SO_4$  (1:3) solution to reduce the hydrophobicity and thus avoid gas retention on the surface during the measure. Cyclic voltammetry was performed between 0 and 1.8 V/SCE in  $H_2SO_4$  0.5 M, following two successive phases: firstly, 25 cycles were performed at  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  in order to clean the surface, then 25 cycles were performed at  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  for the measurement. A reduction peak appeared between 0.8 and 0.9 V/SCE, which was assumed to be due to the formation of a monolayer of gold oxide. The charge related to the peak was calculated by integration and linked to the electrode surface area with the equation:

$$\text{Electrochemically active surface area (cm}^2\text{)} = \frac{\text{Charge transferred } (\mu\text{C})}{\text{conversion factor } (\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2})} \quad (1)$$

where the conversion factor given by Burke et al. (Burke and Nugent, 1997) was  $386 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  for gold. The technique was calibrated by using the NG electrodes that had an average surface roughness of 4.5 nm. Equation (1) gave a surface area of  $2.76 \text{ cm}^2$ . This value was plainly overestimated as the projected surface area was only  $1 \text{ cm}^2$  and it seems unlikely that the surface area would be multiplied by a factor of 2.76 with a surface roughness of only 4.5 nm. It was speculated that the electrodeposition technique used here to prepare the electrodes led to the formation of more than one molecular layer of oxide in comparison to the monolayer assumed by Burke and Nugent for plain gold. Accordingly, Equation (1) was recalibrated by a factor of 2.76. Physically, this means that the electrochemically active surface areas were measured here by taking the surface area of the NG electrodes as the reference.

At the end of the experiments, the bioanodes were stained with Syto 9 at  $2.5 \mu\text{M}$  for 10 min, then carefully washed with medium and dried at ambient temperature. The electrodes were imaged with a Carl Zeiss AxioImager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (Evolution VF). Several different spots were imaged in order to have a good representation of the general pattern of the colonization.

Epifluorescence images were analysed by greyscale interpretation to calculate the ratio of the electrode surface area covered by bacteria. The grey intensity threshold between the areas covered by the bacteria and the non-covered areas was set manually. Grey levels greater than the threshold value were considered to correspond to colonized areas, while lower grey levels were considered to show clean areas. Six images, of dimensions  $866$  by  $645 \mu\text{m}$ , were treated for each electrode to determine the average covering ratio, the edges of the electrodes being excluded to avoid the impact of side effects.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Electrode topography

The gold surfaces prepared by electrodeposition at different current densities (see section 2.1) were observed by SEM (Figure 1). The MG-1 and MG-2 surfaces, formed at 0.35 and 0.69 A/m<sup>2</sup>, presented randomly distributed deposits that covered around 50 and 70% of the surface, respectively. The higher electrodeposition current densities of 1.39 and 2.08 A.m<sup>-2</sup> led to round cavities about 10 μm in diameter on the two surfaces, MG-3 and MG-4. It was observed during the electrodeposition phase that gas bubbles evolved from the electrode. At the lower current densities (MG-1 and MG-2), electrodeposition was slow and was not impacted by bubble evolution. The bubbles detached from the surface without impacting the deposition. For MG-3 and MG-4, gold deposition was faster and tended to entrap the bubbles in the deposited structure. This phenomenon created the crater pattern with characteristic size of around 10 μm.

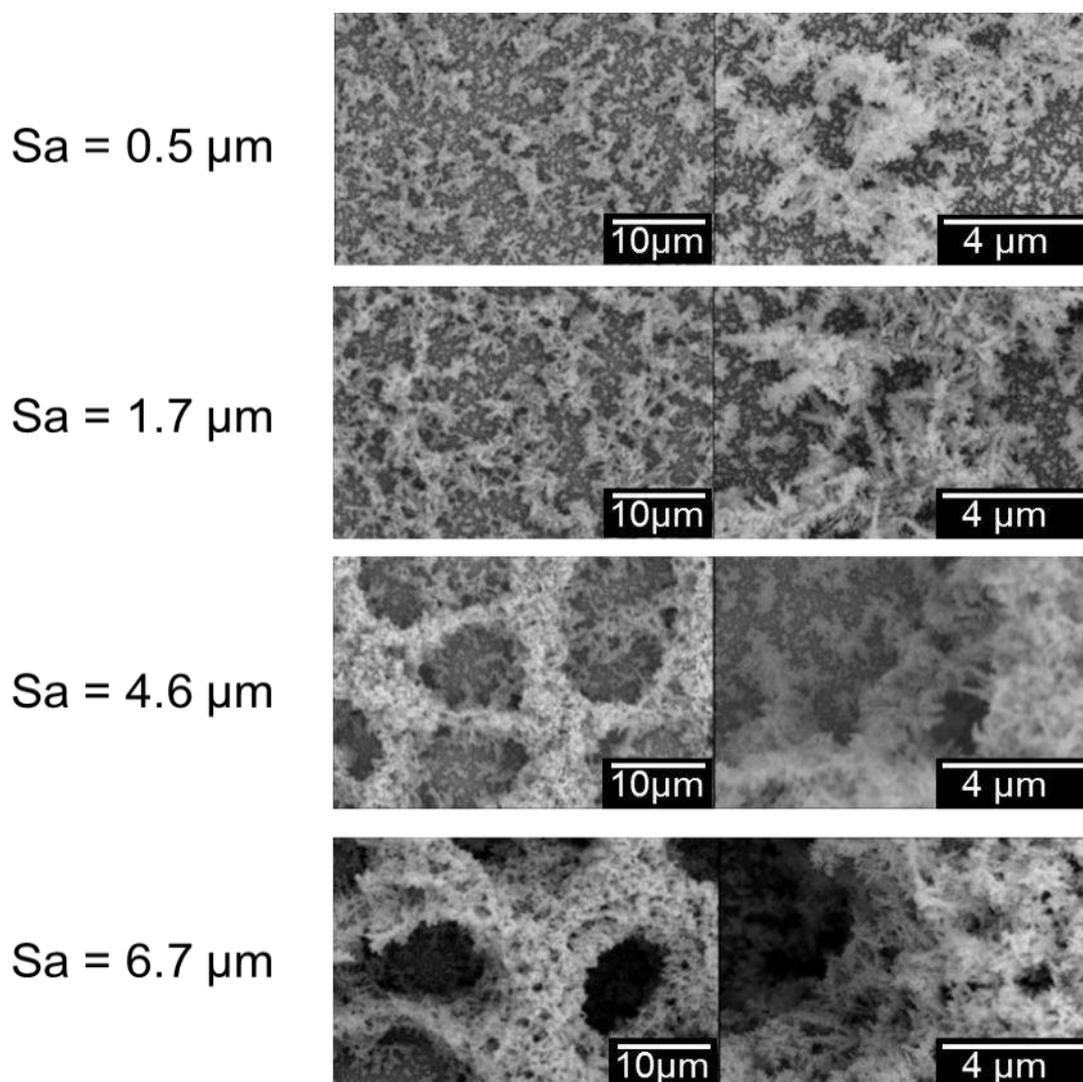


Figure 1 : Optical characterization of the MG-1 to MG-4 gold electrodes by SEM imaging.

As expected, higher deposition current densities led to higher gold coverages. In addition, the highest current densities resulted in a superimposed crater pattern, which could provide a good environment for bacterial adhesion. As reported in many studies devoted to biofilm formation on solid surfaces (Characklis and Marshall, 1990; Díaz et al., 2008; Edwards and Rutenberg, 2001), the presence of cavities creates areas where shear forces are low and reduces the strength needed for primary attachment of cells to the surface.

Higher magnification showed that gold formed fir-shaped deposits, called nanodendrites, on the MG-1 and MG-2 electrodes, while this shape tended to disappear on the MG-3 and MG-4, probably due to the obvious densification of deposition.

The topographical analysis performed by confocal scanning microscopy provided the spatial roughness parameters reported in Table 1. Spatial parameters were determined by averaging on a two-dimensional area instead of being measured along a profile as is done more commonly. For instance, the spatial arithmetical mean height ( $S_a$ ) is similar to the widely-used  $R_a$  parameter, but is averaged over a surface area instead of along a line. Table 1 shows that the arithmetical mean height ( $S_a$ ), the root mean square height ( $S_q$ ) and the maximum height ( $S_z$ ) increased with the current density imposed during electrodeposition.  $S_a$  ranged from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$  and was linearly proportional to the electrodeposition current density.

The kurtosis ( $S_{ku}$ ) expresses the sharpness of the peaks and valleys with a dimensionless parameter. A value under 3 is agreed to be characteristic of rounded roughness features while a value above 3 describes topographical profiles with sharp edges. Except for MG-1, all surfaces exhibited values under 3, meaning that the edges of the topography tended to be rounded and this phenomenon increased as the electrodeposition current density increased. On the MG-1 surface, the high  $S_{ku}$  value of 4.4 reflected the sharper edges of the surface topography. It was consistent with SEM images, revealing a deposition pattern of isolated nanodendrites clusters at low current density, which tended to disappear with the densification of the deposition at higher current densities. It was also consistent with the non-linear correlation between the electrodeposition current density and the electrochemically active surface area (Table 1). The surface area increased with the imposed current density but the increase was lower at the highest current densities, when deposition became denser. The formation of smooth surface features may be of great interest in terms of microbial adhesion because it has been stated that the sharpness of a structure could be detrimental for bacterial adhesion (Edwards and Rutenberg, 2001; Kargar et al., 2012; Ye et al., 2017). Actually, the presence of sharp edges imposes a considerable deformation on the cell adhering to the surface, which requires an energy expense that is detrimental to bacterial development. In the present case, all surfaces showed smooth features compatible with bacterial adhesion.

*Table 1 : Electrochemically active surface area and spatial roughness parameters as a function of the current densities used to perform gold electrodeposition ( $J_{deposition}$ ). The electrochemically active surface area ( $A_e$ ) was measured following the electrochemical protocol described in section 2.4; spatial roughness parameters were measured from confocal SEM imaging.  $S_a$ : Arithmetical Mean Height,  $S_q$ : Root Mean Square Height,  $S_z$ : Maximum Height,  $S_{ku}$ : Kurtosis,  $S_{sk}$ : Skewness.*

Anode	$J_{deposition}$ (A.m <sup>-2</sup> )	Surface area $A_e$ (cm <sup>2</sup> )	$S_a$ ( $\mu$ m)	$S_q$ ( $\mu$ m)	$S_z$ ( $\mu$ m)	$S_{ku}$	$S_{sk}$	Roughness morphology
NG	-	1.0	0.0045	0.0054	0.0212	3.1	-0.3	None
MG-1	0.35	8.9	0.5	0.7	8.2	4.4	-0.1	Fir-shape nanodendrites
MG-2	0.69	18.2	1.7	2	21.8	2.4	0	Fir-shape nanodendrites
MG-3	1.39	36.8	4.6	5.5	44.7	2.1	-0.4	Micro-cavities
MG-4	2.08	40.7	6.7	7.7	59.1	1.8	-0.4	Micro-cavities

The dimensionless  $S_{sk}$  parameter, called skewness, reflects the symmetry of the roughness profile. Values of -0.1 and 0 for the MG-1 and MG-2 surfaces expressed the relative symmetry of the surface, where peaks and valleys were equally present. The negative values of -0.4 for the MG-3 and MG-4 surfaces meant that the surface presented a predominance of valleys or cavities in comparison with peaks. It has been stated that valleys could create quiet spaces for bacterial adhesion, but if they became too numerous, they could also lead to the entrapment of colonies in a cavity and thus reduce the biofilm formation (Vasudevan et al., 2014; Yang et al., 2015). It was consequently difficult to anticipate the optimum value of this parameter for bacterial adhesion. The  $S_{sk}$  value for NG was quite negative but it was due to small, hole imperfections on an otherwise flat surface.

Cyclic voltammetry was performed between -0.6 and 0.1 V/SCE with the clean electrodes. The forward and backward scans of the cyclic voltammetry became more and more separated as the surfaces became rougher. This was consistent with the increased electrochemically active surface area, which resulted in increased capacitive current.

### 3.2. Effect of micro-roughness on the establishment of electroactivity

The electroactive biofilms were formed in two identical experimental runs (#1 and #2), each performed with 5 electrodes: 1 nano-rough electrode (NG) and 4 micro-rough electrodes (MG-1 to 4), under an applied potential of 0.1 V/SCE. For each experimental run, the five reactors were inoculated with the same pre-culture of *Geobacter sulfurreducens*.

The two NG electrodes from Runs #1 and #2 reached maximum current densities of 1.4 and 1.7 A.m<sup>-2</sup>, respectively. This maximum value is consistent with the average value of  $2.5 \pm 2.0$  A.m<sup>-2</sup> found in a previous study performed with 7 identical nano-rough gold electrodes

(Champigneux et al., 2018). The maximum current densities ( $J_{\max}$ ) recorded with the micro-rough electrodes were significantly higher, ranging from 9.1 to 14.3  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  for Run #1 and from 5.8 to 11.4  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  for Run #2 (Figure 2). MG electrodes produced more than 4 times the current of NG electrodes. The presence of micro-roughness causes a significant jump in current production compared to smooth (nano-rough) electrodes.

In the range of micro-roughness, the  $J_{\max}$  values increased linearly with the  $S_a$  parameter values from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$  (Figure 3.A). This linear relationship was not valid for the NG electrodes, which showed that the presence of micro-roughness caused an actual jump in the current produced.

A correlation was sought by expressing the maximum current density recalculated with respect to the electrochemically active surface area ( $A_e$ ). In this form, the current density decreased with  $S_a$  (Figure 3.B). This means that the surface area increase caused by roughening was not fully translated into increased current production. As observed in section 3.1, when the roughness increased, the increased electrochemically active surface area was less and less accessible for microbial settlement, which explained the decrease observed in Figure 3.B.

These comments raise the nagging question of the most appropriate way to measure the active surface area available for biofilm settlement. Here, expressing the current density with respect to  $A_e$  gave considerably higher values for the NG electrodes while, in practice, the NG electrodes produced smaller currents, so the electrochemical technique used here overestimated the surface area available for biofilm development. The electrochemical measurements were based on the oxidation and reduction of the oxide layers, which involves only a few monomolecular layers on the gold surface. This measurement scale, at the Angstrom level, was much too small to assess the surface available for microbial cells, which have characteristic sizes of at least 1 micrometre. The electrochemically active surface area used here was a useful parameter for assessing the increase of surface area caused by the roughness but it could not be used to calculate the actual local current density. This surface area is overestimated with respect to the surface area that is really available for cell settlement.

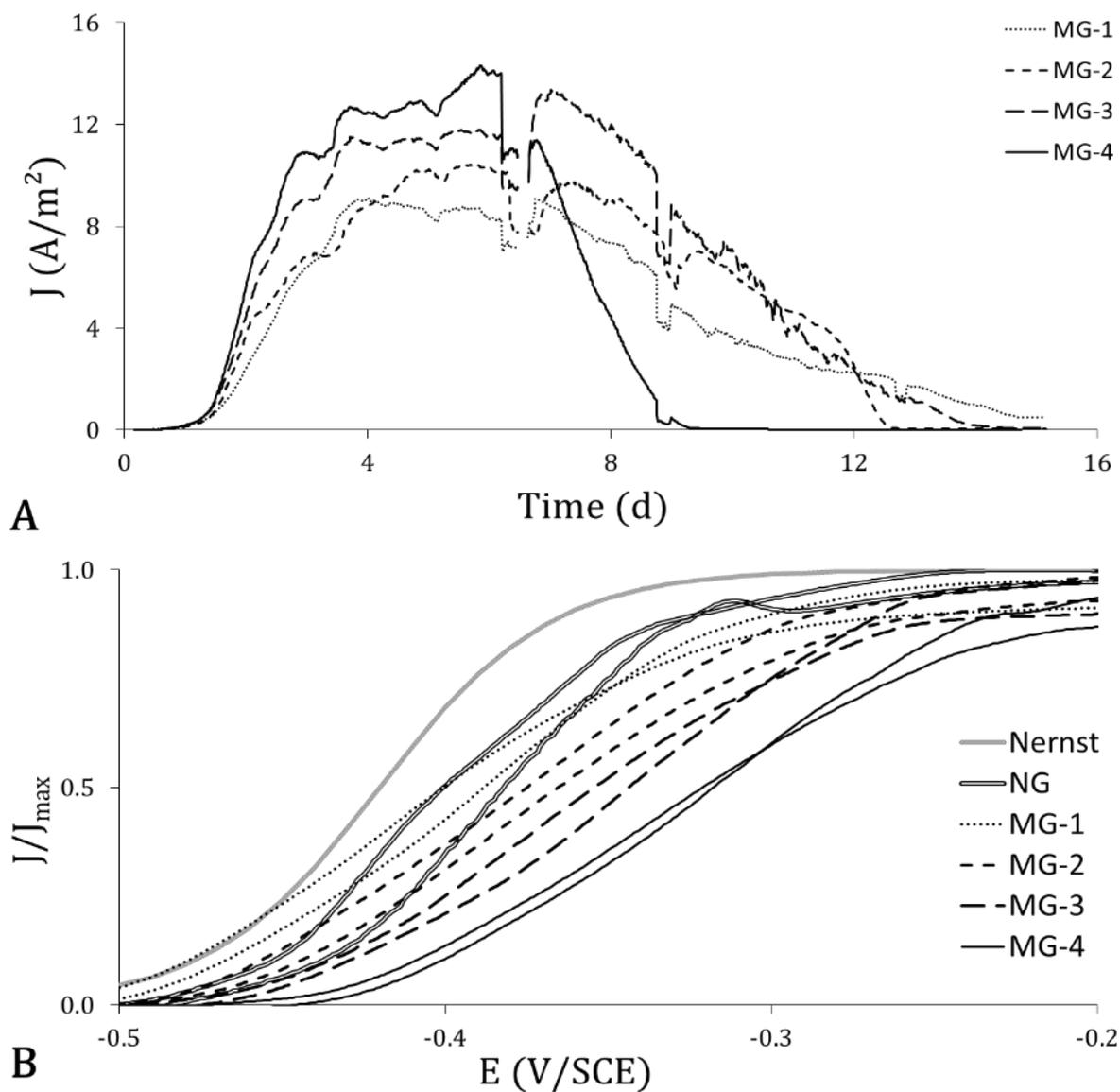


Figure 2: (A) Chronoamperograms of the micro-rough (MG) gold electrodes of Run #1 and (B) cyclic voltammograms recorded at day 6.5. The graph focused on the catalytic wave of the cyclic voltammograms. The theoretical Nernst curve has been added for comparison.

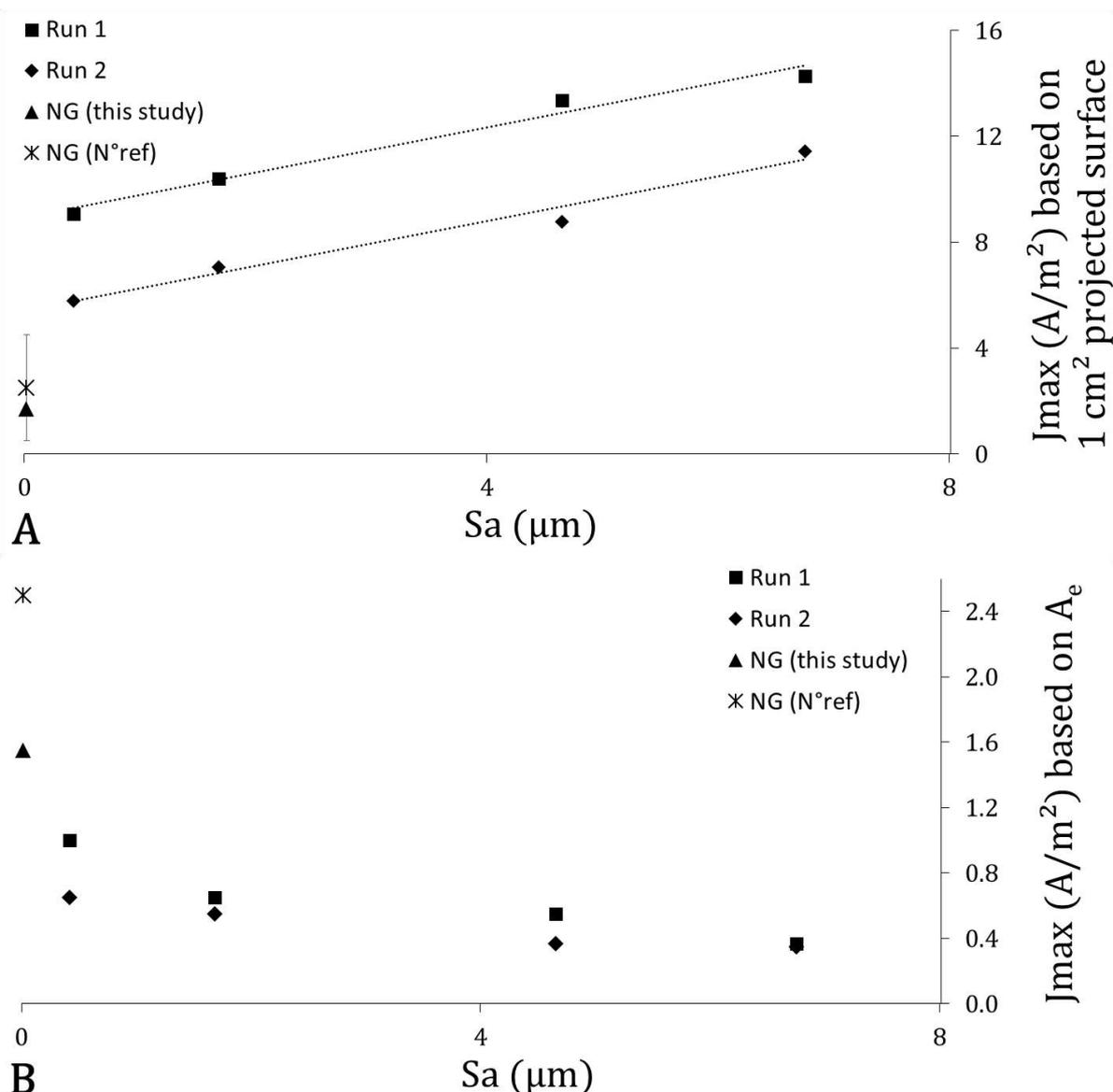


Figure 3: Current densities ( $J_{\text{max}}$ ) vs. the spatial arithmetic mean height ( $S_a$ ). Current densities indicated are based on (A) the projected surface area, (B) the measured electrochemically active surface area.

The NG electrodes showed starting times of 2.4 and 2.8 days (Table 2) and the maxima were reached at days 6 and 7.3, respectively. The starting times of the MG electrodes were particularly reproducible within each run, with  $1.53 \pm 0.02$  days for Run #1 and  $1.68 \pm 0.08$  days for Run #2, the difference between the two runs being only 3.5 hours. These starting times were around 1 day shorter than those recorded with the NG electrodes.

The starting time was not dependent on the micro-roughness size, since all MG electrodes had the same starting time around of 1.6 days. The slight delay observed on the electrodes from Run #2 may have been due to the presence of traces of oxygen at the beginning of the experiment as indicated by the analysis of the initial cyclic voltammograms. Imperfect preliminary deoxygenation for Run #2 can be explained by slightly slower  $\text{N}_2\text{CO}_2$  sparging. Apart from this technical problem, the starting phases of the MG were similar to and

significantly shorter (around 1 day) than that of the NG electrodes. As observed on the SEM images, increased surface roughness created asperities the size of *Geobacter* cells or larger, thus offering a larger contact area for bacteria to adhere. In contrast, the lack of anchoring points for bacteria on the nano-rough surface was probably detrimental to bacterial adhesion and thus delayed the current production.

*Table 2 : Electrochemical parameters extracted from the chronoamperometries performed on the gold electrodes. The starting time was calculated as the time necessary for the current to reach 10% of  $J_{max}$ . The Increase rate was determined as an average over 1 day around the maximum increase rate (inflection point).*

		$J_{max}$ (A/m <sup>2</sup> )	Starting Time (days)	$J_{max}$ recalculated (A/m <sup>2</sup> )	Increasing rate (A.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )
NG	Run 1	1.7	2.4	1.7	0.52
	Run 2	1.4	2.8	1.4	0.42
MG-1	Run 1	9.1	1.5	1	3.85
	Run 2	5.8	1.7	0.65	3.87
MG-2	Run 1	10.4	1.57	0.55	4.58
	Run 2	7.1	1.65	0.37	4.65
MG-3	Run 1	13.4	1.54	0.35	6.25
	Run 2	8.8	1.6	0.22	4.97
MG-4	Run 1	14.3	1.54	0.35	7.59
	Run 2	11.4	1.8	0.28	7.03

The two NG electrodes presented a low rate of current increase, of 0.52 and 0.42 A.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. The MG electrodes showed faster current increases, between days 1.5 and 3, with rates of 3.85 to 7.59 A.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. After day 3.5, the current continued to increase slowly in Run #1, while it tended to stabilize in Run #2. The MG electrodes showed current increase rates between 8 and 12 times higher than the NG electrodes. Moreover, the current increase rates increased with the micro-roughness. This tends to demonstrate that the roughness and, probably, the presence of cavities tens of microns wide accelerated the biofilm formation. As the surface becomes rougher ( $S_a$  increase), with increased areas of low shear force ( $S_{sk}$  negative) and rounded edges ( $S_{ku}$  less than 3), the adhesion forces necessary for the bacteria to remain attached to the surface become lower. Moreover, bacteria are in contact with uneven areas of

the surface but these are not sharp edged and thus do not hinder the extension of the biofilm, which quickly covers the asperities formed by electrodeposition.

Cyclic voltammograms were performed after the electrodes reached  $J_{max}$ , on days 6.5 and 5 for the MG electrodes of Run #1 and #2, respectively, and on days 6 and 7 for NG electrodes of Runs #1 and #2. (Figure 2.B). For comparison, a theoretical curve was added in Figure 2.B, which corresponded to the Nernst-Michaelis-Menten kinetics (Marcus et al., 2007; Rimboud et al., 2015):

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

where  $F$  is the Faraday constant (96485 C per mole  $e^-$ ),  $R$  is the gas constant (8.3145 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  is the temperature (30 °C, 303 K),  $E$  is the applied potential (V) and  $E_K$  is the value of the potential extracted from the experimental curves at which  $J = J_{max}/2$ .

Figure 2.B shows that all the electrodes were efficient at oxidizing acetate from low potentials, with kinetics not far from the Nernst kinetics, which means that the rate of electron transfer from the bacterial cell to the gold surface was not far below the rate necessary to ensure the Nernst equilibrium at the electrode surface. The normalized presentation of all the CV curves in the form of  $J/J_{max}$  used in Figure 2.B points out that the rougher electrodes tended to move the CV away from the theoretical Nernst curve. Increasing roughness thus led to slightly less efficient electron transfer kinetics.

Roughness consequently had a positive effect on the production of current, due to the increase of the electrochemically active surface area and the rate of biofilm formation, but it revealed a slightly detrimental effect on the electron transfer rates here. This may have been due to the presence of the fir-shaped deposits, which were very marked at the lowest roughnesses (see section 3.1) and tended to disappear with the densification of the deposit at higher roughness. This trend was quantified by the decrease of the kurtosis ( $S_{ku}$ ) from 4.4 to 1.8 (Table 1). It can be speculated that the nano-scale ramifications offered by nanodendritic electrochemical deposit may enhance the cell-electrode electron transfer. A similar phenomenon has already been reported with metallic nanowires, which improved extracellular electron transfer (Alatraktchi et al., 2012; Feng et al., 2016; Jia et al., 2016). It has been claimed that the metallic nanowires provided the cell with conductive structures similar to the conductive pili produced by some electroactive bacteria, *Geobacter sulfurreducens* for instance (Holmes et al., 2016; Reguera et al., 2005).

Figure 2.B also shows that the NG electrodes ensured efficient electron transfer rates, displaying CV curves very close to the theoretical Nernst kinetics. The NG electrodes offered a large, smooth surface area on which the cell could land completely, which probably promoted electron transfers. In addition to the large and full contact between electrode surface and cell surface, kurtosis equal to 3 may also be beneficial to electron transfers. The NG electrodes thus provided conditions tending to have opposite effects: on the one hand, their smoothness was detrimental to cell anchoring and biofilm formation but, on the other, the large contact surface they offered to the cells seemed to benefit the electron transfer rate. On smooth surfaces, cell adhesion is difficult and fragile but electron transfer is promoted.

### 3.3. Effect of micro-roughness on the formation of the electroactive biofilms

At the end of the experiments, once the current production had fallen to 0, the electrodes were stained with Syto 9 and imaged to determine the biofilm coverage ratio. The NG electrode surfaces were mainly covered by isolated cells and isolated micro-colonies of different sizes. The biofilms thus appeared at an early stage of formation, with micro-colonies, which started to form larger patches at a few places. The NG electrode consequently showed scattered values of biofilm coverage ratios ranging from 26 to 57%, with average values of  $45\pm 15\%$  and  $38\pm 11\%$  for the electrodes formed during Runs #1 and #2, respectively. These results confirm the direct link between the coverage ratio and the maximum current density that was described previously with the same nano-rough gold surface (Champigneux et al., 2018). The previous study showed that the maximum current densities were highly dependent on the percentage of surface colonized by the biofilm. Here, the same trend was observed.

The MG electrodes showed greater colonization, with biofilm coverage ratios between 80 and 100% on all electrodes. The average values were  $92\pm 7\%$ ,  $87\pm 4\%$ ,  $94\pm 3\%$  and  $91\pm 7\%$  on electrodes MG-1 to 4, respectively (Figure 4). Two different biofilm structures were observed. For the lowest roughness (MG-1 and MG-2) the biofilm coverage was uniform. The biofilm did not look dense or thick but presented a high coverage ratio and great uniformity.

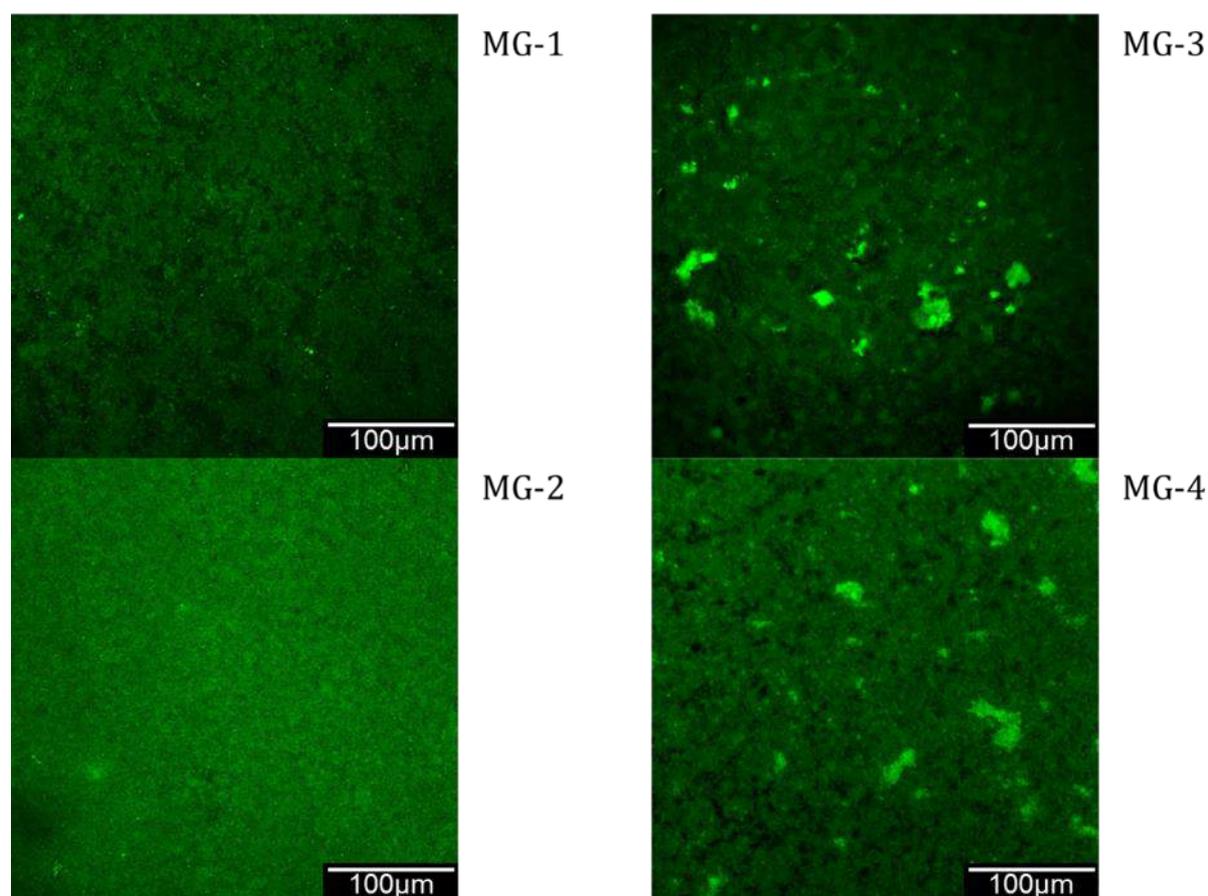


Figure 4 : Epifluorescent microscopic imaging of *Geobacter sulfurreducens* biofilms (Syto 9 staining)

In comparison, the biofilms on the MG-3 and MG-4 electrodes appeared denser and less uniform, showing a thickening in some areas and growing structures, up to about ten micrometres high, with some mushroom-like growths. On these electrodes, cavities of about 10  $\mu\text{m}$  were superimposed on the micrometre-sized roughness (see section 3.1). This larger scale pattern may have been responsible for the less uniform biofilm structure. It is known that bacterial communities communicate via quorum sensing systems to develop specific biofilm architectures. Biofilm shaping is thus a metabolic response that is triggered by the high concentration of signalling molecules. Here, the 10- $\mu\text{m}$ -sized cavities were privileged biofilm accumulation sites, favouring biofilm growth and maturation. The presence of mushroom structures may thus have been the result of the more rapid biofilm maturation encouraged by the surface cavities.

In conclusion, these microscopic observations confirmed that the nano-rough electrodes were not the most appropriate for biofilm formation. Difficult bacterial adhesion resulted in few areas initiating the biofilm formation and consequently in low biofilm coverage even after more than 12 days of polarization. Micro-roughening of the surface, from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$  here, favoured bacterial adhesion and led to full biofilm formation and higher current production. Superimposing a 10- $\mu\text{m}$ -sized pattern impacted the biofilm formation by accelerating its maturation in some spots but this did not result in higher current density.

## Conclusion

Current density was increased by a factor of more than 4 by surface micro-roughness. For  $S_a$  ranging from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$ , current density increased linearly with  $S_a$ . The roughness morphology also proved to play a role. Nano-sized, fir-shaped ramifications formed by the nanodendritic electrodeposition may enhance electron transfers. In contrast, 10- $\mu\text{m}$  micro-cavities accelerated biofilm growth locally but did not impact the current density in addition to the increase in  $S_a$ . It must be kept in mind that the conclusions drawn here concern the early formation of *Geobacter sulfurreducens* biofilms and that those for mature biofilms, for other strains, or for multispecies biofilms might be different. Unravelling the impact of the surface topography on the formation and performance of microbial anodes will be a long and complex task. Here, we hope to have provided the research community with a basic brick that will help to build up a sound foundation for future work.

## 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 Koropokkuru (ANR-14-CE05-0004).

The authors would like to acknowledge Luc Etcheverry, Frédéric Dacosta, Jean-Pierre Escafit and Vincent Loisel (Laboratoire de Génie Chimique) for their help in designing and setting up the reactors. Cécile Pouzet (Plateforme Imagerie-FR AIB) and Benjamin Erable (Laboratoire de Génie Chimique) are gratefully acknowledged for their implication in the fluorescence imaging acquisition, and Vincent Baylac (CIRIMAT- NNC OVM RTS) for his help in the topographical analysis.

## References

- Alatraktchi, F.A., Zhang, Y., Noori, J.S., Angelidaki, I., 2012. Surface area expansion of electrodes with grass-like nanostructures and gold nanoparticles to enhance electricity generation in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 123, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.048>
- Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B.E., Hamelin, A., Stoicoviciu, L., 1987. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au Part II. A chemical and structural basis of oxidation of the (111) plane. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 228, 429–453. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80122-5](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80122-5)
- Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B.E., Hamelin, A., Stoicoviciu, L., 1986. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au—I. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. *Electrochimica Acta* 31, 1051–1061. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(86\)80020-2](https://doi.org/10.1016/0013-4686(86)80020-2)
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D.P.B.T.B., Sarma, P.M., Pant, D., 2016. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renew. Energy, Special Issue: New Horizons in Biofuels Production and Technologies* 98, 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Bombelli, P., Zarrouati, M., Thorne, R.J., Schneider, K., Rowden, S.J.L., Ali, A., Yunus, K., Cameron, P.J., Fisher, A.C., Ian Wilson, D., Howe, C.J., McCormick, A.J., 2012. Surface morphology and surface energy of anode materials influence power outputs in a multi-channel mediatorless bio-photovoltaic (BPV) system. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* 14, 12221–12229. <https://doi.org/10.1039/c2cp42526b>
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- Brummer, S.B., Makrides, A.C., 1964. Surface Oxidation of Gold Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 111, 1122–1128. <https://doi.org/10.1149/1.2425933>
- Burke, L.D., Nugent, P.F., 1997. The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bull.* 30, 43–53. <https://doi.org/10.1007/BF03214756>
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2011. Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes. *Electrochem. Commun.* 13, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.02.015>
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., Bergel, A., 2018. Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.005>
- Characklis, W.G., Marshall, K.C., 1990. *Biofilms*. Wiley, New York.
- Chiao, M., Lam, K.B., Lin, L., 2006. Micromachined microbial and photosynthetic fuel cells. *J. Micromechanics Microengineering* 16, 2547. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/12/005>
- Díaz, C., Schilardi, P., De Mele, M.F.L., 2008. Influence of Surface Sub-micropattern on the Adhesion of Pioneer Bacteria on Metals. *Artif. Organs* 32, 292–298. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00545.x>

- Dominguez-Benetton, X., Varia, J.C., Pozo, G., Modin, O., Ter Heijne, A., Fransaer, J., Rabaey, K., 2018. Metal recovery by microbial electro-metallurgy. *Prog. Mater. Sci.* 94, 435–461. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.007>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008a. Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta* 53, 5235–5241. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.056>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008b. DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 53, 3200–3209. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.066>
- Edwards, K.J., Rutenberg, A.D., 2001. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chem. Geol., Experimental and Theoretical Geomicrobiology* 180, 19–32. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00303-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00303-5)
- Erbale, B., Duteanu, N., Kumar, S.M.S., Feng, Y., Ghangrekar, M.M., Scott, K., 2009. Nitric acid activation of graphite granules to increase the performance of the non-catalyzed oxygen reduction reaction (ORR) for MFC applications. *Electrochem. Commun.* 11, 1547–1549. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.057>
- Erbale, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Erbale, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Délia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., Bergel, A., 2010. Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry* 78, 51–56.
- Escapa, A., Mateos, R., Martínez, E.J., Blanes, J., 2016. Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55, 942–956. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.029>
- Fan, Y., Xu, S., Schaller, R., Jiao, J., Chaplen, F., Liu, H., 2011. Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1908–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.006>
- Feng, H., Liang, Y., Guo, K., Chen, W., Shen, D., Huang, L., Zhou, Y., Wang, M., Long, Y., 2016. TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays Modified Titanium: A Stable, Scalable, and Cost-Effective Bioanode for Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3, 420–424. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00410>
- Geppert, F., Liu, D., van Eerten-Jansen, M., Weidner, E., Buisman, C., ter Heijne, A., 2016. Bioelectrochemical Power-to-Gas: State of the Art and Future Perspectives. *Trends Biotechnol.* 34, 879–894. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.010>
- Guo, K., Donose, B.C., Soeriyadi, A.H., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Freguia, S., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2014. Flame Oxidation of Stainless Steel Felt Enhances Anodic Biofilm Formation and Current Output in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7151–7156. <https://doi.org/10.1021/es500720g>
- He, Y.-R., Xiao, X., Li, W.-W., Sheng, G.-P., Yan, F.-F., Yu, H.-Q., Yuan, H., Wu, L.-J., 2012. Enhanced electricity production from microbial fuel cells with plasma-modified carbon paper anode. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 14, 9966–9971. <https://doi.org/10.1039/c2cp40873b>
- Holmes, D.E., Dang, Y., Walker, D.J.F., Lovley, D.R., 2016. The electrically conductive pili of *Geobacter* species are a recently evolved feature for extracellular electron transfer. *Microb. Genomics* 2. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000072>

- In Ho, P., Gnaana Kumar, G., Kim, A.R., Kim, P., Suk Nahm, K., 2011. Microbial electricity generation of diversified carbonaceous electrodes under variable mediators. *Bioelectrochemistry* 80, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.06.007>
- Inoue, S., Parra, E.A., Higa, A., Jiang, Y., Wang, P., Buie, C.R., Coates, J.D., Lin, L., 2012. Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements. *Sens. Actuators Phys.*, 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 177, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.09.023>
- Jia, X., He, Z., Zhang, X., Tian, X., 2016. Carbon paper electrode modified with TiO<sub>2</sub> nanowires enhancement bioelectricity generation in microbial fuel cell. *Synth. Met.* 215, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.02.015>
- Kalathil, S., Pant, D., 2016. Nanotechnology to rescue bacterial bidirectional extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Rsc Adv.* 6, 30582–30597. <https://doi.org/10.1039/c6ra04734c>
- Kano, T., Suito, E., Hishida, K., Miki, N., 2012. Effect of Microscale Surface Geometry of Electrodes on Performance of Microbial Fuel Cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51, 06FK04. <https://doi.org/10.1143/JJAP.51.06FK04>
- Kargar, M., Wang, J., Nain, A.S., Behkam, B., 2012. Controlling bacterial adhesion to surfaces using topographical cues: a study of the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with nanofiber-textured surfaces. *Soft Matter* 8, 10254–10259. <https://doi.org/10.1039/C2SM26368H>
- Kim, J., Hwan Ko, J., Lee, J., Jun Kim, M., Byun, D., 2014. Power enhancement of a  $\mu$ l-scale microbial fuel cells by surface roughness. *Appl. Phys. Lett.* 104, 223702. <https://doi.org/10.1063/1.4880596>
- Kumar, G.G., Sarathi, V.G.S., Nahm, K.S., 2013. Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 43, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>
- Latimer, W.M., 1952. Oxidation Potentials. Second Edition. *Soil Sci.* 74, 333.
- Liu, Y., Kim, H., Franklin, R., R. Bond, D., 2010. Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 3, 1782–1788. <https://doi.org/10.1039/C0EE00242A>
- Maestro, B., Ortiz, J.M., Schrott, G., Busalmen, J.P., Climent, V., Feliu, J.M., 2014. Crystallographic orientation and electrode nature are key factors for electric current generation by *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry* 98, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.02.001>
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2011. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat. Nanotechnol.* 6, nnano.2011.119. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.119>
- Marcus, K.A., Torres César I., Rittmann Bruce E., 2007. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 1171–1182. <https://doi.org/10.1002/bit.21533>
- Oesch, U., Janata, J., 1983. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. *Electrochimica Acta* 28, 1237–1246. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(83\)85011-7](https://doi.org/10.1016/0013-4686(83)85011-7)

- Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2017. Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* 244, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.019>
- Peng, L., You, S.-J., Wang, J.-Y., 2010. Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.002>
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2012. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652. <https://doi.org/10.1039/C2EE22429A>
- Pons, L., Délia, M.-L., Bergel, A., 2011. Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresour. Technol.* 102, 2678–2683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.138>
- Rand, D.A.J., Woods, R., 1971. The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 31, 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(71\)80039-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(71)80039-6)
- 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, 1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R., 2008. Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. *Langmuir* 24, 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Rimboud, M., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bouchez, T., Bergel, A., 2015. Multi-system Nernst–Michaelis–Menten model applied to bioanodes formed from sewage sludge. *Bioresour. Technol., Microbial Fuel Cells* 195, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.069>
- Roubaud, E., Lacroix, R., Da Silva, S., Bergel, A., Basséguy, R., Erable, B., in press. Catalysis of the hydrogen evolution reaction by hydrogen carbonate to decrease the voltage of microbial electrolysis cell fed with domestic wastewater. *Electrochimica Acta*.
- Schröder, U., Harnisch, F., 2017. Life Electric—Nature as a Blueprint for the Development of Microbial Electrochemical Technologies. *Joule* 1, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2017.07.010>
- Siu, C.P.B., Chiao, M., 2008. A Microfabricated PDMS Microbial Fuel Cell. *J. Microelectromechanical Syst.* 17, 1329–1341. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2008.2006816>
- Sun, J.-J., Zhao, H.-Z., Yang, Q.-Z., Song, J., Xue, A., 2010. A novel layer-by-layer self-assembled carbon nanotube-based anode: Preparation, characterization, and application in microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 55, 3041–3047. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.103>
- Tao, Y., Liu, Q., Chen, J., Wang, B., Wang, Y., Liu, K., Li, M., Jiang, H., Lu, Z., Wang, D., 2016. Hierarchically Three-Dimensional Nanofiber Based Textile with High Conductivity and Biocompatibility As a Microbial Fuel Cell Anode. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7889–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00648>
- ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., Saakes, M., Buisman, C.J.N., 2008. Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 53, 5697–5703. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.032>
- Thung, W.-E., Ong, S.-A., Ho, L.-N., Wong, Y.-S., Ridwan, F., Oon, Y.-L., Oon, Y.-S., Lehl, H.K., 2016. Bioelectricity Generation in Batch-Fed Up-Flow Membrane-Less Microbial Fuel Cell: Effect of

- Surface Morphology of Carbon Materials as Aqueous Biocathodes. *Water. Air. Soil Pollut.* 227, 254. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2961-5>
- Vasudevan, R., Kennedy, A.J., Merritt, M., Crocker, F.H., Baney, R.H., 2014. Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.037>
- Wakkad, S.E.S.E., Din, A.M.S.E., 1954. The anodic oxidation of metals at very low current density. Part V. *Gold. J. Chem. Soc. Resumed* 0, 3098–3102. <https://doi.org/10.1039/JR9540003098>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 3418–3441. <https://doi.org/10.1039/C5EE01862E>
- Yang, M., Ding, Y., Ge, X., Leng, Y., 2015. Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.010>
- Ye, Z., Ellis, M.W., Nain, A.S., Behkam, B., 2017. Effect of electrode sub-micron surface feature size on current generation of *Shewanella oneidensis* in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 347, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.032>
- Ye, Z., Hou, J., Ellis, M.W., Behkam, B., 2012. Effect of Anode Surface Roughness on Power Generation in Microbial Fuel Cells 1409–1414. <https://doi.org/10.1115/IMECE2012-88643>
- You, J., Santoro, C., Greenman, J., Melhuish, C., Cristiani, P., Li, B., Ieropoulos, I., 2014. Micro-porous layer (MPL)-based anode for microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 21811–21818. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.136>

## 5. COMMENTAIRES SUR LA PUBLICATION « MICRO-RUGOSITE »

Les bioanodes ont révélé un comportement différent selon trois domaines de rugosité : à l'échelle de quelques nanomètres, entre une centaine de nanomètres et quelques micromètres et au-delà de la dizaine de micromètres. Cette diversité a permis d'enrichir la discussion en proposant différentes hypothèses sur l'impact de la topographie des électrodes sur les biofilms électroactifs mais cette diversité représente aussi un inconvénient en rendant plus difficile de tirer des conclusions simples et sûres.

Dans un premier temps, une différence notable a été soulignée entre la nano-rugosité et la micro-rugosité. La variation de rugosité à l'échelle nanométrique n'a qu'un impact limité sur l'établissement et l'efficacité d'un biofilm électroactif, alors qu'à l'échelle micrométrique les améliorations sont manifestes. C'est une conclusion importante, mais minimisée par le fait qu'elle soit tirée de comparaison entre seulement deux types d'électrodes avec des rugosités de 4,5 nm et 400 nm. Il aurait été souhaitable de pouvoir tester une rugosité intermédiaire, voire plusieurs, afin de mieux définir la transition entre ces deux domaines. Cela n'a pas été possible pour des raisons techniques et de délais mais devrait être envisagé si les études se poursuivent sur cette question. En effet, identifier le seuil à partir duquel la rugosité commence à impacter la formation et les performances d'un biofilm permettrait de lever certaines interrogations concernant l'action de la rugosité sur les bactéries électroactives.

D'un autre côté, comme il a été discuté, pour les électrodes MG-3 et MG-4 l'électrodéposition de l'or a créé des cavités certainement du fait de la formation de microbulles conjointement au dépôt d'or. D'un point de vue de l'efficacité en tant que bioanodes, ces surfaces avec des cavités ont produit les densités de courant les plus élevées. La présence de cavités ne peut donc pas être considérée comme défavorable. Nous avons émis l'hypothèse que ces cavités puissent modifier la structure du biofilm. Cela a mené à deux réflexions. D'une part, il a été souligné que la structure du biofilm semblait se différencier mais l'étude n'a été réalisée qu'à court terme. Il faudrait effectuer des expériences sur un temps plus long pour voir si le phénomène observé est une accélération de la structuration du biofilm du fait des cavités ou une modification de la structure par rapport aux surfaces plus planes. Le maintien dans le temps des bioanodes permettrait de dissocier l'impact de la rugosité sur l'initiation de la production de courant et sur les performances du biofilm. Ici les deux phénomènes ne peuvent être séparés.

D'autre part, la présence de cavités, c'est-à-dire d'une surface plus structurée que pour les électrodes MG-1 et MG-2, entraîne une augmentation de surface active plus faible que si les dépôts étaient totalement aléatoires. Il serait intéressant, si la technique le permet, de former des électrodes dans les mêmes conditions mais en évitant la formation de bulles. Il serait alors possible, en comparant avec les électrodes présentant des cavités, de dissocier l'impact des cavités de l'impact de la rugosité.

Cette étude apporte donc des enseignements importants sur l'impact de la micro-rugosité sur la formation des bioanodes et pose également quelques questions pour des études complémentaires. En effet, les conclusions sont directement applicables en vue d'une

optimisation des surfaces mais, en vue d'une compréhension poussée des interactions et des mécanismes fondamentaux, la poursuite des études est nécessaire.

## 6. CONCLUSION

La mise en oeuvre d'électrodes d'or présentant des rugosités micrométriques dans un réacteur électrochimique inoculé avec *Geobacter sulfurreducens* a facilité la formation de biofilms électroactifs sur de l'or par rapport aux surfaces nano-rugueuses testées initialement. Alors que le biofilm ne recouvrait que partiellement les électrodes et était faiblement adhérent sur l'or nano-rugueux, la micro-rugosité a permis une meilleure accroche du biofilm de *Geobacter sulfurreducens* ainsi qu'un recouvrement total des électrodes. En partie grâce à cette amélioration au niveau du biofilm, les bioanodes ont produit des densités de courant jusqu'à 14 A/m<sup>2</sup>, valeurs qui se rapprochent de la valeur maximale de 16 A/m<sup>2</sup> reportée dans la bibliographie sur de l'or (Liu et al., 2010). Au-delà de cette amélioration des performances et surtout de l'accroche du biofilm électroactif, ces expériences étaient aussi tournées vers une compréhension des interactions entre une surface rugueuse et un biofilm électroactif.

Les efforts effectués pour caractériser le plus précisément possible les surfaces d'électrodes ont conduit à la mise en place d'une technique précise et robuste de mesure des surfaces actives d'électrode en or. Le développement d'un jeu de paramètres complet a permis d'obtenir des informations chiffrées liées à la topographie de la surface et ainsi d'analyser plus facilement son impact sur l'établissement d'un biofilm électroactif. Ces descriptions quantitatives des surfaces ont amené des conclusions innovantes sur les liens entre la topographie des électrodes et la production de courant. La présence de motifs de cavités d'une dizaine de micromètres au sein de la rugosité des électrodes a entraîné une augmentation des performances plus importante que l'augmentation de surface active qu'elle a causée. Les mécanismes en jeu ici sont encore difficiles à définir mais les hypothèses penchent vers une organisation tridimensionnelle du biofilm différentes ou du moins plus rapide. Cela serait le fait de la concentration élevée en micro-organismes et en composés moléculaires au sein des cavités qui pourrait orienter la maturation du biofilm. Cette hypothèse mériterait d'être une ligne de recherche pour de futurs travaux.



*Chapitre 5 :*  
*Micro-structuration de*  
*surface pour l'amélioration*  
*des bioanodes*



Après l'étude, dans le chapitre 4, de surfaces dont la topographie a été modifiée aléatoirement, le chapitre 5 est consacré à la conception d'électrodes micro-structurées, toujours dans l'objectif d'optimiser leur fonctionnement en bioanode. La micro-structuration a pour objectif principal d'augmenter la surface des électrodes et donc la quantité de biofilm catalytique.

La discussion présentée dans la section 1 a conduit à définir une structuration sous forme de réseau de micro-piliers pour répondre au cahier des charges en restant en adéquation avec les possibilités techniques du LAAS. Les bioanodes formées à partir de ces électrodes ont mis en lumière certaines limitations, confirmées par la modélisation théorique sur la base d'un processus de diffusion-réaction. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication reportée dans la section 2 qui est discutée dans la section 3.

Les résultats obtenus avec la rugosité de surface exposés au chapitre 4, puis avec la structuration de surface décrits dans ce chapitre, nous ont incité à tenter de nouvelles procédures d'élaboration des électrodes, soit en poussant la technique de création de la rugosité pour former une couche poreuse, soit en combinant la micro-structuration avec la création de rugosité. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article et sont exposés dans la section 4.

Une série d'expériences visant à comprendre le comportement du biofilm d'un point de vue de sa conductivité a été menée en l'étudiant grâce à des ultramicroélectrodes. La section 5 présente les résultats obtenus avec ces bandes d'or de taille variable.

Au cours de l'ensemble de ces expériences, un phénomène anormal de croissance planctonique a été observé, réduisant grandement les rendements faradiques. Une étude des voies métaboliques a donc été tentée, comme rapportée dans la section 6, afin d'identifier les causes possibles de ces pertes de rendement faradique.

Les conclusions de l'ensemble des études réalisées avec *Geobacter sulfurreducens* sont consignées dans la section 7. Cette conclusion dépasse le cadre strict de ce chapitre, puisqu'elle reprend également des résultats présentés dans les chapitres 3 et 4. Toutefois, il a paru utile de faire un premier bilan sur l'ensemble des expérimentations conduites avec *Geobacter sulfurreducens* avant le passage à un inoculum complexe issu de sédiments marins.

## 1. CHOIX DU TYPE DE STRUCTURATION DE SURFACE

Le travail préparatoire présenté dans cette section a consisté à conjuguer les informations tirées de la bibliographie avec une réflexion menée avec le LAAS sur les objectifs de l'étude et les contraintes de fabrication et de mise en œuvre des électrodes structurées. Le premier écueil à éviter était de ne pas orienter la conception des électrodes vers une augmentation maximale des performances de la bioanode mais de se focaliser sur la compréhension fondamentale des phénomènes. L'optimisation des performances fera partie d'une deuxième phase de développement. Il a donc été décidé de choisir des structurations de surface basiques afin de ne pas provoquer le couplage de différents effets qui ne permettrait pas de tirer des conclusions claires. En effet, dans la plupart des travaux menés jusqu'alors avec des anodes micro-structurées, la complexité des modifications de surface ne permet pas de tirer des enseignements précis sur leur impact. Par exemple, une étude discute les performances d'une anode de carbone

dopée avec des nanoparticules de nickel dont la surface a été structurée par un réseau de pilier puis dotée d'un revêtement de nanotubes de carbone (Khare et al, 2016). Cette électrode multiplie par 10 la densité de courant produite mais l'effet des différentes modifications ne peut être distingué. L'étude est clairement orientée vers une optimisation des performances et non une compréhension des mécanismes, ce qui ne doit pas être le cas pour la démarche préconisée dans le cadre du projet Koropokkuru.

Deux types de structurations ont alors été proposés par le LAAS au vu de leur capacité de réalisation: un réseau de piliers ou un réseau de trous. Plusieurs études rapportent que les structures sortantes telles que les piliers sont à privilégier par rapport aux trous (Vasudevan et al., 2014; Yang et al., 2015). En effet, la présence de trous peut gêner la formation d'un biofilm continu ou entraîner des gradients chimiques importants par l'appauvrissement en substrat ou la concentration en toxines. Le choix s'est donc porté sur la structuration des électrodes par un réseau de piliers, dont il restait à définir les dimensions.

Au-delà des considérations biologiques, le choix des piliers a aussi été motivé par les problématiques de métallisation de la surface. La couche d'or est électrodéposée sur des couches de cuivre et de chrome qui sont auparavant pulvérisées sur les structurations. Lors de la pulvérisation, la pénétration du cuivre et du chrome est moins importante dans des structures en creux que sur des piliers, ce qui entraîne une diminution de la surface active des électrodes. Afin de s'assurer que l'ensemble de la surface structurée est conductrice, le réseau de pilier est donc également préférable au réseau de puits.

Les études consacrées à l'adhésion bactérienne montrent que les structurations à l'échelle nanométrique ne présentent pas d'effet stable sur le processus de formation de biofilm. La présence d'aspérités de plus petite taille que la cellule a rarement montré un effet positif sur l'adhésion et la formation d'un biofilm et, le plus souvent, se montre même défavorable (publication 1, Chapitre 1, section 7). A l'inverse, des topographies de surface de l'ordre du micromètre améliorent l'adhésion.

Il ne faut cependant garder en mémoire que l'objectif principal de la structuration de la surface est l'augmentation de la surface active des électrodes, or la structuration à l'échelle du micromètre ne permet pas d'augmenter la surface de façon importante. Par exemple, des électrodes présentant des micro-canaux de 3,6  $\mu\text{m}$  de hauteur permettent de multiplier la surface par 1,54 seulement et les densités de courant par 1,38 (Inoue et al., 2012). Des structurations de dimension supérieure au micromètre sont donc à envisager. Peu de travaux ont été menés sur le sujet. Deux études ont décrit des structurations de surfaces qui permettent une augmentation de surface. La première utilise des piliers en forme de croix de 8  $\mu\text{m}$  de hauteur et 40  $\mu\text{m}$  de côté (Siu et al, 2008) ; la seconde des piliers cylindrique de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et 20  $\mu\text{m}$  de hauteur (Kim et al, 2014). Afin de maximiser l'augmentation de la surface, et dans la mesure où le LAAS maîtrise une technologie pour la formation de structures de 500  $\mu\text{m}$  de hauteur, c'est cette hauteur de piliers qui a été choisie.

La dernière étape porte sur la forme et la dimension des piliers. Le choix s'est porté sur des piliers carrés car ils entraînent une augmentation de surface plus importante que des piliers cylindriques. Le LAAS a ensuite élaboré des piliers de 50, 75 et 100  $\mu\text{m}$  de côté. Plus la largeur des piliers est petite, plus la quantité de piliers par unité de surface projetée est grande et donc

plus l'augmentation de surface est importante. Toutefois, comme il peut être observé sur la Figure 1, les piliers de 50  $\mu\text{m}$  de côté cassent facilement. De plus, les dimensions des piliers sont assez variables par rapport à la valeur théorique. En revanche, le nombre de cassures diminue lorsque la taille des piliers augmente de 75 et 100  $\mu\text{m}$  de côté, et les dimensions sont moins dispersées. On choisit donc de travailler avec les piliers les plus stables de 100  $\mu\text{m}$  de côtés.

La métallisation des piliers a été testée sur des réseaux de piliers de 75 et 100  $\mu\text{m}$  de côté avec des espacements inter-piliers variables. En dessous de 100  $\mu\text{m}$  d'espacement entre les piliers, la métallisation n'est pas complète. Il a donc été choisi de tester trois espacements de piliers de 100  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$ . Ces électrodes sont nommées  $\mu\text{P100NG}$ ,  $\mu\text{P125NG}$  et  $\mu\text{P200NG}$ , leurs caractéristiques géométriques sont résumées sur la Figure 2.

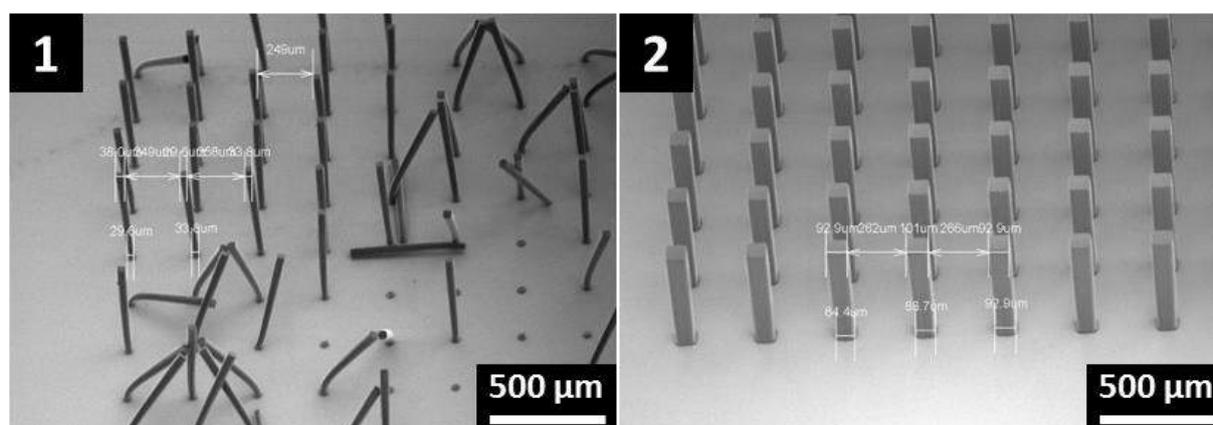


Figure 1 : Images MEB réalisées par Cyril Renault-Sentenac (LAAS) présentant des réseaux de piliers de 50  $\mu\text{m}$  (1) et 100  $\mu\text{m}$  (2) de côtés.

Les piliers sont recouverts d'une couche d'or par électrodéposition et la rugosité de cette surface d'or est de 4,5 nm. Des électrodes planes présentant des rugosités de 0,8 et 4,5 nm sont aussi testées en parallèle afin d'offrir une comparaison.

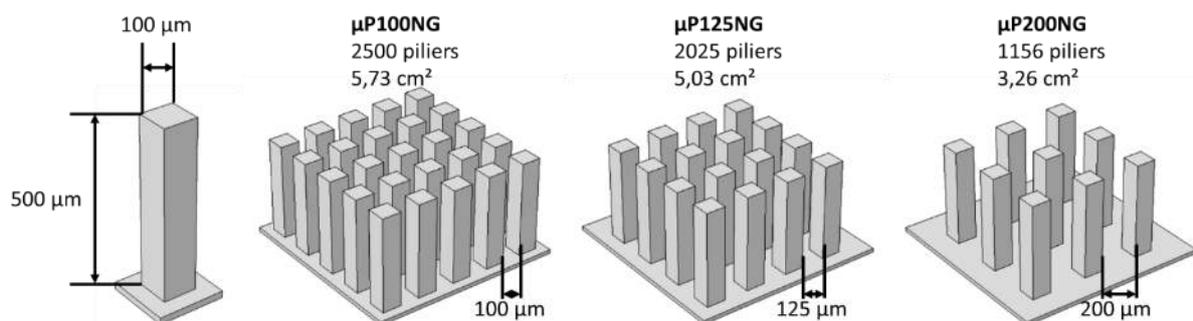


Figure 2 : Représentation et dimensions des réseaux de piliers avec des espacements variables. Le nombre de piliers de chaque réseau ainsi que la surface géométrique résultant du réseau de piliers sont indiqués en dessous du nom utilisé pour désigner ces différentes électrodes.

## 2. PERFORMANCE ANODIQUE EN PRESENCE DE STRUCTURATION

De la même manière que précédemment (Chapitre 4), les électrodes d'or micro-structurées sont inoculées avec *Geobacter sulfurreducens*. Les bioanodes ainsi formées ont produit des densités de courant allant jusqu'à 8,5 A/m<sup>2</sup>. Les performances des différentes structurations sont décrites et analysées dans l'article « Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: experimental and theoretical approaches » publié dans le journal *Bioelectrochemistry*. La deuxième partie de la publication apporte un éclairage sur les limitations dû aux transferts de matière grâce à la modélisation numérique d'une équation de diffusion-réaction simplifiée.



## Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches



Pierre Champigneux <sup>a,\*</sup>, Cyril Renault-Sentenac <sup>b</sup>, David Bourrier <sup>b</sup>, Carole Rossi <sup>b</sup>, Marie-Line Delia <sup>a</sup>, Alain Bergel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie Chimique CNRS - Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes CNRS - Université de Toulouse, 7 avenue du colonel Roche, 31031 Toulouse, France

### Abstract

Smooth and nano-rough flat gold electrodes were manufactured with controlled Ra of 0.8 and 4.5 nm, respectively. Further nano-rough surfaces (Ra 4.5 nm) were patterned with arrays of micro-pillars 500 μm high. All these electrodes were implemented in pure cultures of *Geobacter sulfurreducens*, under a constant potential of 0.1 V/SCE and with a single addition of acetate 10 mM to check the early formation of microbial anodes. The flat smooth electrodes produced an average current density of 0.9 A.m<sup>-2</sup>. The flat nano-rough electrodes reached 2.5 A.m<sup>-2</sup> on average, but with a large experimental deviation of ±2.0 A.m<sup>-2</sup>. This large deviation was due to the erratic colonization of the surface but, when settled on the surface, the cells displayed current density that was directly correlated to the biofilm coverage ratio.

The micro-pillars considerably improved the experimental reproducibility by offering the cells a quieter environment, facilitating biofilm development. Current densities of up to 8.5 A.m<sup>-2</sup> (per projected surface area) were thus reached, in spite of rate limitation due to the mass transport of the buffering species, as demonstrated by numerical modelling. Nano-roughness combined with micro-structuring increased current density by a factor close to 10 with respect to the smooth flat surface.

**Keywords :** Bioanode; surface roughness; microbial adhesion; microbial fuel cell; modelling.

## 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 [4,5] and they have since been the source of numerous innovative technological concepts, such as microbial electrolysis cells for hydrogen production [6,7] metal recovery [8,9], microbial autonomous biosensors [10,11] and a microbial snorkel for environmental bioremediation [12,13].

Biofilm development on an electrode surface can be described in three steps: initial reversible contact between cells and the surface, followed by irreversible cell attachment and, finally, biofilm growth due to bacterial division and extracellular matrix production [14,15]. In each of these phases, biofilm formation is strongly dependent on the surface/bacteria interaction.

Many studies have pointed out the electrode surface topography as a key parameter of the efficiency of microbial electrodes [16–20]. Roughness has often been used to investigate the effects of surface topography but it remains difficult to extract clear trends, most likely because of the different techniques that have been used to roughen the electrode surfaces, which did not allow direct comparison among the studies [21–23].

Some research teams have structured surfaces by using the accurate tools provided by nano- and micro-technologies in order to control the surface topography perfectly. Amazing advances have been made in this way. Titanium nanowires and nanotubes have been shown to improve the performance of electroactive biofilms by acting as substitutes for bacterial pili [24–26]. Recessed micro-structures, such as holes, revealed a positive effect due to the increased contact area between the cell and the electrode surface, when they were the same size as the cell. Nevertheless, as a side-effect, holes that are too deep can induce detrimental segmentation of the biofilm [27–29]. Protuberant micro-structures, such as pillars, do not present this drawback. Gold cross-shaped micro-pillars 40  $\mu\text{m}$  wide and 8  $\mu\text{m}$  high inoculated with *S. cerevisiae* have shown a 4.9 fold increase in current density, mainly explained by an increase of the electrode surface area to volume ratio by a factor of 4.5 [30]. Microbial anodes manufactured with 20  $\mu\text{m}$  high and 20  $\mu\text{m}$  diameter cylindrical micro-pillars and inoculated with *S. marcescens* have displayed a 1.5 fold increase of the current density [31].

Most of these studies have delivered worthwhile conclusions on mature biofilms. In contrast, almost nothing is known about the mechanism of the early phases of the formation of electroactive biofilms, in which the surface topography should have a crucial impact on the initial steps of biofilm formation. Moreover, it can also be presumed that the final electrocatalytic properties of a biofilm depend strongly on its early formation phases, which establish the interfacial layer between the electrode surface and the biofilm [32].

The purpose of the present study was to gain insight into the impact of surface topography on the early phases of electroactive biofilm formation. Micro-technology techniques were implemented to control the surface roughness of gold electrodes perfectly at the nanometre level and then to pattern the surface with arrays of micro-pillars. Gold was chosen as the electrode material because of its suitability for implementing micro-technology techniques and because it has been demonstrated to be fully able to support the formation of efficient microbial anodes [16,30,33–36]. Micro-structuring of the surfaces was performed with micro-pillars having a square cross section. Their height of 500  $\mu\text{m}$  was significantly greater than those

generally reported in the literature so far, in order to maximise the chances of detecting their impact.

Many bacteria have been found to possess electrocatalytic properties [37]. Among the models of electroactive bacteria, *Geobacter sulfurreducens* [38] has been widely used and has shown one of the highest levels of performance in terms of current production in pure culture [39,40]. For this reason, this species was chosen for the present study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Electrode manufacturing

Smooth gold (SG) and Nano-rough gold (NG) electrodes were formed on Si (100), P-type silica wafers. The SG surfaces were deposited by evaporation of a 250 nm thick gold layer. The NG electrodes were produced by roughening the surface of SG electrodes by electrolytic deposition of gold to achieve a gold layer 1.75  $\mu\text{m}$  thick. The average roughness, measured by AFM was 0.8 nm for the SG surfaces and 4.5 nm for the NG.

Surface micro-structuring consisted of arrays of square micro-pillars 100  $\mu\text{m}$  wide and 500  $\mu\text{m}$  high. They were created on the same Si (100), P-type silica wafers with an epoxy resin (SU-8 3050, MicroChem Corp) patterned by photolithography to form the pillar array. Electrode metallization was performed by electrolytic deposition of gold as for the NG electrodes. A 1  $\mu\text{m}$  thick gold layer was thus created, with a roughness of 4.5 nm identical to that of the NG electrodes. The different pillar arrays were obtained with spacings of 100  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P}100\text{NG}$ ), 125  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P}125\text{NG}$ ) and 200  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P}200\text{NG}$ ). The three micro-structured electrodes had 2500, 2025 and 1156 pillars and an overall geometric surface area of 5.73, 5.03 and 3.26  $\text{cm}^2$ , respectively. Each pillar array was tested in duplicate.

### 2.2. Inocula and media

*Geobacter sulfurreducens* (ATCC 51573) was purchased from DSMZ. The specific growth medium contained, per litre: 0.1 g KCl, 1.5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.5 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0.6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , and 0.82 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . This medium was sterilized by autoclaving in bottles at 121°C for 20 minutes. After sterilization, the medium was completed with 8 g/L sodium fumarate filtered at 0.22  $\mu\text{m}$ , 10 mL/L Wolfe's vitamin solution (ATCC MD-VS) and 10 mL/L modified Wolfe's minerals (ATCC MD-TMS). A pre-culture of *G. sulfurreducens* was prepared in a fresh deoxygenated culture medium (2% v/v, 30 °C) for 3 days to reach a final absorbance of around 0.4 at 620 nm. Reactors were then inoculated with this pre-culture. The inoculation volume was adjusted to obtain the cell density in each reactor that corresponded to an inoculation ratio of 10% v/v with an inoculum at 0.4 absorbance. Inoculation was performed after 20 minutes of deoxygenation by bubbling  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (80:20) through the reactors filled with the specific growth medium, vitamin solution and modified Wolfe's minerals. In the reactor medium, acetate 10 mM was the sole electron donor and no fumarate was present.

### 2.3. Experimental set-up and electrochemical characterization

All experiments were performed with 3-electrode set-ups in single compartment cells. The reactors, each of 500 mL total volume, contained 300 mL solution and were tightly sealed to

ensure anaerobic conditions. A gaseous mix of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (80:20) was continuously and gently sparged into each reactor. The gas sparger was located behind the auxiliary electrode and directed towards the reactor wall to avoid disturbance of the working electrode by gas bubbling. The temperature was kept at 30 °C with a water-bath.

The gold electrodes, used as working electrodes, were enclosed in a Teflon-based support that exposed a 1 cm<sup>2</sup> surface area to the medium. A platinum grid (Heraeus SAS, Germany) was used as the auxiliary electrode and a saturated calomel reference electrode as the reference (SCE, potential +0.24 V/SHE). Bioanodes were formed under constant polarization at 0.1 V/SCE (VSP potentiostat, Bio-Logic SA, France). Current densities were determined based on the projected surface area of the anode, which was always 1 cm<sup>2</sup>. The chronoamperograms were analysed by determining the maximum current density that was reached ( $J_{max}$ ) and the time required for the electrodes to start to produce current. This starting time was defined as the time at which current density reached 0.1 A.m<sup>-2</sup>.

## 2.4. Microscopy imaging

At the end of the experiments, the bioanodes were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 min, then carefully washed with medium and dried at ambient temperature. The flat smooth (SG) and nano-rough (NG) electrodes were imaged with a Carl Zeiss Axioimager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (Evolution VF). Many different spots were imaged in order to see the general pattern of the colonization.

The micro-structured electrodes ( $\mu$ PNG) were imaged with a LEICA TCS SP8 confocal microscope equipped with a 20 W Argon laser and a CS2 UV Optics 1 filter. The active detector was a PMT (500 nm – 600 nm). Images were acquired every 2.4  $\mu$ m along the pillars and the 3D reconstruction was performed using LAS X software.

Epifluorescence images were analysed by greyscale interpretation to calculate the proportion of the electrode surface covered by the bacteria. The grey intensity threshold between the areas covered by the bacteria and the non-covered areas was set manually. Grey levels greater than the threshold value were considered to correspond to colonized areas, while grey levels lower than the threshold were considered to show clean areas. Six images, of dimensions 866 by 645  $\mu$ m, were treated for each electrode to determine the average covering ratio, the edges of the electrodes being excluded to avoid the impact of side effects.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Nano-structuring

Two smooth (SG) and seven nano-rough (NG) gold electrodes were implemented separately in pure cultures of *Geobacter sulfurreducens* under applied potential of 0.1 V/SCE. The medium was fed initially with acetate at 10 mM and sparged continuously with N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20). The smooth electrodes started to produce current at days 3.2 and 5.5 and reached only modest maximum current densities ( $J_{max}$ ) of 1.1 and 0.75 A/m<sup>2</sup> (Figure 1.A). The nano-rough electrodes displayed high variability. Two NG electrodes showed performance close to the SG electrodes: long starting time of 4.2 and 5.1 days, slow current evolution, which led to low  $J_{max}$  of 0.12 and

0.86 A/m<sup>2</sup> (Figure 1.B). The other five NG electrodes showed very similar, short starting times between 1 and 1.3 days and reached high  $J_{\max}$  values, but with great variability, in a range of 1.6 to 6.4 A/m<sup>2</sup>.

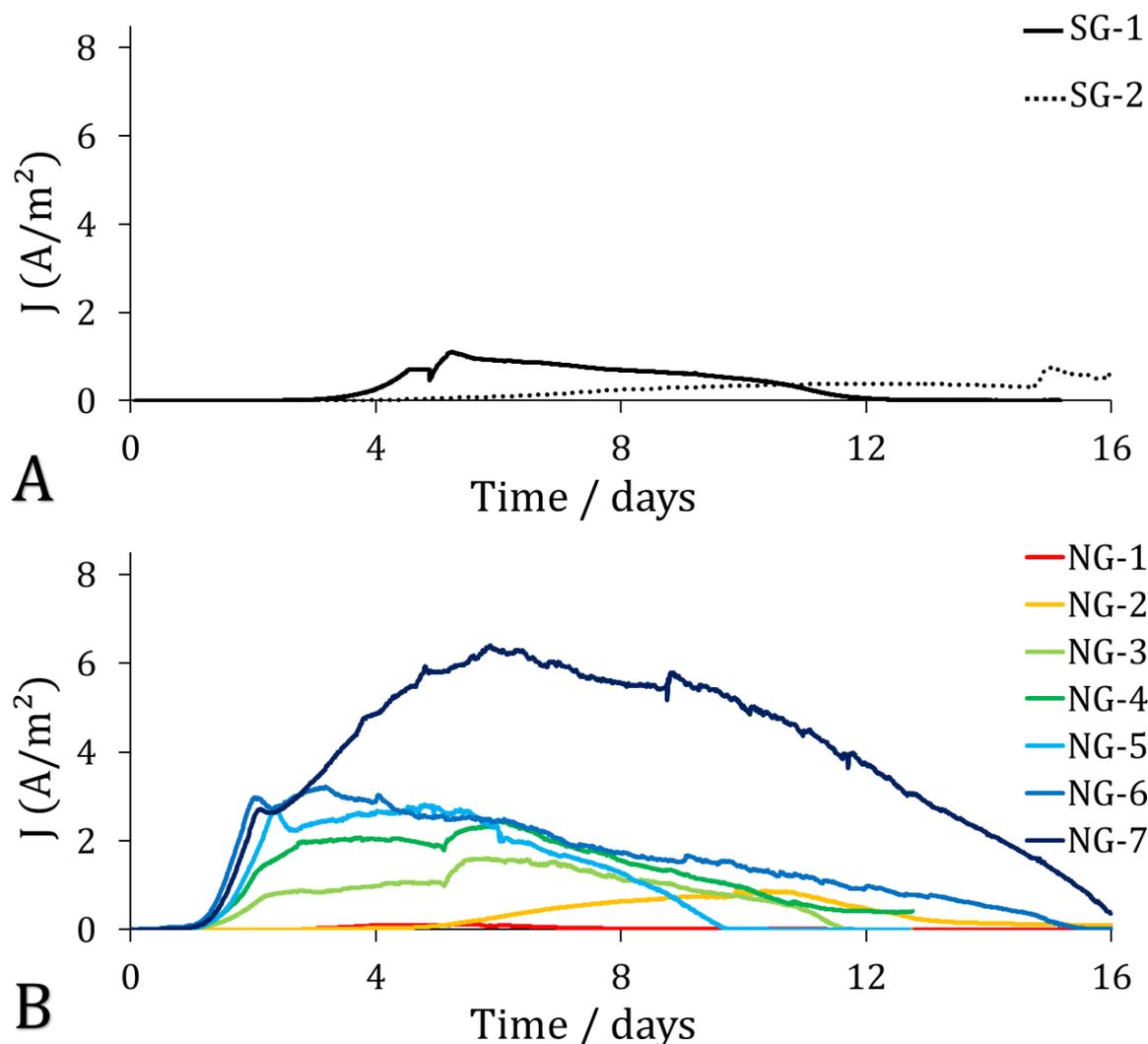


Figure 1: Chronoamperograms recorded with (A) smooth (SG,  $R_a = 0.8$  nm) and (B) nano-rough (NG,  $R_a = 4.5$  nm) gold electrodes under polarization at 0.1 V/SCE with *G. sulfurreducens* and a single batch of acetate 10 mM.

These results reveal a significant variability, particularly relating to  $J_{\max}$ , although the initial surfaces and experimental conditions were strictly identical. Nevertheless, they show that the nano-roughness of 4.5 nm favoured the electroactive biofilm formation and performance, leading to average  $J_{\max}$  of  $2.5 \pm 2.0$  A/m<sup>2</sup>, in comparison to smooth surface ( $R_a = 0.8$  nm), which produced average  $J_{\max}$  of  $0.92 \pm 0.25$  A/m<sup>2</sup>.

Once the current had fallen to zero, the electrode colonization was observed by epifluorescence microscopy. Coverage ratios are reported in Table 1. On the two SG electrodes, biofilm clusters had formed and covered  $65.8 \pm 9.6$  and  $58.7 \pm 8.7$  % of the

electrode surface as illustrated in Figure 2.8. Although the global microbial coverage was significant, the biofilm structures were isolated from one another and no large biofilm patches could be observed. On the NG electrodes, as noted for the current production, a wide range of bacterial colonization patterns was observed (Figures 2.1 to 2.7). For the two electrodes producing the lowest currents, NG-1 and NG-2, the observation highlighted the presence of microbial colonies and isolated cells on the surface but no significant biofilm patches were observed (Figures 2.1 and 2.2). This resulted in coverage ratios of  $18.2 \pm 5.2$  % and  $34.2 \pm 10.8$ %. On the NG-3, NG-4 and NG-5 electrodes, producing 1.6, 2.4 and 2.8 A/m<sup>2</sup>  $J_{\max}$ , the coverage ratios rose to respectively  $59.6 \pm 8.4$ ,  $77.2 \pm 8.7$ , and  $82.0 \pm 7.0$  % and biofilm structures were present (Figures 2.3 to 2.5). The biofilm did not cover the whole surface continuously but was segmented into patches. On the two highest producing electrodes, NG-6 and NG-7, with  $J_{\max}$  of 3.2 and 6 A/m<sup>2</sup>, biofilm covered the whole electrode surface almost uniformly and coverage ratios were  $95.2 \pm 3.4$  and  $97.1 \pm 3.9$ % (Figures 2.6 and 2.7). The biofilm observed on the highest producing electrode was thicker and its thickness was uniform, showing a higher maturation of the biofilm structures.

It may be suspected that bacteria that came in contact with the smooth surface ( $R_a = 0.8$  nm) had great difficulty in linking with it. On such a smooth surface, during the first phase of adhesion, cells were probably entrained away from the surface before achieving an irreversible attachment and starting to create an extracellular matrix. Actually, the shift of the cells from the planktonic to the biofilm (sessile) phenotype is triggered by quorum sensing exchanges [41]. In the case of a smooth surface, the shift to the biofilm phenotype was probably delayed by the slowness of the primary colonization. Smooth surfaces may consequently increase the time needed for an electroactive biofilm to develop. As it was difficult for the cells to adhere to the smooth gold surface, early biofilm development may have mainly taken place by the addition of cells to the few existing micro-colonies rather than to the clean surface. In addition, the absence of asperities can also reduce biofilm swarming [42,43]. In consequence, SG electrodes showed isolated biofilm clusters and their shape showed no significant swarming pattern. The smooth surface was a hindrance to biofilm formation during the expansion and connection phase.

In contrast, on the nano-rough electrodes, e.g. NG-3 electrode (Figure 2.3), many small bacterial colonies could be seen, which were all interconnected, thus initiating the formation of good biofilm coverage. The bacterial colonization varied significantly on the different NG surfaces but a clear correlation could be established between the coverage ratio and the maximum current density (Figure 2). The only electrode that did not show such correlation was the one presenting a mature, uniform biofilm (NG-7). In such cases, the coverage ratio, close to 100%, is no longer the relevant parameter and the biofilm volume should be considered [44]. This relation showed that, in the early stage of electroactive biofilm formation, *G. sulfurreducens* cells were equally efficient for current production whatever their colonization pattern. Small or dense microbial colonies, biofilm patches or uniform biofilm demonstrated the same correlation between coverage ratio and current density produced.

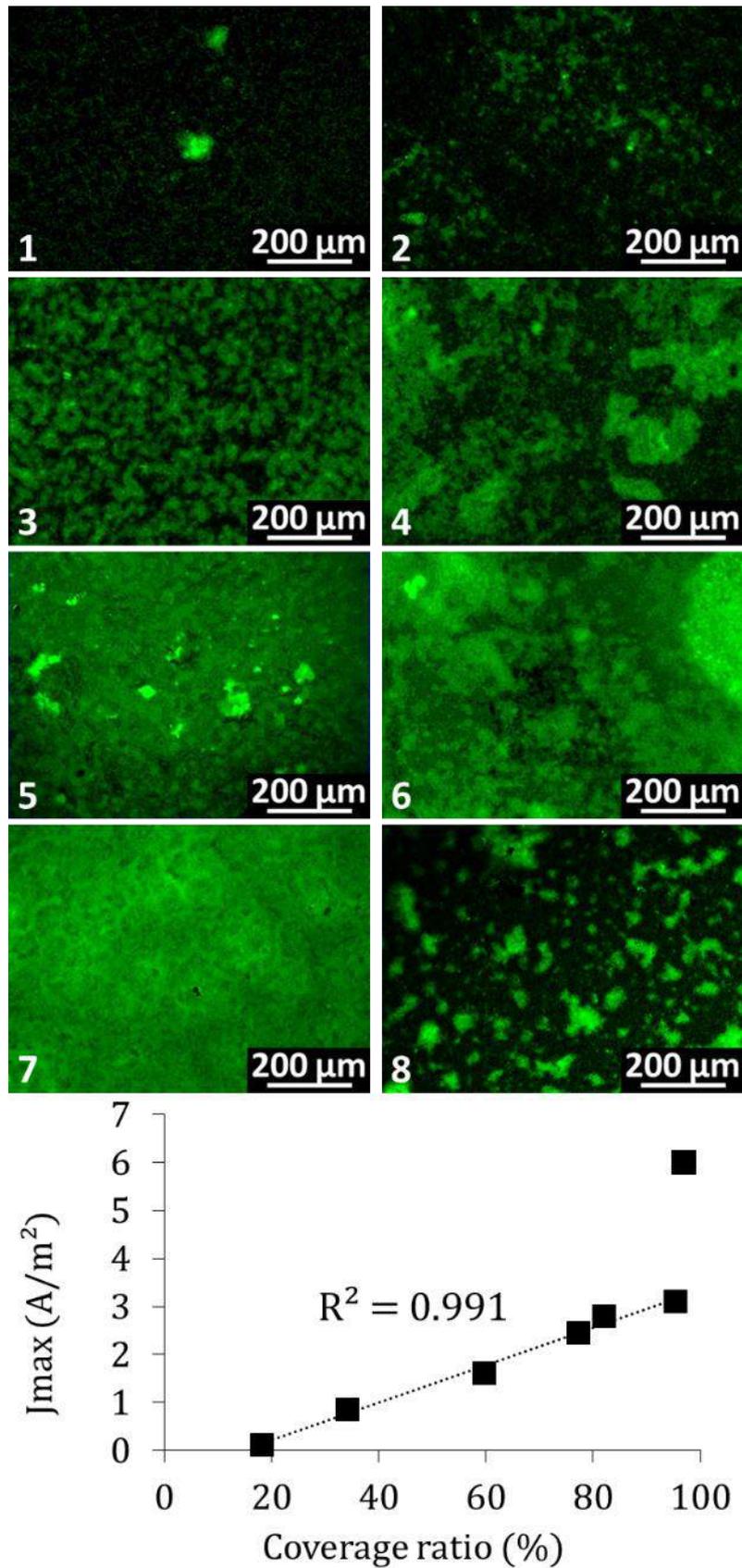


Figure 2: Correlation between the maximum current density ( $J_{max}$ ) obtained with the NG electrodes and their coverage ratio determined by epifluorescence imaging. The epifluorescence pictures presented on the top part are representative of the biofilm coverage observed on (1) NG-1, (2) NG-2, (3) NG-3, (4) NG-4, (5) NG-5, (6) NG-6 and (7) NG-7. The eighth picture (8) is for the smooth gold electrode SG-1.

It should be noted that a different type of behaviour has been reported with *G. sulfurreducens* cells colonizing stainless steel cathodes. Increasing the average roughness, Ra, from 2 to 4  $\mu\text{m}$  increased current density but, in this case, isolated cells and small colonies were observed to provide higher current density than dense colonies [19]. However, these observations were made in very different conditions from those of the present study: the electrode was operated as a cathode and the electrode material was different. For instance, the semi-conductive properties of stainless steel may have impacted the electroactive behaviour of the cells [45]. Moreover, the roughness range was not at the same level: these previous studies dealt with micrometre-scale roughness, i.e. roughness that was of similar magnitude to the cell size, while the results presented in this section addressed nanometre roughness. Such different behaviours observed with the same microbial species exposed to different experimental conditions point out the difficulty of extracting universal rules about the early stage formation of electroactive biofilms.

*Table 1: Electrode surface characteristics (Roughness and Surface Area), electrochemical performance and coverage ratios. Maximum current density was calculated with respect to the projected surface area ( $1\text{ cm}^2$  for all electrodes) and to the geometric area reported in the third column. Starting time was the time needed to reach  $0.1\text{ A/m}^2$ .*

Electrode Surface	Roughness Ra (nm)	Geometric area ( $\text{cm}^2$ )	$J_{\text{max}}$ ( $\text{A/m}^2$ ) projected area	$J_{\text{max}}$ ( $\text{A/m}^2$ ) geometric area	Starting time (days)	Coverage ratio (%)
Smooth	0.8	1	1.1	1.1	3.2	$65.8 \pm 9.8$
			0.75	0.75	5.5	$58.7 \pm 8.6$
Nano-rough	4.5	1	6.4	6.4	1.1	$97.1 \pm 3.9$
			3.2	3.2	1	$95.2 \pm 3.4$
			2.8	2.8	1.2	$82.0 \pm 7.0$
			2.4	2.4	1.1	$77.2 \pm 8.7$
			1.6	1.6	1.3	$59.6 \pm 8.4$
			0.86	0.86	5.1	$34.2 \pm 10.8$
100 $\mu\text{m}$ spaced micropillar	4.5	5.73	8.5	1.48	1.6	$97.1 \pm 2.8$
			8.4	1.48	1.7	$95.4 \pm 3.1$
125 $\mu\text{m}$ spaced micropillar	4.5	5.03	7.5	1.49	1.1	$95.1 \pm 3.9$
			8.2	1.63	1.3	$98.3 \pm 3.0$
200 $\mu\text{m}$ spaced micropillar	4.5	3.26	6.3	1.93	1.1	$96.7 \pm 2.6$
			5.9	1.81	1.2	$89.8 \pm 3.3$

As noted above, the current densities produced by the six NG electrodes exhibited great variability with a standard deviation of  $\pm 2.0\text{ A/m}^2$  around an average value of  $2.5\text{ A/m}^2$ . Actually, epifluorescence imaging of the electrodes clearly showed that this variability was related to the very different levels of surface colonization. The phase of early microbial settlement on these nano-rough, flat surfaces was consequently far from controlled. In contrast, the proportional relationship established between biofilm coverage ratio and current density demonstrated a

nice reproducibility of the electron transfer rate that was ensured by cells settled on the electrode surface. The variability observed on the chronoamperograms was due to the early colonization process but, when settled, the microbial cells displayed reproducible electrochemical characteristics.

The correlation between coverage ratio and current production, established here with NG electrodes, was no longer valid for SG electrodes. The SG electrodes showed microbial coverage ratios of 65.8 and 58.7% and they produced current densities of 0.92 A/m<sup>2</sup> on average while, in the same range of biofilm coverage ratios, the NG electrodes produced around twice as much current (Figure 2). This result suggests that nano-roughness may influence the electron transfer rate. The asperities of 4.5 nm on average implemented here may facilitate cell anchoring and, when the cells have settled on the electrode surface, may also improve electron transfer. Nevertheless, further experimental investigations are still required to confirm this hypothesis.

### 3.2. Surface patterning with micro-pillars

Gold electrodes were designed with micro-pillars of square cross section 100 x 100 μm and a height of 500 μm. Three patterns were manufactured with pillar spacings of 100, 125 and 200 μm, noted μP100NG, μP125NG and μP200NG, respectively. The surface roughness was always 4.5 nm, like that of the nano-rough (NG) electrodes used in the previous section. Six μPNG electrodes, two with each pillar spacing, were implemented to form *G. sulfurreducens* anodes. Chronoamperograms displayed a quick start of current production on all electrodes, after between 1.1 and 1.7 days (Figure 3). The μP100NG, μP125NG and μP200NG electrodes reached maximum current densities of 8.4, 7.5 and 6.3 A/m<sup>2</sup>, respectively (duplicates gave 8.5, 8.2 and 5.9 A/m<sup>2</sup>, respectively). These values represent improvements of up to 3.4 fold compared to the average current density provided by the NG electrodes (2.5 A/m<sup>2</sup>).

The increase in current production obtained with the micro-pillar electrodes with respect to the flat NG electrodes was related with the larger surface area created by the addition of the pillars. All the electrodes, both NG and μPNG, had a projected surface area of 1 cm<sup>2</sup>, but the geometric surface area that was really offered to the microbial cells to settle was significantly increased by the addition of the micro-pillar arrays. The calculated geometric surface areas were 5.73 cm<sup>2</sup>, 5.06 cm<sup>2</sup> and 3.26 cm<sup>2</sup> with the 100-μm, 125-μm and 200-μm spaced micro-pillars, respectively (Table 1). The current produced by the micro-pillar electrodes varied in the same order as their geometric surface area. Lower pillar spacing led to higher geometric surface area and higher current density.

The current densities can be recalculated with respect to the real geometric area in order to assess the intrinsic efficiency of the biofilms. These "intrinsic" current densities averaged 1.48, 1.56 and 1.87 A/m<sup>2</sup> for the μP100NG, μP125NG and μP200NG, respectively (Table 1). Once expressed per unit of real geometric surface area, the biofilm developed on the pillar-patterned electrodes produced lower current densities than those developed on the nano-rough electrodes (2.5 A.m<sup>-2</sup>).

All the chronoamperograms recorded with the μPNG electrodes exhibited good reproducibility. Although the electrode surfaces of the μPNG electrodes were made of the same nano-rough gold (Ra = 4.5 nm) as the NG electrodes, the high variability observed with the NG electrodes was no longer observed with the μPNG electrodes. The μ-pillar surface patterning considerably decreased the experimental deviation due to microbial adhesion.

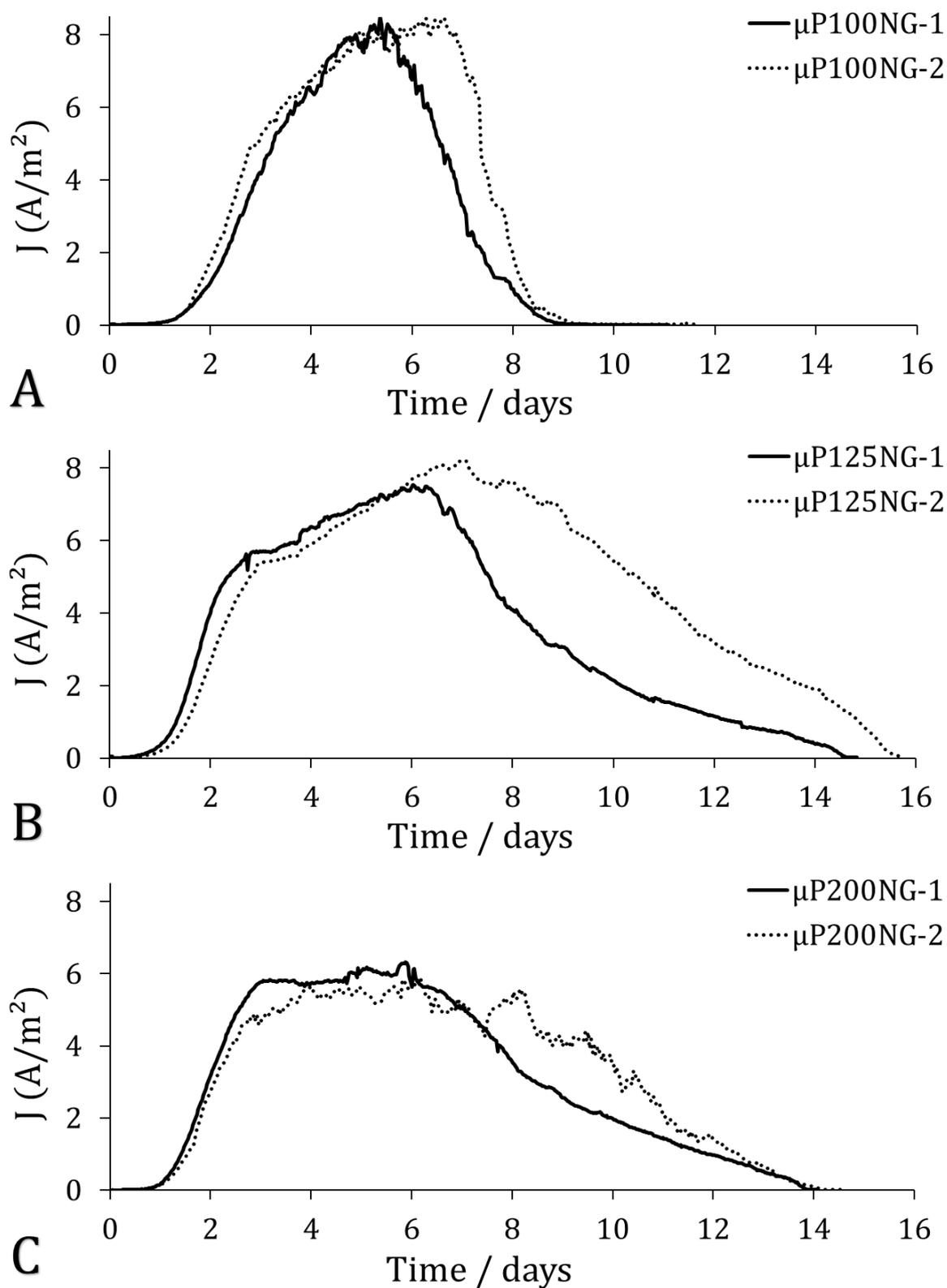


Figure 3: Chronoamperograms recorded with micro-pillar patterned gold electrodes with different pillar spacings A) 100  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P100NG}$ ), B) 125  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P100NG}$ ) and, C) 200  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{P200NG}$ ) under polarization at 0.1 V/SCE with *G. sulfurreducens* and a single batch of acetate 10 mM.

Microbial colonization was imaged on the full height of the pillars, from the bottom to the top, by confocal microscopy. It was thus possible to determine that all  $\mu$ PNG electrodes presented coverage ratios above 90% (Figure 4). The biofilm was well established at the bottom of the electrode and all along the pillars. The biofilm coverage seemed to be close to 100% at the bottom of the pillars but it was not possible to make a numerical measurement to confirm this qualitative observation.

Considering the great height of the micro-pillars designed here, with respect to the cell size of a few micrometres or with respect to the height of 8 to 20  $\mu\text{m}$  for similar micro-structures reported in the literature so far [30,31], it is noteworthy that the biofilm fully covered the bottom interface. The significant height of these pillars did not hamper the full colonization of the electrode surface, right down to their bases. It can now be kept in mind that protruding micro-structures intended to increase the surface area available for biofilm development can be of significant height. The ratio of height to separation distance is likely to be a key parameter that should be optimized in order to maximize the interfacial area. Here 500  $\mu\text{m}$  high pillars set 100  $\mu\text{m}$  apart allowed the biofilm to colonize the pillar sides and the base surface almost uniformly.

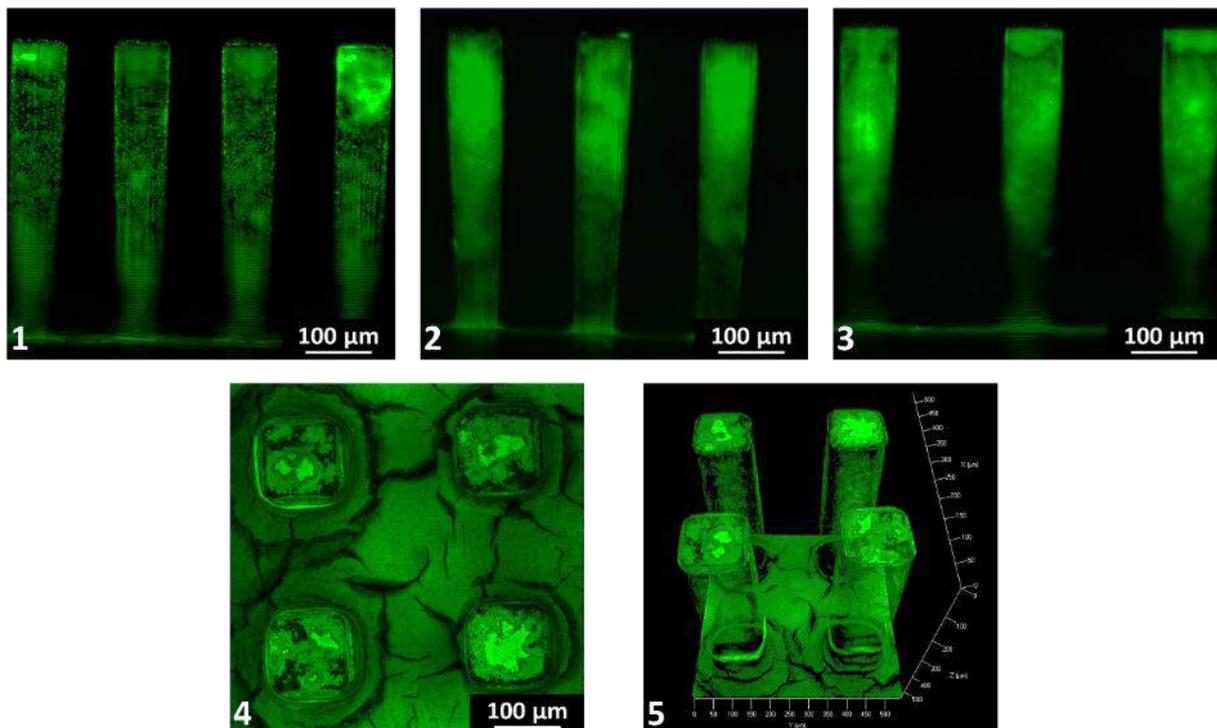


Figure 4: Epifluorescence pictures of micro-pillar patterned gold electrodes. Side views of (1)  $\mu$ P100NG-1, (2)  $\mu$ P125NG-1, (3)  $\mu$ P200NG-2. (4) and (5) are the top view and a 3D reconstruction of  $\mu$ P125NG-2.

The presence of pillars ensured an efficient and reproducible bacterial colonization even though the pillars were covered with the same nano-rough gold surface ( $R_a = 4.5 \text{ nm}$ ) as NG electrodes. The great experimental deviation observed on the chronoamperograms with NG electrodes was considerably mitigated by the presence of the micro-pillar arrays. A micro-pillar array offered a quiet environment for microbial cell adhesion by reducing the local shear stress.

In the absence of significant solution stirring, as was the case here, the microbial cells engaged in the micro-pillar structure would have difficulty in moving back out. The contact time between the cells and the electrode surface, or the number of contacts, would thus be considerably increased in comparison with those on a fully flat surface, which offers no asperities at the level of a microbial cell size (around 2  $\mu\text{m}$ ). This situation should considerably favour the passage from the reversible adsorption phase to the irreversible phase [46,47].

The great experimental deviation observed with NG electrodes disappeared with  $\mu\text{PNG}$ , confirming that these deviations were due to the cell colonization. With  $\mu\text{PNG}$  electrodes, the biofilm was well developed on most of the geometric surface area, although the surface area of these electrodes was 3 to 5 times that of the NG electrodes. Surface patterning at the scale of a few hundreds of micrometres was consequently an excellent way to increase the surface area available for biofilm development, on the one hand, and to improve the biofilm formation process, on the other. The  $\mu\text{PNG}$  electrodes thus improved the reproducibility of biofilm formation and subsequently of current production with respect to the NG electrodes, when current densities were calculated with respect to the 1  $\text{cm}^2$  projected surface area.

Considering the overall geometric surface areas of 5.73, 5.06 and 3.26  $\text{cm}^2$  the current densities gave  $J_{\text{max}}$  of 1.48,  $1.56 \pm 0.10$  and  $1.87 \pm 0.10$   $\text{A}/\text{m}^2$  for 100, 125 and 200  $\mu\text{m}$  pillar spacing, respectively (Table 1). As mentioned above, these values were lower than the average current density produced by the NG electrodes. Moreover, considering that the biofilm coverage of the whole geometric surface area of the  $\mu\text{PNG}$  electrodes ranged from 90 to 100%, the correlation in Figure 2 shows that NG electrodes would produce around 3  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  with similar biofilm coverage. This confirms that the  $\mu\text{PNG}$  electrodes produced less current per unit area if the whole geometric surface was considered. Moreover, the 100  $\mu\text{m}$  spaced pillar array produced the lowest current density and the highest was achieved by the electrodes with pillars 200  $\mu\text{m}$  apart. These two observations strongly suggest the occurrence of mass transfer limitation, which was more marked with the densest micro-pillar array. The diffusion of either acetate or micronutrients, which were in lower concentrations, may have been hampered nearer to the bottom of the micro-pillar array. On the other hand, mass transport limitation can also affect the local pH. Acetate oxidation induces local acidification of the electrode:



and acidification is known to be heavily detrimental to anodic electroactive biofilms [48–50]. Local acidification must be mitigated by the diffusion of buffering species from the bulk to the electrode, which may be hampered by the micro-pillar array, resulting in pH decrease at the bottom of the micro-pillars. It may be pointed out that, at this pH value, protons have no impact on ion transport, as sometimes suggested, but pH is controlled by the migration and diffusion of the buffering species contained in the medium [51]. The hypothesis of mass transport limitation of some compounds, e.g., substrate or buffering species, is consistent with the current plateau, which was observed on the chronoamperograms of the  $\mu\text{P200NG}$  electrodes only. With the less dense micro-pillar array, the gradient profile resulting from the diffusion/reaction balance was established faster than in the more compact arrays.

### 3.3 Mass transport beyond the diffusion layer

A simple approach of mass transport modelling is proposed here to assess whether mass transport inside the micro-pillar array is a major cause of rate-limitation, as supported by the experimental data described above.

The mass transport situation far from the electrode surface must be grasped in order to define the ionic fluxes that reach the front of the electrode. In a general way, mass transport is the result of three contributions: diffusion, migration and convection. In our electrochemical reactors, solution movement was caused only by gentle gas bubbling through a gas disperser, which was deliberately set behind the auxiliary electrodes in order not to disturb the bioanode zone. In such conditions, the convective contribution can be neglected in the bioanode zone. Consequently, outside the diffusion layer of the bioanode, mass transport was mainly ensured by migration. For each ion, the molecular flux driven by migration can be easily calculated by using the transport numbers. The concept of transport numbers and the way to calculate them has been recalled recently in the context of microbial electro-technology [51]. The calculation of the ionic composition of the solution used in the electrochemical reactors is described in the Supplementary Information. It led to the transport numbers reported in Table 2.

*Table 2: Concentrations and transport numbers of the ionic species contained in the electrochemical reactors after inoculation and pH stabilization by N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> bubbling. Fumarate and succinate came from the pre-culture used as the inoculum (see Supplementary Information).*

Ion	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Acetate <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Succinate <sup>2-</sup>	Fumarate <sup>2-</sup>
<b>C (mM)</b>	55	1.3	28	29.6	3.6	1.4	9	29.3	4	1
<b>t<sub>i</sub> (%)</b>	28.4	1.0	21.2	13.6	1.3	1.6	3.8	23.0	4.8	1.3

The transport numbers give the percentage of current that was transported through the solution by the motion of each ionic species. Here, most of the current was transported through the solution by the motion of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> to the auxiliary electrode (cathode) and of Cl<sup>-</sup> to the bioanode. Using the transport numbers, the molecular balance sheet of the ionic species can be calculated directly. For instance, taking the exchange of 100 electrons as the calculation basis, the molecular flux of each ion is equal to its transport number expressed as a percentage. It is just necessary to remember to divide the transport number by the charge for multivalent ions (Figure 5).

When 100 electrons are extracted from the bioanode, 12.5 molecules of acetate are oxidized according to reaction (1). Migration brings 3.8 molecules of acetate from the bulk to the bioanode. For the process to be stable, 8.7 molecules of acetate must be brought to the bioanode by diffusion.

Moreover, when 100 electrons are extracted from the bioanode, 25 molecules of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and 112.5 protons are produced. To be stable, the process also requires the 112.5 protons be neutralized to avoid local acidification of the bioanode. At pH around neutrality, the concentration of protons is extremely weak. For instance, even accepting significant local acidification to pH 5.0, proton concentration is only 0.01 mM. With such a low concentration,

neither migration nor diffusion is efficient to drive the protons away from the interface at a sufficient rate. Protons must consequently be neutralized by the transport of buffering species towards the bioanode. Here, with 112.5 protons produced, 25 at most can be neutralized by the  $\text{HCO}_3^-$  molecules produced by the reaction. In addition, migration drives 13.6 molecules of  $\text{HCO}_3^-$  from the bulk to the bioanode together with 0.8 molecules of  $\text{HPO}_4^{2-}$ , which can also help to neutralize the protons (in the case of divalent ions, the molecular flux is half the charge flux). In total, reaction and migration can neutralize a maximum of 39.4 protons. To be stable, the process requires mass transport by diffusion to bring 73.1 molecules of buffering species to the bioanode.

It can be concluded that migration from the bulk of the solution, far from the electrode surface, did not ensure the mass transport situation that would be required for the bioanode to operate in stable conditions. In such conditions, steep concentration gradients develop close to the electrode surface and diffusion must ensure the majority of mass transport. Here, diffusion must play the main role for the transport of both acetate and the buffering species to the bioanode. Diffusion must bring only 8.7 acetate molecules but 73.1 molecules of buffering species to the bioanode. In consequence, it is much more likely that mass transport limitation appeared because of insufficient diffusion of the buffering species than of substrate.

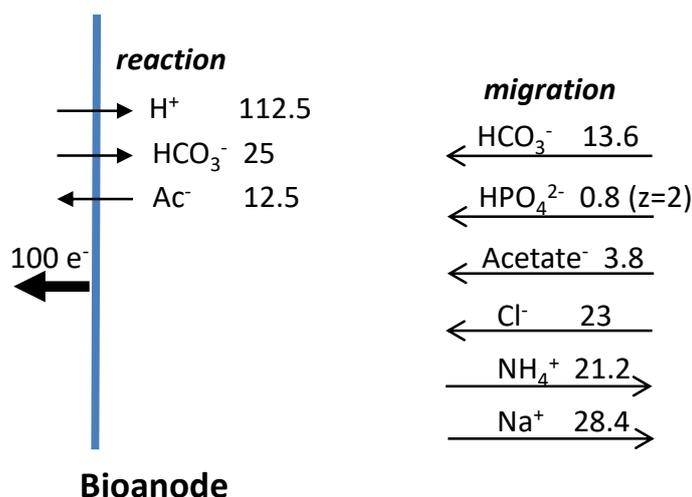


Figure 5: Molecular balance sheet of the main ionic species involved in charge transport through the bulk on the basis of 100 electrons exchanged.  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , succinate and fumarate, which had minor roles, are not represented.

### 3.4 Mass transport through the diffusion layer and inside the micro-pillar array

According to the global approach developed in the previous section, diffusion close to the electrode should play the main role in mass transport of the substrate and buffering species.

The impact of diffusion above the micro-pillar array can be assessed by assuming a diffusion layer of constant thickness above the micro-pillar structure (Figure 6). In the stationary state, for each species, the diffusion flux, which is driven through the diffusion layer by the concentration gradient, is equal to the flux consumed by the bioanode:

$$-\frac{D}{\delta_{dl}} (C^0 - C^{bulk}) = \frac{J}{n F} \quad (2)$$

where  $D$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) is the diffusion coefficient of the species,  $\delta_{dl}$  ( $10^{-4}$  m) is the thickness of the diffusion layer above the micro-pillar structure,  $C^{bulk}$  and  $C^0$  ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ) are the concentrations in the bulk and at the top of the micro-pillar array,  $J$  ( $\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$ ) is the current density expressed with respect to the electrode surface area, and  $F$  ( $96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) is the Faraday constant.

Dividing by  $nF$  transforms the current density into the molar flux of the species consumed by the bioanode. For acetate,  $n$  is obviously equal to 8 according to reaction (1). The case of  $\text{HCO}_3^-$  is slightly more complex. In the stationary state, pH is stable inside the micro-pillar structure, so each proton produced by the electrochemical reaction must be extracted by a molecule of  $\text{HCO}_3^-$  that has penetrated into the array and egressed in the form of  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . For 8 electrons produced, 9 protons have to be neutralized, but Reaction (1) produces 2  $\text{HCO}_3^-$  molecules, so only 7 molecules of  $\text{HCO}_3^-$  must penetrate into the array from the bulk, and the parameter  $n$  is equal to 8/7.

Calculations were made with current densities  $J$  of 8.5 and 6.1  $\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$  for micro-pillar spacing of 100 and 200  $\mu\text{m}$ , respectively. The diffusion layer thickness was assumed to be 100  $\mu\text{m}$ , which is a common value for an electrochemical process in quiescent solution [52–54]. The diffusion coefficients of acetate and  $\text{HCO}_3^-$  were extracted from the literature. The results reported in Table 3 show a limited impact of the diffusion layer, diminishing the concentration of acetate from 9 mM in the solution bulk to 8.0 mM at the interface with the top of the micro-pillar arrays. Similarly, the concentration decrease was not important for  $\text{HCO}_3^-$ , which diminished from 29.6 to 23.1 mM. For both compounds, the maximum gradient was obtained with the 100- $\mu\text{m}$  spacing, which was consistent with the higher current density  $J$  produced by this configuration.

Mass transport inside the micro-pillar array can be approached by a diffusion-reaction equation. The micro-pillar pattern offers a highly symmetric topography composed of adjacent elementary units bounded by the central axes of four neighbouring pillars (Figure 6). The mass transport situation is exactly the same in all these elementary units (i.e. the first derivative of the concentration of each species is nil at the frontier between two adjacent units), so each unit can be modelled as an individual pore. The diffusion-reaction equation was established in the  $x$  direction perpendicular to the electrode surface in such a unit, i.e. parallel to the micro-pillars.

For acetate, the differential mass balance in a section of the elementary unit at the stationary state is:

$$-S D_{Ac} \frac{d^2 C_{Ac}}{dx^2} = -l_a \frac{J_{loc}}{n F} \quad (3)$$

where  $S$  ( $\text{m}^2$ ) is the section of the elementary unit that is free for diffusion,  $D_{Ac}$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) is the diffusion coefficient of acetate,  $C_{Ac}$  ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ) is the acetate concentration,  $l_a$  (m) is the electrochemically active length in the section of the elementary unit (Figure 6),  $J_{loc}$  ( $\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$ ) is the local current density, i.e. expressed with respect to the overall geometric surface area,  $n = 8$  is the number of electrons produced per molecule of acetate consumed (Reaction 1), and  $F$

(96 485 C.mol<sup>-1</sup>) is the Faraday constant. The width of the micro-pillars was always 100 μm, so  $l_a$  was equal to 400 μm for all the configurations. In contrast, the free section  $S$  depended on the pillar spacing and was equal to (Figure 6):

$$S = (d + 100 \cdot 10^{-6})^2 - 4 (50 \cdot 10^{-6})^2 \quad (4)$$

where  $d$  (= 100, 125 or 200.10<sup>-6</sup> m) is the distance between pillars.

At the upper surface of the electrode ( $x = 0$ ), the acetate concentration was the interfacial concentration ( $C_{Ac}^0$ ) calculate above:

$$x = 0, C_{Ac} = C_{Ac}^0 \quad (5)$$

At the bottom of the elementary unit ( $x = \delta$ ), acetate was consumed in the same way as along the electroactive wall:

$$x = \delta, S D_{Ac} \frac{dC_{Ac}}{dx} = -S \frac{J_{loc}}{n F} \quad (6)$$

This assumption was justified by the full biofilm coverage of the bottom of the micro-structure electrodes.

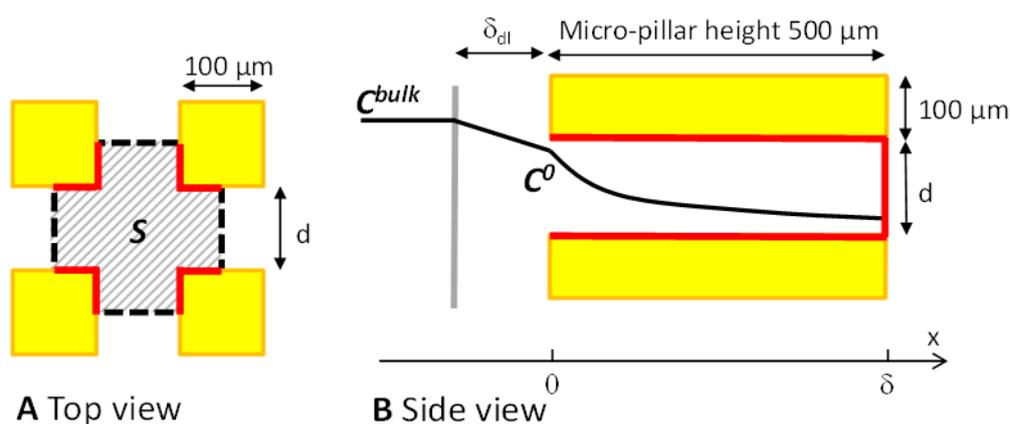


Figure 6: Scheme of the integration elementary unit. The electroactive length ( $l_a$ ) is represented by the continuous red line of the frontier; a scheme of concentration profile is represented on the side view.

To reach a standard approach and reduce the number of parameters to be treated, the equations were transformed into non-dimensional form, with the dimensionless variables:

$$\bar{C}_{Ac} = \frac{C_{Ac}}{C_{Ac}^0} \text{ and } X = \frac{x}{\delta} \quad (7)$$

leading to:

$$\frac{d^2 \bar{C}_{Ac}}{dX^2} = \frac{l_a \delta}{S} \frac{\delta}{D_{Ac} C_{Ac}^0} \frac{J_{loc}}{nF} \quad (8)$$

$$X = 0, \bar{C}_{Ac} = 1 \quad (9)$$

$$X = 1, \frac{d\bar{C}_{Ac}}{dx} = \frac{\delta}{D_{Ac} C_{Ac}^0} \frac{J_{loc}}{nF} \quad (10)$$

Two dimensionless numbers appear, one ( $\zeta$ ) is a geometric ratio expressing the overall electrochemically active area in the elementary unit with respect to the section available for diffusion:

$$\zeta = \frac{l_a \delta}{S} \quad (11)$$

the other is the modified Damkhöler number [55]:

$$Da_{mod} = \frac{J_{loc} \delta}{nF D_{Ac} C_{Ac}^0} = \frac{\frac{J_{loc}}{nF}}{\frac{D_{Ac} C_{Ac}^0}{\delta}} \quad (12)$$

which expresses the rate of consumption by the electrochemical reaction with respect to the maximum diffusion rate. Solving equation (8) with the boundary conditions (9) and (10) gives the concentration profile of acetate in the micro-pillar array:

$$\bar{C}_{Ac} = 1 + \zeta Da_{mod} \frac{X^2}{2} - \zeta Da_{mod} \left( \frac{1}{\zeta} + 1 \right) X \quad (13)$$

where  $X$  varies from 0 at the top of the micro-pillar to 1 at the bottom.

The same equation was derived for  $\text{HCO}_3^-$ . As detailed above, the current density was transformed into the molar flux of the  $\text{HCO}_3^-$  that was consumed by the electrochemical

reaction by using  $n = 8/7$ . It may be recalled that, in this context,  $\text{HCO}_3^-$  was indirectly consumed by the reaction because, to maintain a stationary state,  $\text{HCO}_3^-$  is assumed to neutralize the protons produced by the electrochemical reaction (Reaction (1)). This is the condition sine qua non for maintaining a stable pH inside the micro-pillar array at the stationary state.

Assuming that  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{H}_2\text{CO}_3$  have identical diffusion coefficients, mass conservation indicates that the sum of their concentrations remains equal along the whole diffusion pathway. Calculating the concentration of  $\text{HCO}_3^-$  along the micro-pillars thus directly gives the concentration of  $\text{H}_2\text{CO}_3$  along the micro-pillars and the pH profile with the acid dissociation equilibrium:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left( \frac{C_{\text{HCO}_3^-}}{C_{\text{H}_2\text{CO}_3}} \right) \quad (14)$$

Table 3: Parameter values used to model the diffusion of acetate and  $\text{HCO}_3^-$  through the diffusion layer and inside the micro-pillar arrays. Values of diffusion coefficients from [56]; in all cases  $\delta_{dl} = 10^{-4}$  m,  $l_a = 4 \cdot 10^{-4}$  m and  $\delta = 5 \cdot 10^{-4}$  m.

$d$	$S$ $\text{m}^2$	$J$ $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$	$J_{loc}$ $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$	$n$	$D$ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	$C^{bulk}$ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$	$C^0$ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$	$\zeta$	$\text{Da}_{mod}$	$\zeta \text{Da}_{mod}$
<b>Acetate</b>										
<b>100 <math>\mu\text{m}</math></b>	$3 \cdot 10^{-8}$	8.5	1.48	8	$1.09 \cdot 10^{-9}$	9	<b>8.0</b>	6.67	0.11	<b>0.73</b>
<b>200 <math>\mu\text{m}</math></b>	$8 \cdot 10^{-8}$	6.1	1.87	8	$1.09 \cdot 10^{-9}$	9	<b>8.3</b>	2.5	0.13	<b>0.34</b>
<b><math>\text{HCO}_3^-</math></b>										
<b>100 <math>\mu\text{m}</math></b>	$3 \cdot 10^{-8}$	8.5	1.48	8/7	$1.18 \cdot 10^{-9}$	29.6	<b>23.1</b>	6.67	0.25	<b>1.64</b>
<b>200 <math>\mu\text{m}</math></b>	$8 \cdot 10^{-8}$	6.1	1.87	8/7	$1.18 \cdot 10^{-9}$	29.6	<b>24.9</b>	2.5	0.29	<b>0.72</b>

For acetate, the values of  $\delta \text{Da}_{mod}$  (Table 3), were always less than 1, which indicates that the consumption rate by the electrochemical reaction was slower than the maximum diffusion rate (Equation 12). The profile of the dimensionless concentration of acetate in the micro-pillar array (Figure 7.A) confirmed that acetate did indeed reach the bottom of the structure and was consequently not a significant source of rate limitation.

The situation was not so obvious for  $\text{HCO}_3^-$ , which displaced  $\delta \text{Da}_{mod}$  greater than 1 for the 100  $\mu\text{m}$  spaced micro-pillars (Table 3). In this case, diffusion may be rate-limiting. This was confirmed by the concentration profile (Figure 7). For the most compact micro-pillar array,  $\text{HCO}_3^-$  did not reach the bottom of the structure. Due to the protons produced by the electrochemical reaction,  $\text{HCO}_3^-$  was fully consumed at around 80% of the depth of the structure. In this case,  $\text{HCO}_3^-$  was not able to maintain a stable pH on the whole micro-pillar array. The concentration and pH profiles showed that diffusion limitation was not so severe in the 200- $\mu\text{m}$  spaced micro-structure.  $\text{HCO}_3^-$  was able to reach the bottom of the array (Figure 7). Nevertheless a significant pH gradient occurred inside (Figure 7), with a value of 5.76 at the bottom.

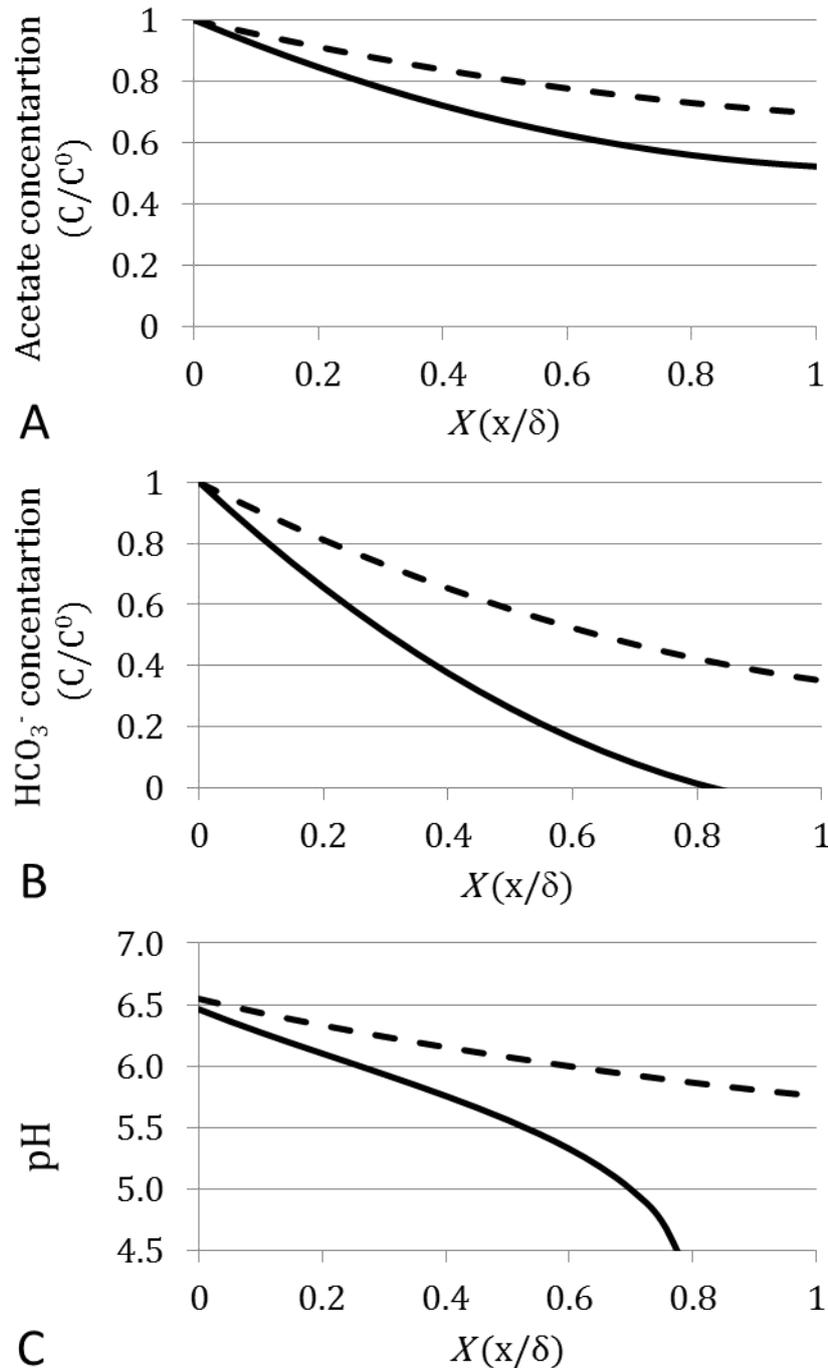


Figure 7: Theoretical concentration (A and B) and pH (C) profiles inside the micro-pillar arrays calculated by the model with the parameter values given in Table 3, from top ( $X = 0$ ) to bottom ( $X = 1$ ). Continuous line: 100- $\mu\text{m}$  spaced micro-pillars; dashed line: 200- $\mu\text{m}$  spaced micro-pillars.

The pH of the solution bulk was 6.8 and the calculated value was around 6.5 at the top of the micro-pillar structure for the two configurations. For the 100- $\mu\text{m}$  spaced micro-structure, the model revealed great acidification along the micro-pillars, which was probably the main cause of rate limitation. This severe limiting effect explained the low local current density ( $J_{loc}$ , expressed with respect to the overall geometric surface area) of 1.48  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , while flat electrodes with the same nano-roughness and with similar full biofilm coverage produced current densities ranging from 2.5 to 3  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  (Figure 2). Mass transport of the buffering species

was less limiting in the case of the 200- $\mu\text{m}$  spaced micro-pillars. Nevertheless, a significant pH gradient was calculated, with pH falling to 5.76 at the bottom of the micro-pillars. This significant acidification explained why the local current density of  $1.87 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  was higher than that of the 100- $\mu\text{m}$  spaced structure but did not reach the value of the flat surface.

#### **4. Conclusion**

By mastering the roughness of gold surfaces at the nanometre scale, it has been possible to reveal that nano-roughness impacts the electron transfer rate of the cells settled on the surface. A roughness of 4.5 nm may improve the electron transfer rate with respect to smooth surface ( $R_a = 0.8 \text{ nm}$ ). Great experimental deviation was observed on the production of current. Nevertheless, regardless of the progress of the microbial colonization on the surface, current density was always directly proportional to the biofilm coverage. The experimental deviations were not due to the electron transfer process but to the difficulty for the microbial cells to settle on flat surfaces.

The experimental reproducibility was considerably improved by patterning the electrode surface with arrays of micro-pillars 500  $\mu\text{m}$  in height. The micro-pillar array offered the cells an environment that allowed them to establish irreversible adhesion. Moreover, the current density related to the projected surface area was increased around 3.4 fold with respect to the flat electrodes with identical surface roughness (NG electrodes with  $R_a = 4.5 \text{ nm}$ ), because of the larger surface area available for biofilm development.

In conclusion, with respect to the flat smooth surface, nano-roughness increased the current density by a factor of 2.8, due to improved electron transfer, and micro-structuring improved it by a factor 3.4, due to the area increase. The surface design of microbial electrodes should consequently include nano-roughness to favour electron transfer and micro-roughness of the order of tens or hundreds of micrometres to increase the surface available for biofilm growth and create a quiet environment favouring cell settlement. The optimal micro-roughness must be now designed by balancing the largest possible surface area and the lowest possible mass transport limitation, particularly of the buffering species.

#### **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 Koropokkuru (ANR-14-CE05-0004). The authors would like to acknowledge Luc Etcheverry, Frédéric Dacosta, Jean-Pierre Escafit and Vincent Loisel for their help in designing and setting up the reactors as well as Cécile Pouzet (Plateforme Imagerie – FR AIB) and Benjamin Erable for their implication in the fluorescence imaging acquisition.

#### **Declaration of interest**

None.

## References

- [1] H. Wang, Z.J. Ren, A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1796–1807. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.001.
- [2] S. Venkata Mohan, Chapter 6 - Reorienting Waste Remediation Towards Harnessing Bioenergy: A Paradigm Shift, in: V.V. Ranade, V.M. Bhandari (Eds.), *Industrial Wastewater Treatment, Recycling and Reuse*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2014: pp. 235–281. doi:10.1016/B978-0-08-099968-5.00006-4.
- [3] S. Bajracharya, M. Sharma, G. Mohanakrishna, X. Dominguez Benneton, D.P.B.T.B. Strik, P.M. Sarma, D. Pant, An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond, *Renew. Energy.* 98 (2016) 153–170. doi:10.1016/j.renene.2016.03.002.
- [4] D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments, *Science.* 295 (2002) 483–485. doi:10.1126/science.1066771.
- [5] L.M. Tender, C.E. Reimers, H.A. Stecher, D.E. Holmes, D.R. Bond, D.A. Lowy, K. Pilobello, S.J. Fertig, D.R. Lovley, Harnessing microbially generated power on the seafloor, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 821–825. doi:10.1038/nbt716.
- [6] Y. Zhang, I. Angelidaki, Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges, *Water Res.* 56 (2014) 11–25. doi:10.1016/j.watres.2014.02.031.
- [7] M. Kitching, R. Butler, E. Marsili, Microbial bioelectrosynthesis of hydrogen: Current challenges and scale-up, *Enzyme Microb. Technol.* 96 (2017) 1–13. doi:10.1016/j.enzmictec.2016.09.002.
- [8] H. Wang, Z.J. Ren, Bioelectrochemical metal recovery from wastewater: A review, *Water Res.* 66 (2014) 219–232. doi:10.1016/j.watres.2014.08.013.
- [9] Y.V. Nancharaiyah, S. Venkata Mohan, P.N.L. Lens, Metals removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review, *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 102–114. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.058.
- [10] G. Pasternak, J. Greenman, I. Ieropoulos, Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring, *Sens. Actuators B Chem.* 244 (2017) 815–822. doi:10.1016/j.snb.2017.01.019.
- [11] M. Di Lorenzo, T.P. Curtis, I.M. Head, K. Scott, A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters, *Water Res.* 43 (2009) 3145–3154. doi:10.1016/j.watres.2009.01.005.
- [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) 319–326. doi:10.1080/08927014.2011.564615.
- [13] B. Maturro, C. Cruz Viggi, 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). doi:10.3389/fmicb.2017.00952.
- [14] W.G. Characklis, K.C. Marshall, *Biofilms*, Wiley, New York, 1990, pp195-196.
- [15] R.D. Monds, G.A. O'Toole, The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review, *Trends Microbiol.* 17 (2009) 73–87. doi:10.1016/j.tim.2008.11.001.

- [16] M. Sun, F. Zhang, Z.-H. Tong, G.-P. Sheng, Y.-Z. Chen, Y. Zhao, Y.-P. Chen, S.-Y. Zhou, G. Liu, Y.-C. Tian, H.-Q. Yu, A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 338–343. doi:10.1016/j.bios.2010.08.010.
- [17] L. Peng, S.-J. You, J.-Y. Wang, Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1248–1251. doi:10.1016/j.bios.2009.10.002.
- [18] Y. Fan, S. Xu, R. Schaller, J. Jiao, F. Chaplen, H. Liu, Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1908–1912. doi:10.1016/j.bios.2010.05.006.
- [19] L. Pons, M.-L. Délia, A. Bergel, Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2678–2683. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.138.
- [20] D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable, A. Bergel, Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9645–9652. doi:10.1039/C2EE22429A.
- [21] C. Feng, F. Li, H. Liu, X. Lang, S. Fan, A dual-chamber microbial fuel cell with conductive film-modified anode and cathode and its application for the neutral electro-Fenton process, *Electrochimica Acta.* 55 (2010) 2048–2054. doi:10.1016/j.electacta.2009.11.033.
- [22] Z. Ye, J. Hou, M.W. Ellis, B. Behkam, Effect of Anode Surface Roughness on Power Generation in Microbial Fuel Cells, ASME. ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Volume 6: Energy, Parts A and B (2012) 1409–1414. doi:10.1115/IMECE2012-88643.
- [23] K. Guo, B.C. Donose, A.H. Soeriyadi, A. PrévotEAU, S.A. Patil, S. Freguia, J.J. Gooding, K. Rabaey, Flame Oxidation of Stainless Steel Felt Enhances Anodic Biofilm Formation and Current Output in Bioelectrochemical Systems, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7151–7156. doi:10.1021/es500720g.
- [24] X. Jia, Z. He, X. Zhang, X. Tian, Carbon paper electrode modified with TiO<sub>2</sub> nanowires enhancement bioelectricity generation in microbial fuel cell, *Synth. Met.* 215 (2016) 170–175. doi:10.1016/j.synthmet.2016.02.015.
- [25] H. Feng, Y. Liang, K. Guo, W. Chen, D. Shen, L. Huang, Y. Zhou, M. Wang, Y. Long, TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays Modified Titanium: A Stable, Scalable, and Cost-Effective Bioanode for Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3 (2016) 420–424. doi:10.1021/acs.estlett.6b00410.
- [26] S. Kalathil, D. Pant, Nanotechnology to rescue bacterial bidirectional extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems, *Rsc Adv.* 6 (2016) 30582–30597. doi:10.1039/c6ra04734c.
- [27] S. Inoue, E.A. Parra, A. Higa, Y. Jiang, P. Wang, C.R. Buie, J.D. Coates, L. Lin, Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements, *Sens. Actuators Phys.* 177 (2012) 30–36. doi:10.1016/j.sna.2011.09.023.
- [28] T. Kano, E. Suito, K. Hishida, N. Miki, Effect of Microscale Surface Geometry of Electrodes on Performance of Microbial Fuel Cells, *Jpn. J. Appl. Phys.* 51 (2012) 06FK04. doi:10.1143/JJAP.51.06FK04.
- [29] Z. Ye, M.W. Ellis, A.S. Nain, B. Behkam, Effect of electrode sub-micron surface feature size on current generation of *Shewanella oneidensis* in microbial fuel cells, *J. Power Sources.* 347 (2017) 270–276. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.02.032.

- [30] C.P.B. Siu, M. Chiao, A Microfabricated PDMS Microbial Fuel Cell, *J. Microelectromechanical Syst.* 17 (2008) 1329–1341. doi:10.1109/JMEMS.2008.2006816.
- [31] J. Kim, Power enhancement of a  $\mu$ l-scale microbial fuel cells by surface roughness, *Appl. Phys. Lett.* 104 (2014) 223702. doi:10.1063/1.4880596.
- [32] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes, *Electrochimica Acta.* 53 (2008) 5235–5241. doi:10.1016/j.electacta.2008.02.056.
- [33] 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) 2048–2055. doi:10.1039/C5EE00866B.
- [34] H. Richter, K. McCarthy, K.P. Nevin, J.P. Johnson, V.M. Rotello, D.R. Lovley, Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes, *Langmuir.* 24 (2008) 4376–4379. doi:10.1021/la703469y.
- [35] Y. Liu, H. Kim, R. Franklin, D. R. Bond, Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms, *Energy Environ. Sci.* 3 (2010) 1782–1788. doi:10.1039/C0EE00242A.
- [36] N.S. Malvankar, M. Vargas, K.P. Nevin, A.E. Franks, C. Leang, B.-C. Kim, K. Inoue, T. Mester, S.F. Covalla, J.P. Johnson, V.M. Rotello, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 573-579. doi:10.1038/nnano.2011.119.
- [37] C. Koch, F. Harnisch, Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms?, *ChemElectroChem.* 3 (2016) 1282–1295. doi:10.1002/celec.201600079.
- [38] D.R. Bond, D.R. Lovley, Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548–1555. doi:10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003.
- [39] D.R. Lovley, T. Ueki, T. Zhang, N.S. Malvankar, P.M. Shrestha, K.A. Flanagan, M. Aklujkar, J.E. Butler, L. Giloteaux, A.-E. Rotaru, D.E. Holmes, A.E. Franks, R. Orellana, C. Risso, K.P. Nevin, *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications, *Adv. Microb. Physiol.* 59 (2011) 1–100. doi:10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5.
- [40] L. Soussan, B. Erable, M.-L. Delia, A. Bergel, The open circuit potential of *Geobacter sulfurreducens* bioanodes depends on the electrochemical adaptation of the strain, *Electrochem. Commun.* 33 (2013) 35–38. doi:10.1016/j.elecom.2013.04.013.
- [41] Y. Irie, M.R. Parsek, Quorum Sensing and Microbial Biofilms, in: T.Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms*, Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2008: pp. 67–84. doi:10.1007/978-3-540-75418-3\_4.
- [42] E. Medilanski, K. Kaufmann, L.Y. Wick, O. Wanner, H. Harms, Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion, *Biofouling.* 18 (2002) 193–203. doi:10.1080/08927010290011370.
- [43] D. Rodriguez, B. Einarsson, A. Carpio, Biofilm growth on rugose surfaces, *Phys. Rev. E.* 86 (2012) 061914. doi:10.1103/PhysRevE.86.061914.
- [44] 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. doi:10.1016/j.elecom.2016.02.017.
- [45] L. Pons, M.-L. Délia, R. Basséguy, A. Bergel, Effect of the semi-conductive properties of the passive layer on the current provided by stainless steel microbial cathodes, *Electrochimica Acta.* 56 (2011) 2682–2688. doi:10.1016/j.electacta.2010.12.039.

- [46] R. Belas, Sensing, Response, and Adaptation to Surfaces: Swarmer Cell Differentiation and Behavior, in: M. Fletcher (Ed.), *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, Wiley, New York, 1996. doi:10.1002/maco.19970480916
- [47] E. Karatan, P. Watnick, Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73 (2009) 310–347. doi:10.1128/MMBR.00041-08.
- [48] S.C. Popat, C.I. Torres, Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 265–273. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.136.
- [49] B.G. Lusk, P. Parameswaran, S.C. Popat, B.E. Rittmann, C.I. Torres, The effect of pH and buffer concentration on anode biofilms of *Thermincola ferriacetica*, *Bioelectrochemistry.* 112 (2016) 47–52. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.07.007.
- [50] A.K. Marcus, C.I. Torres, B.E. Rittmann, Analysis of a microbial electrochemical cell using the proton condition in biofilm (PCBIOFILM) model, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 253–262. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.100.
- [51] M. Oliot, S. Galier, H. Roux de Balmann, A. Bergel, Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review, *Appl. Energy.* 183 (2016) 1682–1704. doi:10.1016/j.apenergy.2016.09.043.
- [52] S.C. Dexter, S.H. Lin, Calculation of Seawater pH at Polarized Metal Surfaces in the Presence of Surface Films, *CORROSION.* 48 (1992) 50–60. doi:10.5006/1.3315918.
- [53] A.G. Zelinsky, B.Y. Pirogov, Effective thickness of the diffusion layer during hydrogen ion reduction in aqueous hydrochloric acid solutions, *Russ. J. Electrochem.* 44 (2008) 585–593. doi:10.1134/S1023193508050133.
- [54] V.S. Bagotsky (Ed.), *Mass Transfer in Electrolytes*, in: *Fundamental Electrochemistry.*, John Wiley & Sons, Inc., (2005) pp. 51–67. doi:10.1002/047174199X.ch4.
- [55] K. Scott, Y.-P. Sun, Approximate Analytical Solutions for Models of Three-Dimensional Electrodes by Adomian's Decomposition Method, in: C.G. Vayenas (Ed.), *Modern Aspects of Electrochemistry n°39*, Springer, New York, (2007): pp. 221–304. doi:10.1007/978-0-387-46108-3\_4.
- [56] J.R. Rumble (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 98th Edition, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (2018). ISBN 9781498784542

### 3. COMMENTAIRES SUR LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES BIOANODES MICRO-STRUCTUREES.

Les principales observations et conclusions concernant l'étude de la formation de bioanodes sur les surfaces micro-structurées ont été exposées au sein de la publication présentée dans la section 2. Cependant, une observation importante n'a pas été présentée. Comme le montre la Figure 3, l'imagerie en épifluorescence des bioanodes en fin d'expérience montre la formation de ponts de biofilm entre certains piliers. Ces ponts de biofilms sont observés sur les électrodes  $\mu$ P100NG et  $\mu$ P125NG mais n'apparaissent jamais sur les électrodes  $\mu$ P200NG. Ils sont principalement présents lorsque les piliers sont un peu inclinés, donc plus rapprochés que l'espacement normal. Néanmoins, certains ponts sont aussi formés à des distances de 125  $\mu$ m mais pas au-delà.

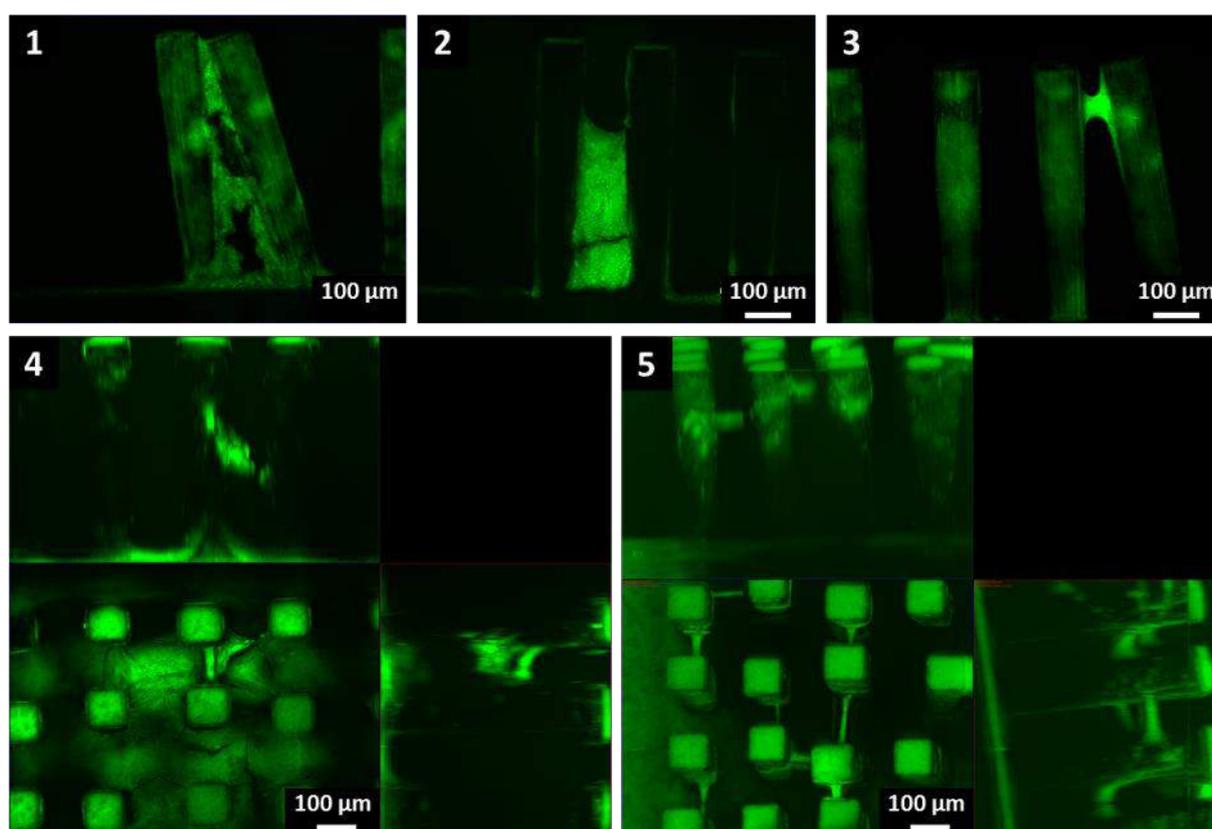


Figure 3 : Observation au microscope à épifluorescence de ponts de biofilms se formant entre les piliers. Vues latérales (1 à 3) et vues du dessus avec projection latérale

Dans l'optique d'une production de courant accrue, cette formation de ponts de biofilm s'avère très intéressante. Comme décrit dans la section 3 du Chapitre 1, des transferts électroniques à longue distance sont possibles au sein d'un biofilm épais et conducteur via la formation de pilis (Malvankar et al, 2011) ou grâce à la mise en place de chaînes électroniques entre des cellules en contact entre elles (Yates et al, 2016). C'est le cas au sein des biofilms de *G. sulfurreducens* et il a été démontré que ces modes de transfert, dits directs, permettent à des

cellules situées à des dizaines de micromètres de l'électrode de transférer leurs électrons (Franks et al, 2010, Guo et al, 2013). C'est pour cette raison que la production de courant par les biofilms de *G. sulfurreducens* est liée à l'épaisseur du biofilm et à la biomasse totale (Malvankar et al, 2012). Plus il y a de biomasse, plus la production de courant est importante. Toutefois, plus le biofilm est épais, plus la résistance du biofilm augmente et entraîne une réduction de la production de courant par unité de biomasse (Sun et al, 2016). Il existe donc un verrou à l'augmentation des performances des biofilms électroactifs et c'est à ce niveau que la formation de structures pontées est apparue comme très prometteuse.

L'augmentation de la résistance du biofilm lorsque son épaisseur augmente a été attribuée à la quantité grandissante de cellules mortes ou inactives. L'activité électro-catalytique est maximale pour des épaisseurs de 20  $\mu\text{m}$  environ. Au-delà, les cellules du biofilm se retrouvent dans un environnement appauvri et l'épaississement du biofilm s'arrête aux alentours de 45  $\mu\text{m}$  (Sun et al, 2016). Ces informations nous ont amené à formuler une hypothèse quant à l'avantage décisif que pourrait constituer les ponts de biofilm observés ici. A la surface de nos micro-piliers, le biofilm est assez fin et ne dépasse pas 20  $\mu\text{m}$ , il doit donc avoir une excellente efficacité électro-catalytique. Ce biofilm ne doit pas présenter un taux important de cellules inactives et doit offrir une conductivité importante. Avec l'addition des structures pontées entre les micro-piliers, la biomasse totale augmente mais pas l'épaisseur du biofilm à la surface des micro-piliers. De plus, les structures pontées forment des pans de biofilms assez fins et sont en contact avec le milieu via les deux faces, ce qui pourrait réduire la mortalité des cellules. On aurait donc une architecture de biofilm qui permettrait d'augmenter la surface d'un biofilm fin, augmentant ainsi la biomasse sans accroître l'épaisseur, ce qui n'est pas permis par la formation d'un biofilm sur une surface plane.

Pourtant, malgré le côté très attractif de cette hypothèse et des perspectives qu'elle ouvre en termes d'optimisation, certaines observations restaient dérangeantes. La plupart de ces structures sont groupées, plus ou moins rapprochées, sur certaines parties de l'électrode et ne sont pas uniformément réparties dans le réseau de micro-piliers. En regardant plus précisément la localisation de ces structures, elles apparaissaient de façon récurrente sur les zones périphériques du réseau de piliers. Le deuxième questionnement concerne le mode de formation de ces structures d'une centaine de micromètres de long mais de seulement une dizaine de micromètres d'épaisseur. Des structures de biofilm si fines en l'absence de surface pour les soutenir sont très peu courantes. Une des seules observations qui pourrait être rapprochée de ce type de structures concerne la formation de streamers, c'est-à-dire de biofilms s'étirant à partir d'un point d'accroche dans le sens d'un écoulement (Valiei et al, 2012). Ici, dans les réacteurs concernés, les seuls mouvements de fluides sont causés par le bullage de gaz et sont donc très faibles. Malgré une recherche bibliographique soignée sur la formation de biofilms sur des surfaces structurées ou des matériaux poreux, à notre connaissance, aucune structure similaire n'a été observée.

Le doute s'est donc installé quant à la réalité de la formation de ces structures pontées dans les réseaux de micro-piliers. La cruelle possibilité que ces structures soient en réalité des artefacts dus à la méthode expérimentale est apparue. Nous avons alors envisagé que ces structures de biofilm puissent apparaître lors du séchage des électrodes après le marquage.

L'évaporation de l'eau, très lente, provoque la concentration progressive des cellules et des marqueurs fluorescents. L'évaporation terminée, un agglomérat sec de cellules et de marqueur pourrait rester à la place d'une goutte prise entre les micro-piliers. Cet effet a déjà été observé sur des surfaces micro-structurées super-hydrophobes (Gentile et al, 2014, Burkhart et al, 2017). Des mesures d'angles de contact effectuées sur les trois réseaux de micro-piliers ont malheureusement renforcé cette hypothèse avec des angles de contact de 108 et 96 ° pour les électrodes  $\mu$ P100NG et  $\mu$ P125NG respectivement, alors que les  $\mu$ P200NG donnent un angle de contact de 65 ° traduisant une surface bien plus hydrophile.

Afin de confirmer cette hypothèse, des bioanodes  $\mu$ P100NG sont formées dans les mêmes conditions que précédemment. En fin d'expérience, après avoir présenté des performances similaires en termes de densité de courant, les électrodes sont conservées dans du milieu de culture afin de ne pas laisser sécher la surface et le marquage est effectué au Syto 9 dans le milieu de culture. Les électrodes sont observées avec un objectif à immersion afin d'éviter le phénomène d'évaporation supposé. Les images obtenues, présentées dans la Figure 4, ne montrent aucun pont de biofilm entre les piliers dans le milieu liquide. Cela confirme l'hypothèse d'un artefact dû au protocole de marquage.

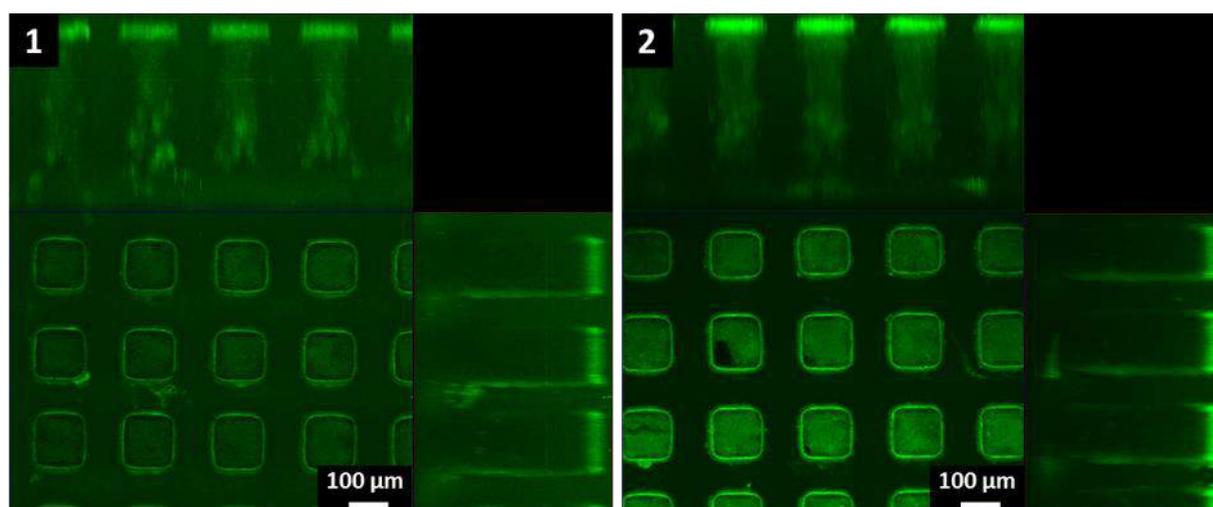


Figure 4 : Observation au microscope à épifluorescence de deux électrodes  $\mu$ P100NG en immersion dans du milieu de culture.

L'hypothèse initiale qui faisait espérer une augmentation de biomasse qui n'impacterait pas la conductivité du biofilm n'est donc pas retenue. Cependant, ce questionnement sur la formation de biofilm non déposé sur une surface n'est pas à oublier. En effet, cela pourrait constituer une optimisation intéressante en termes d'architecture du biofilm pour des études futures. La plupart des travaux actuels cherchent à produire des électrodes proposant des surfaces actives les plus importantes possibles sans augmenter l'encombrement mais elles se confrontent le plus souvent à des phénomènes de limitation au niveau de la croissance du biofilm. La conductivité du biofilm ou la diffusion des espèces chimiques en son sein deviennent rapidement des étapes limitantes. La possibilité de remplacer une surface pleine par exemple par une grille de maillage optimisé pourrait entraîner la formation de pans de biofilm

en dehors de la surface conductrice support mais reliée à elle. Si les conditions ainsi offertes de meilleure diffusion des espèces chimiques permettent de maintenir un biofilm fortement conducteur, la réduction de la surface active de l'électrode ne serait pas préjudiciable à la production de courant. Bien que n'ayant pas apporté de résultats dans ce sens, l'étude sur les micro-piliers a au moins apporté une réflexion sur ces phénomènes qui pourrait entraîner des optimisations futures. Les artefacts expérimentaux ont parfois l'avantage d'activer l'imagination.

#### 4. NOUVELLES INGENIERIES DE SURFACE POUR L'OBTENTION DE BIOANODES PERFORMANTES

Les électrodes testées jusqu'à présent ont permis un gain d'un facteur 9 pour les piliers ( $\mu$ PNG) et 17 pour les rugosités micrométriques (MG) par rapport à l'or lisse (SG) pour atteindre respectivement des densités de courant de 8,5 et 14,3 A/m<sup>2</sup>. C'est un bon début mais l'objectif technologique du projet Koropokkuru était d'atteindre le seuil des 100 A/m<sup>2</sup>. De nouvelles voies sont donc envisagées pour se rapprocher de cet objectif.

Jusqu'ici, les meilleures performances ont été obtenues sur les surfaces d'or MG-4 les plus rugueuses avec une densité maximale de courant à 14,3 A/m<sup>2</sup>. Ces surfaces créées par électrodéposition d'or sont à la frontière entre une surface rugueuse et une structure poreuse comme présenté dans la publication 3. Il a donc logiquement été envisagé de concevoir des électrodes poreuses à partir du même procédé en effectuant une électrodéposition plus importante. Des surfaces recouvertes d'une couche d'or poreux d'une centaine de micromètres d'épaisseur ont ainsi été obtenues et mises en œuvre pour former des bioanodes, toujours suivant le même protocole. Trois électrodes poreuses (PG) identiques et deux surfaces nano-rugueuses (NG) ont été inoculées avec *G. sulfurreducens* en parallèle, dans des réacteurs indépendants. La formation de bioanodes a présenté des limitations, notamment du fait du colmatage de la structure poreuse.

Une nouvelle conception a été tentée afin de s'affranchir de ce colmatage par le biofilm en utilisant le couplage de la structuration avec des micro-piliers et de la formation de rugosité micrométrique. Le réseau de pilier le plus lâche, c'est-à-dire avec un espacement de 200  $\mu$ m, a été utilisé car il présentait le moins de problème de diffusion et d'acidification. La rugosité, toujours créée suivant le même protocole d'électrodéposition n'est pas uniforme en présence des micro-piliers et il n'a pas été possible de reproduire la rugosité de 6,7  $\mu$ m qui s'était montrée la plus efficace dans l'étude précédente (Chapitre 4, section 4). Il a donc été décidé de tester différents courants d'électrodéposition et de former ainsi différentes rugosités. Quatre de ces électrodes ont été utilisées pour former des bioanodes avec *G. sulfurreducens*.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article intitulé « Micro-designed microbial anodes: porosity and pattern size vs. surface roughness » exposé ci-après.

## Micro-designed microbial anodes: porosity and pattern size vs. surface roughness

Pierre Champigneux <sup>a\*</sup>, Cyril Renault-Sentenac <sup>b</sup>, David Bourrier <sup>b</sup>, Carole Rossi <sup>b</sup>, Marie-Line Delia <sup>a</sup>, Alain Bergel <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Génie Chimique CNRS - Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes CNRS – Université de Toulouse, 7 avenue du colonel Roche, 31031 Toulouse, France*

*E-mail addresses:* pierre.champigneux@ensiacet.fr, alain.bergel@ensiacet.fr

*\*Corresponding author:* pierre.champigneux@ensiacet.fr, (+33) 5 34 32 36 27,

### Abstract

Electrocatalytic deposition of gold leads to a 100  $\mu\text{m}$  porous structure with pores of tens of microns. Such surfaces were used to form bioanodes with *Geobacter sulfurreducens* at a constant potential of 0.1 V/SCE in anaerobic reactors in order to study the first step of colonization of the porous structure. The porous electrodes reached current densities of up to 16  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , while flat gold electrodes produced 2  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ . The observed microbial colonization resulted in a dense, 20  $\mu\text{m}$  thick biofilm clogging the porous structure, which could thus be perceived as a 2D surface. This approach allowed us to retrieve and confirm the linear correlation observed in a previous study between the arithmetic mean height roughness parameter,  $S_a$ , and the current densities. In order to create anodes benefiting from both the increase in active surface area and the surface roughness effect, further electrodes were designed and tested in the same conditions. The combination of micro-pillar arrays having 200  $\mu\text{m}$  spacing with various surface roughnesses was used to simulate a larger porous structure with roughness. Such electrodes reached current densities between 6 and 8  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , well below the values expected on the basis of previous studies. Mathematical modelling showed that coupling these two surface features created a strong acidification inside the pillar network, thus limiting the electrocatalytic activity of the biofilm.

**Keywords :** Bioanode; porous gold; micro-pillar; *Geobacter sulfurreducens*; microbial fuel cell.

### 1. Introduction

Microbial electrochemical technologies (MET) rely on the ability of many bacteria to achieve extracellular electron transfer with electrodes [1]. Through the pioneering development of microbial fuel cells, these systems have given rise to many innovative ideas in various application domains, such as energy production [2-5], waste treatment [6–8], production of hydrogen and added-value chemicals [9–12], metal recovery [13,14], and environmental bioremediation [15,16]. While these approaches encompass a wide range of processes, in all of them, the interface between the electrode surface and the microbial biofilm is a decisive facet of their implementation.

One way to increase the current produced by microbial electrodes is to increase the electrode surface area offered for biofilm development. There are three possibilities for achieving this:

- i) creating roughness by some form of surface pattern on 2-dimensional electrodes [17–23],
- ii) using 3-dimensional porous electrodes [24], such as graphite felt [25–27] carbonized natural porous structures [28,29], or stainless steel foam [30],
- iii) manufacturing 3-dimensional architectures, e.g. carbon brushes [31] and multi-layered electrodes [32].

There is universal agreement that roughness, porosity and 3-dimensional architectures have an impact on the performance of microbial electrodes but the variety of systems studied and the variability of the results reported have not allowed clear trends to be extracted yet [23,27]. In this context, the capacity of micro-technologies to engineer well-controlled surface patterns at the nano- and micro-scales has allowed major progress because it is thus possible to control the surface topography perfectly while minimizing the changes of other surface properties [33–37].

Two previous studies, which implemented nano-/micro-engineered gold electrodes, have pointed out the major role played by surface roughness [23] and surface topography [38] on the formation phase of electroactive biofilms. Both investigated the early phase of formation of microbial anodes inoculated with *Geobacter sulfurreducens* under constant polarization.

One study [23] implemented electrodes with controlled micro-roughness obtained by gold electro-deposition. The current density produced by the bioanodes increased linearly with the micro-roughness in the range of  $S_a$  values from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$ . Current densities of up to 14.3  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  were produced, which were 4 times higher than that obtained with the basic nano-rough electrodes having  $S_a$  of 4.5 nm. The other, similar study [38] used gold surfaces patterned with 100- $\mu\text{m}$  wide and 500- $\mu\text{m}$  high pillar arrays, with different spacings. The surface of the micro-pillars was nano-rough, with  $S_a$  of 4.5 nm. Compared to flat gold surfaces with the same  $S_a$ , the presence of micro-pillars improved the current density by a factor of more than 3, boosting the average current density from 2.5 to 8.5  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ . This increase was attributed to the increase in the geometric surface area provided by the micro-pillars.

The purpose of the present study was to investigate two possible evolutions in the aim of improving on these previous results.

The first option consisted on increasing the amount of gold deposited to form a thick porous layer. The objective was to implement the technique used to create surface roughness on a 2-dimensional surface in order to create a thick 3-dimensional porous layer. Roughness was changed to porosity.

The second option consisted of combining the micro-pillar array with surface micro-roughness. In the previous study, the surface of the micro-pillars was nano-rough, with  $S_a = 4.5$  nm. The idea here was to engineer similar micro-pillars and then to roughen their surface by gold electrodeposition.

For the two options, the protocol was kept same as previously in order to obtain results that could be directly compared. Anodes were inoculated with *G. sulfurreducens*, fed with acetate 10 mM and continuously polarized at 0.1 V/SCE.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Electrode manufacturing

Nano-rough (NG): Si (100) P-type silicon wafers were used as the support. They were metallized by sputtering with Cu/Cr followed by smooth electrolytic deposition of gold. A thin gold layer 4.5 nm rough was thus created. Two nano-rough electrodes (NG-1 and NG-2) were obtained in this way, which served as control surfaces.

Porous gold (PG): The NG surfaces were used as the base to develop the porous gold structures by electrolytic deposition, which was carried out at a high rate using 5 A.m<sup>-2</sup> for 10 minutes. When the electrolytic deposition stopped, the porous structure was around 100 µm high (measured with a mechanical profilometer, TENCOR P16). Three similar electrodes (PG-1 to PG-3) were elaborated in this way.

Micro-pillar arrays with micro-rough surface (µP-MG): Surface micro-structuring was performed on Si (100) P-type silicon wafers with an epoxy resin (SU-8 3050, MicroChem Corp) patterned by photolithography to form the pillar array. The array consisted of square pillars 100 µm wide and 500 µm high, spaced 200 µm apart. The structured electrodes had 1156 pillars on a 1 cm<sup>2</sup> surface. A first metallization was performed by sputtering Cu/Cr and then smooth electrolytic deposition of gold to create a gold layer with a 4.5 nm roughness. Then the surface of the micro-pillars was roughened by electrolytic deposition of gold, which was performed for 10 minutes at three different current densities: two electrodes were roughened by electrodeposition at 0.8 A.m<sup>-2</sup> (µP-MG-1 and -2), one at 1.5 A.m<sup>-2</sup> (µP-MG-3) and another at 2.1 A.m<sup>-2</sup> (µP-MG-4).

### 2.2. Inoculum and medium

*Geobacter sulfurreducens* PCA strain was purchased from DSMZ (ATCC 51573). The growth medium (per litre: 0.1 g KCl, 1.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.82 g CH<sub>3</sub>COONa) was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 minutes and then complemented with 8 g/L sodium fumarate filtered at 0.22 µm, 10 mL/L Wolfe's vitamin solution (ATCC MD-VS) and 10 mL/L modified Wolfe's minerals (ATCC MD-TMS). Sterilized medium was deoxygenated and inoculated at 2% v/v with the commercial strain to obtain a *G. sulfurreducens* pre-culture with 0.4 absorbance at 620 nm after incubation for 3 days at 30 °C. Reactors were filled with 300 mL of complemented medium and deoxygenated for 20 minutes with N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20). Acetate at 10 mM was the sole electron donor and no fumarate was added. Reactors were then inoculated with the pre-culture to an inoculation ratio of 10% v/v. The ratio was adjusted on the basis of the measured absorbance to reach a similar cell density in all reactors.

### 2.3. Experimental set-up and electrochemical characterization

Tightly sealed 500 mL reactors were filled with 300 mL solution and continuously sparged with N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) to ensure anaerobic conditions during the whole experiment. The gas bubbling

was carefully arranged in order to avoid any disturbance on the working electrode. A water-bath kept the temperature steady at 30 °C.

The experiments were performed with 3-electrode set-ups in single compartment reactors. The auxiliary electrode was a platinum grid (Heraeus SAS, Germany) and a saturated calomel reference electrode was used as the reference (SCE, potential +0.24 V/SHE). The gold surfaces were mounted and welded on a PCB support and connected to the potentiostat. The bioanodes were formed under constant polarization at 0.1 V/SCE (VSP potentiostat, Bio-Logic SA, France) and the current densities were recorded throughout the experiment. Cyclic voltammeteries were performed before inoculation and when the current reached a maximum.

The current densities were determined with respect to the 1 cm<sup>2</sup> projected surface area of the anode. The chronoamperograms (current density vs. time) were characterized by three parameters: the maximum current density reached ( $J_{max}$ , A.m<sup>-2</sup>), the starting time ( $t_{start}$ , days), defined as the time required for the current to reach 10% of  $J_{max}$ , and the current density increase rate ( $r_i$ , A.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>), which was calculated as the average value of the slope of the current density vs. time over 1 day around the inflection point of the curve.

#### 2.4. Surface characterization and microscopic imaging

Before the experiments, the porous structures and the roughened pillar arrays were observed with a Hitachi S-4800 scanning electron microscope (SEM) in low vacuum mode at an accelerating voltage of 15 kV and an intensity of 15 μA. Various magnifications and locations were used to characterize the surfaces.

For the porous electrodes, several spatial area roughness parameters were determined by confocal imaging using a non-contact 3D optical profiler (S-Neox, Sensofar): arithmetic mean height ( $S_a$ ), root mean square height ( $S_q$ ), maximum height ( $S_z$ ), skewness ( $S_{sk}$ ) and kurtosis ( $S_{ku}$ ). Measurements were performed on 20% of each porous surface area. The electrolytic deposition process was very reproducible and the three porous electrodes showed similar parameters, so average values calculated on the three electrodes were used as the standard deviations were very small.

The electrochemically active surface area ( $A_e$ ) of the micro-pillar patterned electrodes was measured following a protocol derived from that described by Burke et al. [39]. Cyclic voltammetry was performed at 50 mV.s<sup>-1</sup>, with 25 cycles between 0 and 1.8 V/SCE in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. The charge consumed by the reduction of gold oxides, which was calculated by integrating the reduction peak between 0.8 and 0.9 V/SCE, led to  $A_e$  with the equation :

$$\text{Electrochemically active surface area (cm}^2\text{)} = \frac{\text{Charge transferred } (\mu\text{C})}{\text{conversion factor } (\mu\text{C.cm}^{-2})} \quad (1)$$

where the conversion factor was found to be 1053 μC.cm<sup>-2</sup> by a calibration performed on a 1 cm<sup>2</sup> nano-rough gold electrode (NG) with roughness of 4.5 nm. Performing this calculation is like taking the NG electrodes as the reference for the surface area.

Once the bioanodes had been formed and the current had returned to 0, the four electrodes: μP-MG, PG-2, PG-3 and NG-2 were stained with SYTO 9 at 2.5 μM (Invitrogen, Molecular Probes) for 10 min, then carefully washed with medium and dried at ambient temperature. The electrodes were imaged with a Carl Zeiss AxioImager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor

HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (Evolution VF). Several different spots were imaged in order to see the general pattern of the colonization.

The biofilm structures on PG-1 and NG-1 electrodes were observed by scanning electron microscopy (SEM) with a Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT. A 4% glutaraldehyde phosphate buffer (400 mM, pH 7.4) was used to fix the biofilms. The surfaces were then rinsed in phosphate buffer containing saccharose (400 mM). The dehydration process consisted of immersion in successive concentrations of acetone (50%, 70%, 100% solutions), followed by acetone and hexamethyldisilazane (HMDS) solution (50:50), and finally 100% hexamethyldisilazane. Complete evaporation of the last solution was achieved to complete the process. The samples were sputtered with a thin (10 nm) layer of gold (Scancoat Six SEM sputter coater) to guarantee their electrical conductivity for SEM imaging.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 From roughness to porosity: experimental results

The first method envisaged to increase the surface available for biofilm growth was to enhance the gold electrodeposition roughening protocol so as to transform the surface roughness into a thick porous layer. The electrodeposition current density was increased to  $5 \text{ A.m}^{-2}$  in order to obtain 100- $\mu\text{m}$  thick porous layers of gold. As expected, SEM imaging showed a porous structure uniformly deposited over the whole of the  $1 \text{ cm}^2$  surface area electrodes (Figure 1.A). The pore size ranged from a few microns to around  $50 \mu\text{m}$  (Figure 1.B). The largest pores were interconnected, creating a highly porous network. Increasing the magnification revealed fractal-like shapes on the surface below the micron scale (Figure 1.C and 1.D). This irregular surface created nano-scale roughness with interdigitated gold rods of tens of nanometres.

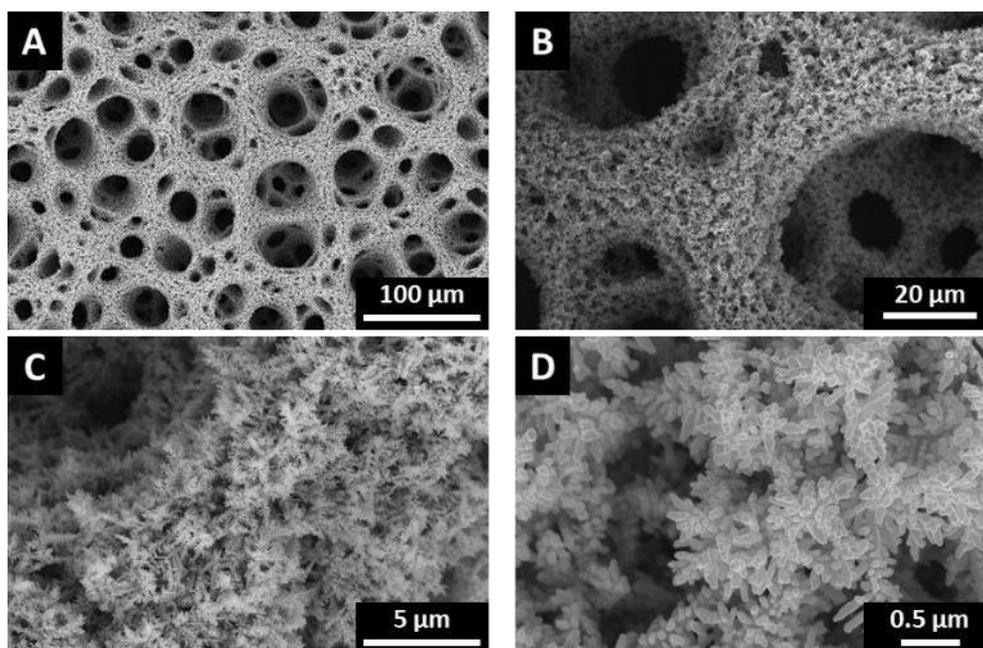
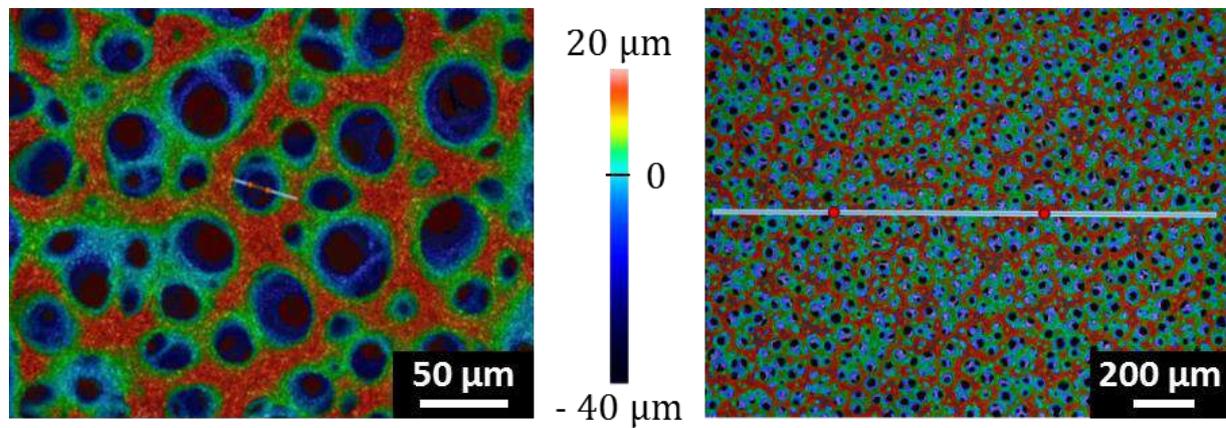


Figure 1 : SEM imaging of the porous structure of PG electrodes at different magnifications: (A) x500, (B) x2 000, (C) x10 000 and (D) x50 000.

The surfaces were characterized by 5 parameters measured by optical confocal imaging. The values are reported in Table 1 and compared to the values obtained on the initial nano-rough gold surfaces (NG) and on micro-rough gold surfaces (MG) elaborated in a previous study [23]. The previous micro-rough surfaces manufactured with low electrodeposition current densities were visually very different from the present surfaces. They showed more or less dense roughness patterns added on to the NG basal surface, while the present PG surfaces had deep holes. The previous MG surfaces could be considered as 2-dimensional rough surfaces while the PG surfaces manufactured here presented a deep porous layer with well-formed pores.

In spite of these clear visual differences, the topographical parameters were fairly similar for both surfaces (Table 1). The arithmetic mean height ( $S_a = 7.6 \mu\text{m}$ ), and root mean square height ( $S_q = 9.5 \mu\text{m}$ ) were only slightly increased for the PG surfaces. The maximum height ( $S_z = 59.3 \mu\text{m}$ ), which is the variation between the highest peaks and deepest cavities, was identical to that of MG surfaces. Actually, this may have been due to a limit of the measuring technique, which could not penetrate through the  $100 \mu\text{m}$  deposited layer.

*Table 1 : Surface characterization of the porous gold electrodes (PG). Five parameter values were determined from the confocal images illustrated in the top part: arithmetic mean height ( $S_a$ ), root mean square height ( $S_q$ ), maximum height ( $S_z$ ), skewness ( $S_{sk}$ ) and kurtosis ( $S_{ku}$ ). Values were averaged for the 3 PG surfaces. For comparison, values reported in a previous work [23] are indicated for nano-rough gold surfaces (NG) and micro-rough gold surfaces (MG). The MG surfaces were obtained by electrodeposition at  $2.08 \text{ A.m}^{-2}$ .*



	$S_a$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_q$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_z$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_{ku}$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_{sk}$ ( $\mu\text{m}$ )
NG (this work)	0.0045	0.0054	0.0212	3.1	-0.3
MG [23]	6.7	7.7	59.1	1.8	-0.4
PG (this work)	7.6	9.5	59.3	2.1	-0.7

The surface skewness  $S_{sk}$  indicates the predominance of peaks or valleys. A positive skewness expresses a prevalence of peaks, while a negative value indicates the prevalence of holes and valleys. Here, surfaces were clearly dominated by holes, because of the presence of pores, which resulted in a negative  $S_{sk}$  of  $-0.7 \mu\text{m}$ . The kurtosis ( $S_{ku}$ ) depicts the average sharpness of the surface. A surface with a kurtosis under 3 is to be interpreted as presenting rounded asperities, while angular features result in  $S_{ku}$  higher than 3. The  $S_{ku}$  of the porous electrodes was under 3, which was consistent with the curved edges observed on SEM imaging.

The porous gold electrodes (PG) were implemented in reactors inoculated with *Geobacter sulfurreducens* under polarization at 0.1 V/SCE. In parallel, two nano-rough gold electrodes (NG) were inoculated in the same conditions. The chronoamperograms showed fairly reproducible behaviour (Figure 2.A), except for the final phase (after 10 days) of one electrode. After 11 days, current density quickly fell to 0 for the PG-2 electrodes, whereas PG-1 and PG-3 maintained around  $4 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ . We may wonder whether some important perturbation occurred in the PG-2 reactor, causing the fall of current production. Cyclic voltammograms plotted at day 5, when the bioanodes were close to reaching maximum current production, confirmed great reproducibility of the three bioanodes (Figure 2.B).

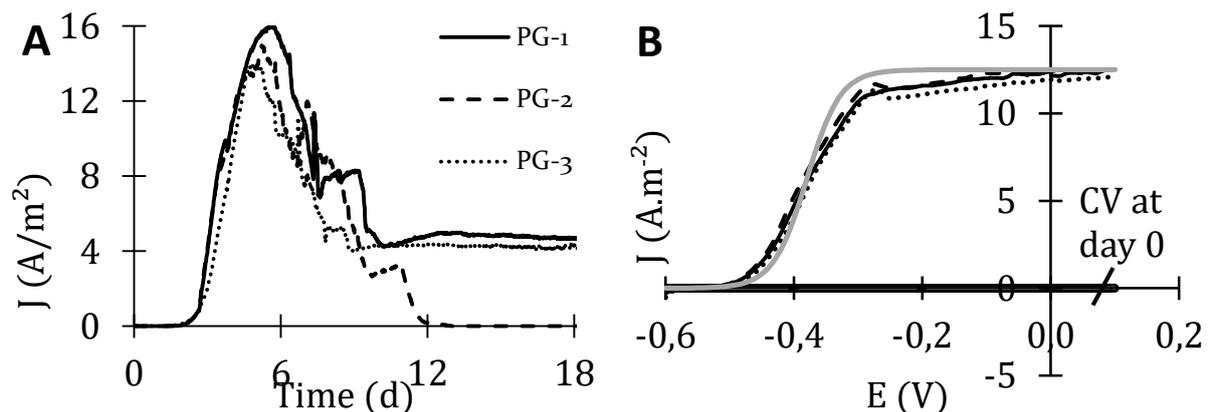


Figure 2: Chronoamperograms (A) and voltammograms (B) of the PG bioanodes formed with *G. sulfurreducens*. Cyclic voltammograms were initially performed at day 0 and again when the current production was established at day 5. The theoretical Nernst curve is added for comparison (grey line).

The chronoamperograms were characterized by the starting time ( $t_{\text{start}}$ ), current density increase rate ( $r_i$ ) and maximum current density ( $J_{\text{max}}$ ) reported in Table 2. The comparison with the bioanodes previously formed with micro-rough gold electrodes (MG) showed that the thick porous layer was not markedly more efficient than micro-roughness. The rates of current density increase were identical and the start-up times were longer for the porous electrodes. The maximum current densities were only slightly improved, from  $12.8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  on average for the MG electrodes to  $15 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  for the PG electrodes.

The reactors were stopped at day 18 to image the biofilms. PG-1 and NG-1 electrodes were observed via SEM and PG-2, PG-3 and NG-2 were imaged by epifluorescence microscopy.

The NG-2 bioanode showed a thin biofilm ( $< 10 \mu\text{m}$ ), only partially covering the electrode (Figure 3.E). The same type of partly covering biofilm and some isolated colonies in the non-covered areas was confirmed by the SEM images of NG-1.

Table 2: Electrochemical characteristics of nano-rough gold (NG) and porous gold (PG) bioanode formation.  $t_{start}$  is the time needed to reach 10% of  $J_{max}$ ,  $r_i$  is the current density increase rate over the inflection point,  $J_{max}$  is the maximum current density reached during the experiment. For comparison, the values obtained in identical conditions with micro-rough electrodes (MG) manufactured by electrodeposition at  $2.08 \text{ A.m}^{-2}$  are also reported.

	NG-1	NG-2	PG-1	PG-2	PG-3	MG-1	MG-2
	This work		This work			[23]	
$t_{start}$ (day)	2.4	2.9	2.7	2.7	2.8	1.5	1.8
$r_i$ ( $\text{A.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ )	1.8	1.4	7.6	7.9	7.3	7.6	7.0
$J_{max}$ ( $\text{A.m}^{-2}$ )	2.1	2.6	16.1	15.0	13.9	14.3	11.4

Epifluorescence microscopy of PG-2 and PG-3 bioanodes showed really different colonization. PG-2 was poorly colonized, with a thin, non-uniform biofilm mainly on the edges between the pores (Figure 3.A). In contrast, a dense, uniform biofilm was observed on PG-3, with a thickness of around 20-30  $\mu\text{m}$ . In some areas, the biofilm was punctured above the pores (Figure 3.B) but, in most spots, it completely covered the pores (Figure 3.C). This resulted in an almost uniform biofilm with a bumpy appearance as seen on the 3-dimensional reconstruction (Figure 3.D). SEM imaging of PG-1 confirmed that the biofilm covered the majority of the surface area with only some rare spots where unclogged pores appeared as for PG-3. The deficient colonization of PG-2 with respect to PG-1 and PG-3 was consistent with the absence of current production at the end of the experiments for this bioanode.

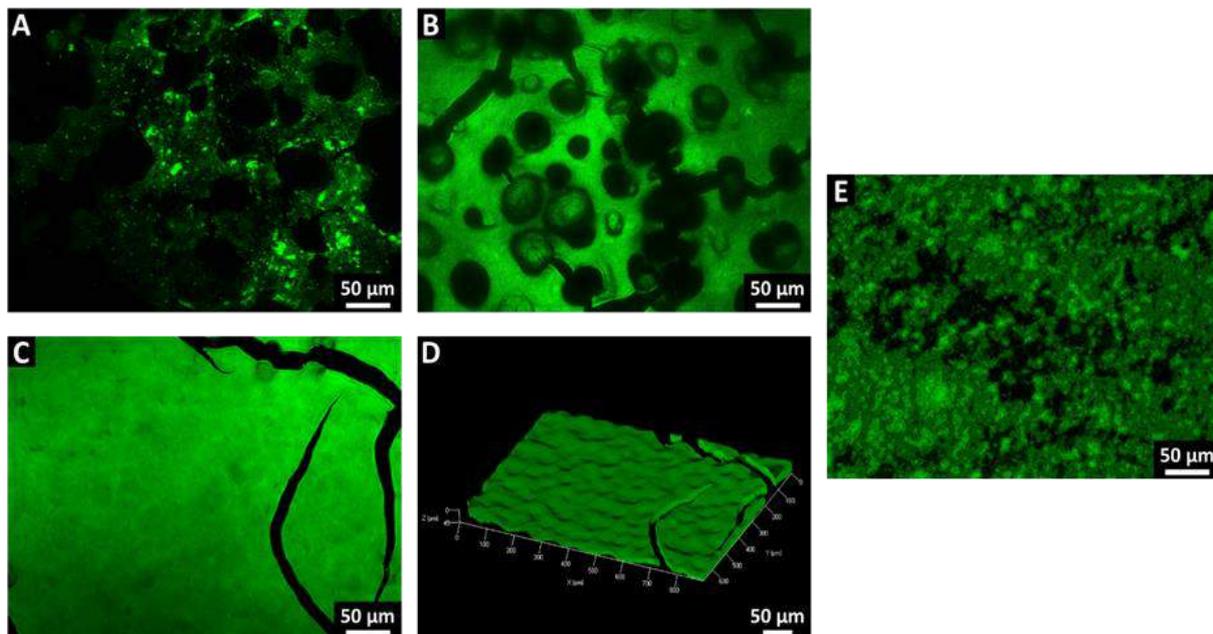


Figure 3: Epifluorescence imaging with SYTO 9 staining of (A and B) PG-2, (C) PG-3 and (E) NG-1. (D) 3D re-construction of the PG-3 bioanode.

SEM imaging of PG-1 also showed that the walls of the open pores were often lined with a continuous biofilm going as deep as could be observed (Figure 4.A). It may be feared that clogging may have been in progress in the still-open pores. During the drying process, in a few spots, a layer around 50  $\mu\text{m}$  thick of the porous deposited gold cracked and pulled away. This allowed observations of pores in depth, below the top surface. Hence, it was observed that the pores clogged by the 20- $\mu\text{m}$  thick biofilm over their opening had been deeply colonized, similarly to the unclogged pores (Figure 4.B). A biofilm around 5 to 10 cells thick was observed on most of the pore walls. This internal colonization of the pores could be observed as deep as the porous structure was cracked, i.e. around 50  $\mu\text{m}$ . Finally, when zooming in at the cell scale, we observed gold rods of tens of nanometres tightly interdigitated with *Geobacter* cells (Figure 4.C), which suggests that this small scale roughness was fully suitable for entrapping cells.

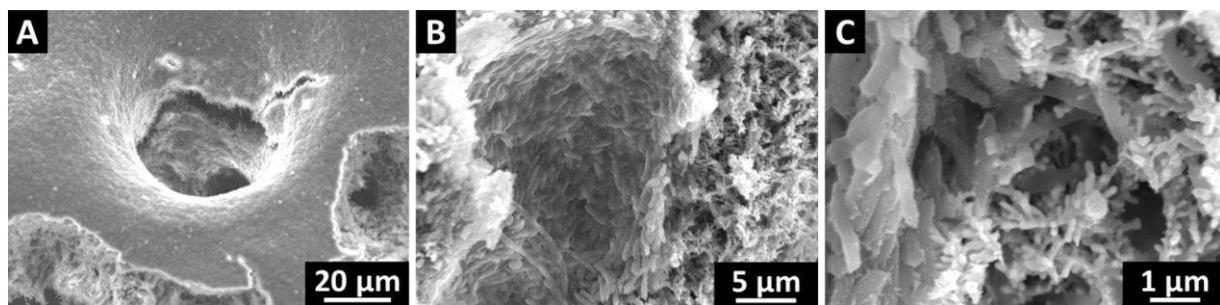


Figure 4: SEM imaging of the PG-1 bioanode at various magnifications. (A) top view of an unclogged and colonized pore, (B) side view inside a pore that was under a cracked layer, and (C) close up of *Geobacter sulfurreducens* cells entrapped in the gold surface.

### 3.2 From roughness to porosity: discussion

The gain offered by the porous layer in comparison to a nano-rough surface can be easily seen through the results collected in Table 2. The nano-rough electrodes provided maximum current densities of 2.1 and 2.6  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , consistently with previous studies performed on the same electrodes and resulting in an average maximum current density of 2.5  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  [38]. Here the 100- $\mu\text{m}$  thick porous layer resulted in multiplication by a factor of around 7, with maximum current densities from 13.9 to 16.1  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ . The rates of current density increase were also higher (multiplied by a factor of around 4).

Unfortunately, comparison with 2-dimensional micro-rough electrodes was not as strongly to the advantage of porous electrodes. In this case, the current density increase rates were identical and maximum current densities were only slightly improved on average, from 12.8  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  for MG bioanodes to 15  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  for PG bioanodes. The spatial arithmetic mean height ( $S_a$ ) was 6.7  $\mu\text{m}$  for the previous micro-rough electrodes and 7.6  $\mu\text{m}$ , here, for the porous electrodes (Table 1). In the previous study, the 2-dimensional micro-rough electrodes showed a linear relationship between  $J_{\text{max}}$  and  $S_a$  for  $S_a$  values ranging from 0.5 to 6.7  $\mu\text{m}$  [38]. Figure 5 shows that the results obtained here matched this relationship perfectly. Actually, the 100- $\mu\text{m}$  thick porous structure elaborated here behaved like a 2-dimensional micro-rough surface. Furthermore, this conclusion is consistent with pore clogging, which was observed on most of the electrode surface area.

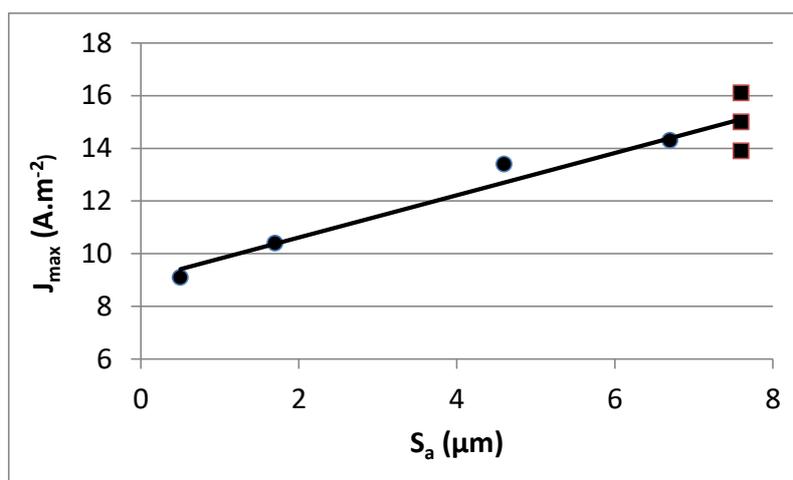
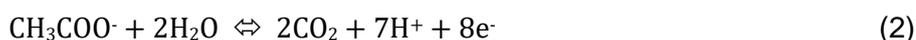


Figure 5:  $J_{\text{max}}$  vs.  $S_a$  of (circles) 2-dimensional micro-rough electrodes (from [38]) and (squares) porous electrodes (this work).

Finally, a promising observation should be highlighted. A thin biofilm was always observed colonizing the pore walls, as deep as the microscopy technique allowed us to observe (Figures 4.B and 4.C). Even under a 50- $\mu\text{m}$  thick porous layer that had flaked off, significant bacterial colonization was still observed. The gold deposit made here was consequently highly suitable for bacterial colonization, leading to tight interdigitation between gold structures and cells (Figures 4.C).

The current density of up to 16  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  and the CV kinetics also evidenced the capacity of this surface to ensure efficient electron transfer with *Geobacter sulfurreducens* cells. It should be noted that the equilibrium potential of acetate oxidation to carbon dioxide:



expressed as:

$$E_A = E_{A1}^0 - \frac{2.3RT}{8F} 7\text{pH} + \frac{2.3RT}{8F} \log\left(\frac{P_{\text{CO}_2}^2}{C_{\text{acetate}}}\right) \quad (3)$$

where  $E_A$  is the equilibrium potential (V/SHE),  $E_A^0$  is the standard potential (0.071 V/SHE),  $p_{\text{CO}_2}$  is the  $\text{CO}_2$  partial pressure (0.2 atm), which was assumed to be equal to the fugacity,  $C_{\text{acetate}}$  is the acetate concentration (0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), which is assumed to be equal to activity,  $R$  is the universal gas constant (8.314  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T$  is the temperature (303 K), and  $F$  (96 485  $\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) is the Faraday constant.

The  $E_A$  had a value of -0.29 V/ESH, i.e. -0.53 V/SCE here. This means that, on the CV curves, production of current started very close to the equilibrium potential (Figure 2.B). Moreover, the CV curves were close to the theoretical Nernst-Michaelis-Menten kinetics plotted in Figure 2.B [40,41]:

$$J = J_{\text{max}} \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{F}{RT} (E - E_K)\right)} \quad (4)$$

where  $E$  is the applied potential (V) and  $E_K$  is the value of the potential, extracted from the experimental curves, at which  $J = J_{max}/2$ .

The facts that the starting potential was close to the equilibrium potential and that the kinetics was close to Nernstian behaviour both indicated an excellent capacity of the gold-deposited surface to form bioanodes. Unfortunately, the suitability of the gold deposit for both bacterial colonization and electron transfer was somewhat moderated in the PG electrodes by the development of the upper covering biofilm that clogged porosity and precluded exploitation of the internal structure.

### 3.3 Micro-pillar array with roughened surface: experimental results

One way to avoid clogging of a porous structure by an upper covering biofilm was to design larger pores or a structure with more space between protuberances. To this end, we re-used the micro-pillar arrays implemented in [38], with a pillar spacing of 200  $\mu\text{m}$ . The walls were roughened by gold electrodeposition at 3 different current densities (Table 3).

The rough surface structure was not uniform along the micro-pillars (Figure 6). The top parts of the pillars were very notably roughened, whereas the bases presented low gold deposition. It was not possible to determine roughness parameters on such a structure and the surface characterization consequently consisted of an extended visual description based on SEM imaging (Table 3). At the bottom of  $\mu\text{P-MG-1}$  and 2, the surface was slightly modified, with roughness evaluated visually at under 1  $\mu\text{m}$ , whereas on  $\mu\text{P-MG-3}$  and 4, the bottom roughness was greater, reaching a few micrometres, but did not present any three-dimensional organization. Going up along the pillars, the roughness increased to reach a maximum on the top.

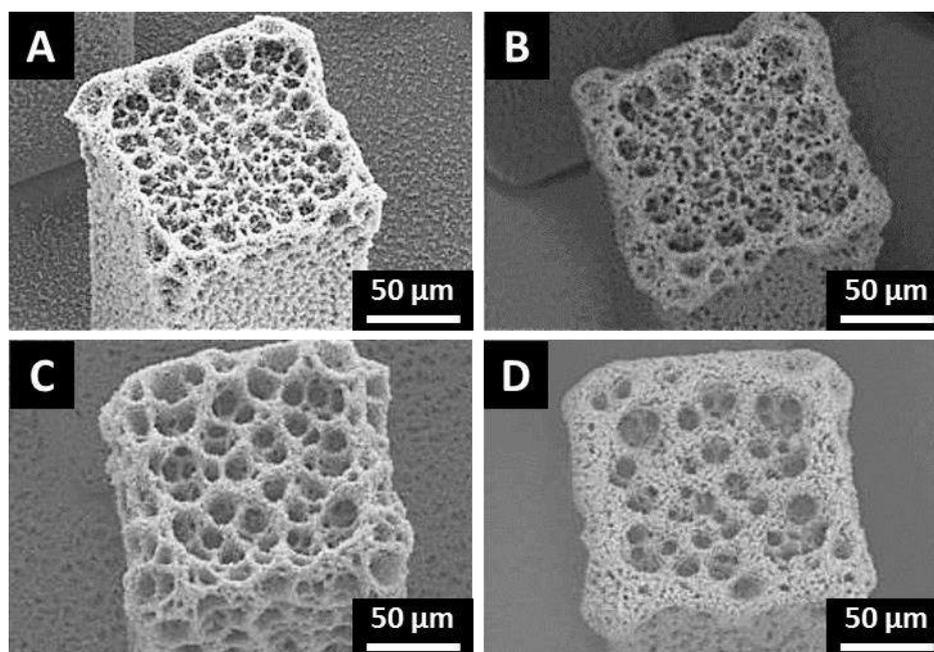


Figure 6 : SEM imaging of the top part of a micro-pillar for  $\mu\text{P-MG-1}$  to 4 electrodes (respectively A to D).

The deposit was thickest on the top edges of the pillars and three different deposition patterns could be distinguished. On the  $\mu$ P-MG-1 and 2 electrodes, obtained with the lower electrodeposition current densities, the deposit presented a thickness of under 10  $\mu$ m (Figure 6.A and B). The initiation of a porous structure could be guessed but remained low and mainly composed of 10- $\mu$ m wide cavities. In contrast, the  $\mu$ P-MG-3 electrodes, roughened at higher current density, showed a 20- to 30- $\mu$ m thick deposit consisting of a loose porous structure with pore size around 10  $\mu$ m (Figure 6.C). This micro-porous surface extended 50 to 100  $\mu$ m down the pillars, decreasing gradually. The  $\mu$ P-MG-4 electrodes, treated at the highest current density, displayed surface morphology similar to that of  $\mu$ P-MG-3 but with a tighter porous structure (Figure 6.D). The total deposit height was similar but the pore size and the void degree were clearly smaller.

The electrochemically active surface area ( $A_e$ ) of each electrode was measured electrochemically (Table 3). Consistently with the SEM images, the loose porous structure of the  $\mu$ P-MG-3 electrode resulted in the highest active surface area, of 98  $\text{cm}^2$ . The active surface area was slightly lower for  $\mu$ P-MG-4 (89  $\text{cm}^2$ ), which is consistent with the tight porosity observed by SEM. The  $\mu$ P-MG-1 and 2 electrodes gave a fairly reproducible  $A_e$  of 48 and 53  $\text{cm}^2$ , respectively. In comparison, the same micro-pillar networks, when implemented with a nano-rough surface of 4.5 nm in a previous work [38], resulted in considerably lower  $A_e$  of 3.26  $\text{cm}^2$ . The roughening technique used here ensured a 15 to 30-fold increase of  $A_e$ .

*Table 3 : Surface roughening by gold electrodeposition. The characteristics of the roughened  $\mu$ PG-MG electrodes were obtained in the present work. The characteristics of flat electrodes that were roughened by the same protocol are also given for comparison. The bottom roughness was evaluated visually from SEM imaging, and pillar description is also based on SEM imaging. The electrochemically active surface area is given for electrodes of 1  $\text{cm}^2$  projected surface area.*

	Gold deposition current density ( $\text{A.m}^{-2}$ )	Electrochemically active surface area ( $A_e$ ) ( $\text{cm}^2$ )	Bottom roughness ( $\mu\text{m}$ )	Top of micro-pillar Surface description
$\mu$ P-MG-1	0.8	48	1	5 - 10 $\mu\text{m}$ cavities
$\mu$ P-MG-2	0.8	53	1	5 - 10 $\mu\text{m}$ cavities
$\mu$ P-MG-3	1.5	98	3 - 4	Loose porous structure: 30 $\mu\text{m}$ thick with 10 $\mu\text{m}$ pores
$\mu$ P-MG-4	2.1	89	3 - 4	Tight porous structure: 30 $\mu\text{m}$ thick with 5 $\mu\text{m}$ pores
Flat-MG-2	0.69	18.2		Reported in [23]
Flat-MG-3	1.39	36.8		Reported in [23]
Flat-MG-4	2.08	40.7		Reported in [23]

The four  $\mu$ PG-MG electrodes were inoculated with the same *Geobacter sulfurreducens* pre-culture in independent reactors. The four electrodes exhibited similar chronoamperograms (Figure 7). It was necessary to use the three characteristic parameters (defined in section 2.3): starting time ( $t_{start}$ , days), current density increase rate ( $r_i$ ,  $A.m^{-2}.d^{-1}$ ), and maximum current density ( $J_{max}$ ,  $A.m^{-2}$ ) to detect slight differences (Table 4).

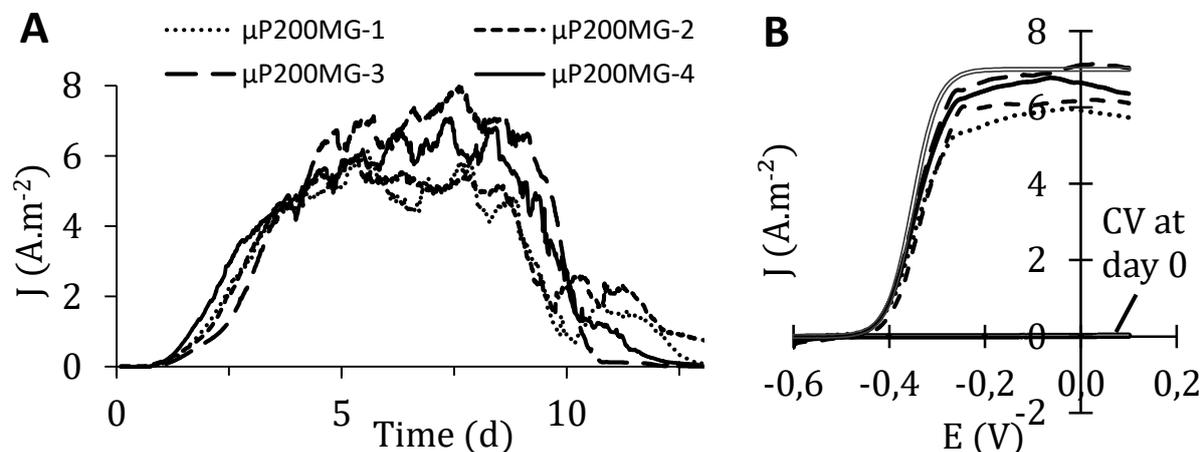


Figure 7 : Chronoamperograms (A) and voltammograms (B) of the  $\mu$ PG-MG bioanodes formed with *G. sulfurreducens*. Cyclic voltammograms were performed initially at day 0 (curve confused with the X-axis) and when the current production was well established, at day 7. The theoretical Nernst curve has been added for comparison (grey double line).

Looking at the characteristic parameters of the chronoamperograms confirmed the fair reproducibility of the  $\mu$ PG-MG-1 and -2 electrodes. The starting times were identical for the four electrodes. The  $r_i$  and  $J_{max}$  parameters were slightly higher for  $\mu$ P-MG-4 and highest for  $\mu$ PG-MG-3. This may confirm that the thicker and looser porous structure observed on the  $\mu$ PG-MG-3 surface was the most suitable for the development of electroactive biofilm.

Table 4: Electrochemical characteristics of  $\mu$ PG-MG bioanode formation.  $t_{start}$  is the time needed to reach 10% of  $J_{max}$ ,  $r_i$  is the current density increase rate over the inflection point,  $J_{max}$  is the maximum current density reached during the experiment.

	$t_{start}$ (day)	$r_i$ ( $A.m^{-2}.d^{-1}$ )	$J_{max}$ ( $A.m^{-2}$ )	Reference
$\mu$ P-MG-1	0.9	1.4	6.1	This work
$\mu$ P-MG-2	0.9	1.4	5.9	This work
$\mu$ P-MG-3	1	2.1	7.9	This work
$\mu$ P-MG-4	0.9	1.9	7.3	This work
$\mu$ P-NG-1	1.1	-	6.3	[38]
$\mu$ P-NG-2	1.2	-	5.9	[38]

Cyclic voltammeteries recorded at day 7, when the electrodes were not far from producing the maximum current density, confirmed the fair reproducibility of the electrochemical characteristics (Figure 7.B).

The  $\mu$ PG-MG bioanodes produced maximum current densities of between 5.9 to 7.9  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ . The highest value was obtained with the  $\mu$ P-MG-3 as could be guessed by considering the loose porous structure on the top of the micro-pillars (Figure 6). Nevertheless, pretty similar chronoamperograms were recorded with the four  $\mu$ PG-MG electrodes (Figure 7.A), while their electrochemically active surface area varied by a factor of two (Table 3). The current produced by the bioanodes was thus slightly impacted by the electrochemically active surface area.

At the end of the experiments, electrode colonization was characterized by epifluorescence microscopy (Figure 8). For all the bioanodes, the bottom of the electrode structure displayed faint fluorescence, indicating a thin biofilm. In contrast, the top of the pillars looked well colonized by a thicker biofilm. On the  $\mu$ P-MG-1 and -2 electrodes, the colonization on top of the pillars was uniform with a fully covering biofilm (Figure 8.A). On  $\mu$ P-MG-3 and -4, the biofilm did not clog the pores and had penetrated the porous structure, at least for a few micrometres, but it was not possible to see deeper into the porous structures. The microscopic observation revealed a clear difference in biofilm formation: well-formed biofilms on the top and poor colonization at the bottom.

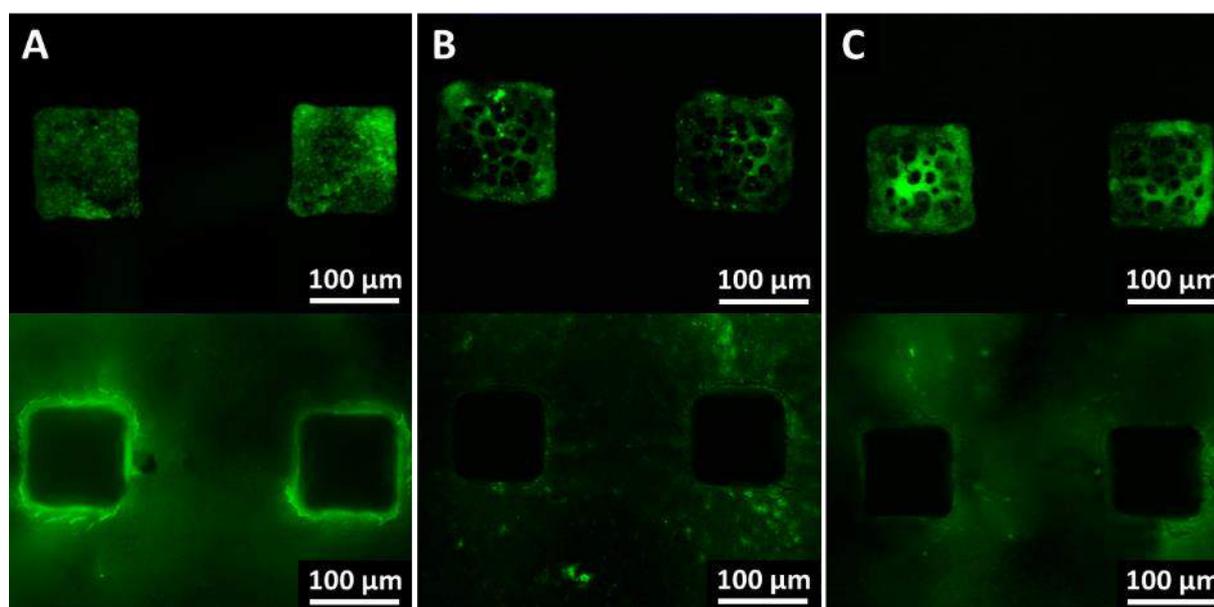


Figure 8: Epifluorescence imaging with SYTO 9 staining of the biofilms formed on (A)  $\mu$ P-MG-1, (B)  $\mu$ P-MG-3 and (C)  $\mu$ P-MG-4. Top views were focused on the top of the micro-pillars and bottom views on the base of the electrode structure.

### 3.4 Micro-pillar array with roughened surface: discussion

A previous work [38] dealt with similar micro-pillar array electrodes, with identical pillar architecture, but the pillar surface had very low roughness, at the nanometre scale ( $R_a = 4.5$  nm). With the same pillar spacing of 200  $\mu\text{m}$  as used here, the nano-rough micro-pillar arrays produced current densities of 5.9 and 6.3  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$  related to the projected surface area.

For an electrode of 1 cm<sup>2</sup> projected surface area, the geometric surface area of the nano-rough micro-pillar arrays was 3.26 cm<sup>2</sup>. Here, roughening increased the active surface area by a factor of 14 to 30 (48 to 98 cm<sup>2</sup>) but led to similar current density values with, at most, a very modest 1.3-fold gain.

Another, previous study implemented the same gold electrodeposition roughening protocol as used here but on flat surfaces [23]. On flat surfaces, gold electrodeposition performed with similar current densities as used here increased the electrochemically active surface area ( $A_e$ ) by factors of 18 to 40 (Table 3). These roughened flat surfaces produced around 9 times more current than the initial nano-rough surface [23]. Here, the same roughening protocol applied to micro-pillar arrays led to a similar increase of the  $A_e$  value, but to a maximum current increase of 1.3-fold with respect to the initial nano-rough micro-pillar arrays.

As discussed in the previous study, the electrochemically active surface area considerably overestimates the actual surface area available for biofilm growth [23]. Nevertheless, as in the previous studies performed on flat electrodes, SEM images obtained here showed that roughening created cavities around 5 to 10 μm in size, which should be fully appropriate for bacterial colonization, and bacterial colonization was observed inside the porous structure. It was consequently unsuspected that such efficient roughening of the micro-pillar array surface should lead to so modest gain in terms of current density.

Observation of the biofilm structure suggested an explanation. The biofilms appeared well-developed on the top of the micro-pillars, while the bottom was poorly colonized. It can consequently be assumed that the current was mainly produced by the fully developed biofilm on top of the micro-pillars (Figure 8), where roughening had been the most efficient and resulted in a rough and porous surface (Figure 6). Only the top part of the micro-pillar array was efficient.

An elementary quantification supports this hypothesis. Considering an electrode of 1 cm<sup>2</sup> projected surface area. The micro-pillar array results in a geometric surface area of 3.26 cm<sup>2</sup>. It has been reported that the roughening protocol used here can lead to a current density of the order of 14 A.m<sup>-2</sup> on flat electrodes [23]. Here, the highest current density recorded on roughened micro-pillars was of the order of 8 A.m<sup>-2</sup> (Table 4). Assuming that the surface of the roughened micro-pillars produces the same current density as the roughened flat surface, 0.57 cm<sup>2</sup> of micro-pillar surface area would be sufficient to obtain 8 A.m<sup>-2</sup> on a 1 cm<sup>2</sup> projected surface area. This means that only 17.5% of the surface area of the micro-pillar array working at 14 A.m<sup>-2</sup> would be sufficient to produce 8 A.m<sup>-2</sup>. This surface ratio corresponds to the top of the micro-pillars and 67 μm of their upper sides. Only the upper part of the micro-pillar array was working.

This hypothesis is reinforced by the theoretical approach developed previously [38], showing strong mass transfer limitation of acetate and of the buffer species HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> inside a pillar array. Acetate oxidation causes acidification in the vicinity of the bioanode surface (Reaction 2), which has been shown to be heavily detrimental to electroactive biofilms [42–44]. According to the equations developed previously, the modified Damköhler number ( $Da_{mod}$ ) relative to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is:

$$Da_{mod} = \frac{J_{loc} \delta}{nF D C^0} \quad (4)$$

where  $J_{loc}$  ( $A.m^{-2}$ ) is the local current density, i.e. the current density expressed with respect to the geometric surface area of the pillars,  $\delta$  ( $500 \cdot 10^{-6}$  m) is the micro-pillar height,  $n$  is the number of electrons produced per molecule of  $HCO_3^-$  consumed, and  $F$  ( $96\,485$  C.mol $^{-1}$ ) is the Faraday constant,  $D$  ( $1.18 \cdot 10^{-9}$  m $^2.s^{-1}$  [45]) is the diffusion coefficient of  $HCO_3^-$ , and  $C^0$  (mol.m $^{-3}$ ) is the concentration at the top of the micro-pillar array.

The value of  $n$  was taken as 8/7 because, for 8 electrons produced, 7 moles of  $HCO_3^-$  are consumed to neutralize the 7 protons produced (Reaction 2). The concentration of  $HCO_3^-$  was 29.6 mM in the bulk of the solution and  $C^0$  was calculated by assuming a diffusion layer of 100  $\mu$ m above the top of the micro-pillar array (Figure 4), which is a common value for an electrochemical process in quiescent solution.  $Da_{mod}$  expresses the rate of consumption by the electrochemical reaction with respect to the maximum diffusion rate along the micro-pillar. It must be corrected by a geometric ratio ( $\zeta$ ):

$$\zeta = \frac{l_a \delta}{S} \quad (5)$$

where  $l_a$  (m) is the electrochemically active length in the section of the elementary unit and  $S$  (m $^2$ ) is the section of the elementary unit that is free for diffusion (Figure 9).  $\zeta$  expresses the overall electrochemically active area in the elementary unit with respect to the section available for diffusion

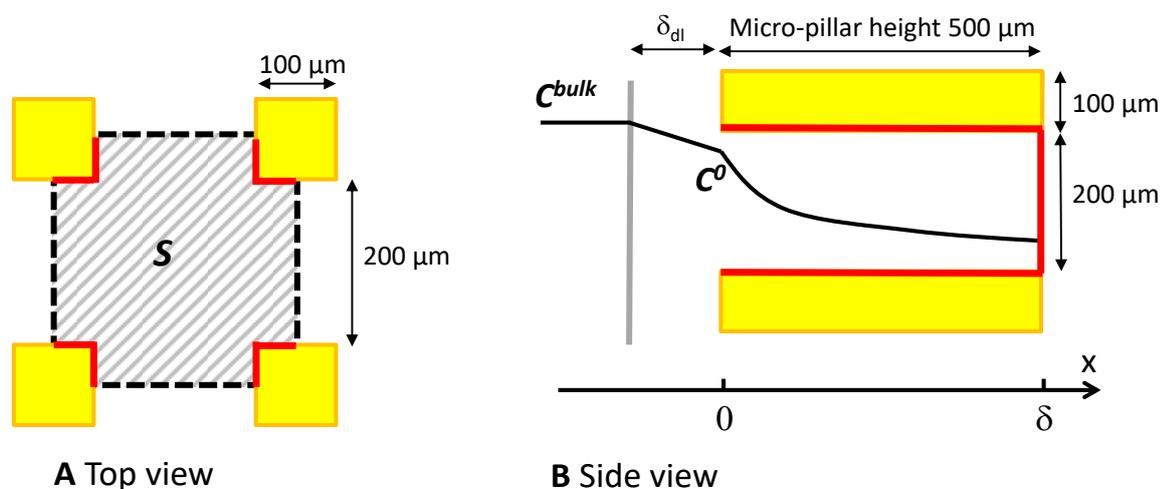


Figure 9: Scheme of an elementary unit of a micro-pillar array. On the top view,  $S$  is the section free for diffusion; on the side view,  $\delta_{dl}$  is the diffusion layer above the micro-pillar array and the concentration profile of a species consumed by the electrochemical reaction is schematized.

Assuming that the surface of the roughened micro-pillars can produce the same current density as the roughened flat surface gives  $J_{loc} = 14$  A.m $^{-2}$ . In this condition,  $Da_{mod}$  is equal to 2.3 and the  $\zeta Da_{mod}$  product to 5.7, showing that the rate of consumption by the electrochemical reaction is considerably higher than the maximum diffusion rate of the buffering species. With this theoretical approach, the  $HCO_3^-$  concentration and the pH profiles along the micro-pillars can be calculated (Figure 10, continuous lines). The model predicts that  $HCO_3^-$  is consumed very early in the upper part of the micro-pillar structure, so the pH sinks to very low values. The order of magnitude of the penetration depth of  $HCO_3^-$  is around 60  $\mu$ m. This value is fully

consistent with the elementary calculation made above, which indicated that 67  $\mu\text{m}$  of pillar height was sufficient to ensure the current density of  $8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ .

For comparison, the same calculation is reported (Figure 10, dashed lines) for nano-rough micro-pillars that produced  $6.1 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  with  $J_{\text{loc}}$  of  $1.87 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  in the previous work [38]. In this case, the diffusion of  $\text{HCO}_3^-$  along the micro-pillar also showed significant limitation, but it reached the bottom of the structure. This confirmed that the fall of  $\text{HCO}_3^-$  concentration in the upper part of the micro-pillar structure was due to the increase of the local reaction rate ( $J_{\text{loc}}$ ) because of the roughened structure.

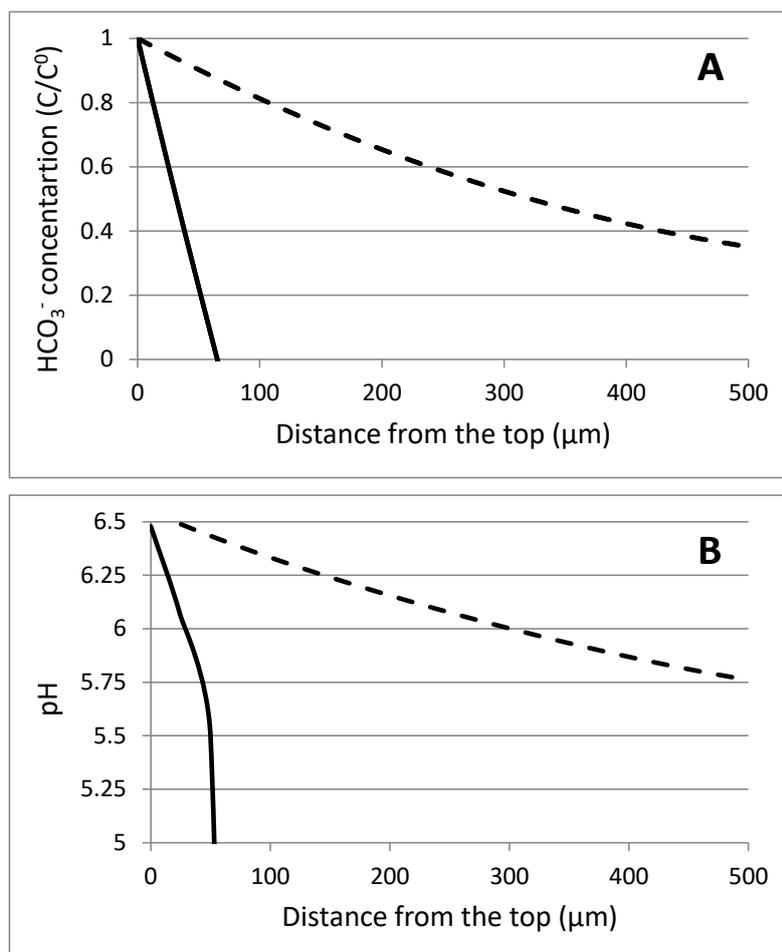


Figure 10. Theoretical (A)  $\text{HCO}_3^-$  concentration and (B) pH profiles along the micro-pillars. Continuous lines are for roughened micro-pillars producing  $8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  with  $J_{\text{loc}}$  of  $14 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  (this work); dashed lines are for non-roughened micro-pillars producing  $6.1 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  with  $J_{\text{loc}}$  of  $1.87 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  [38].

The observation of the differentiated development of the biofilm at the top and bottom of the micro-pillar structure, the comparison with the current density produced by flat surfaces roughened with the same protocol and, finally, the theoretical modelling of  $\text{HCO}_3^-$  diffusion, all converge to show that roughening of the micro-pillars results in high efficiency of the upper part of the structure, which exacerbates the mass transfer limitation in the lower part. The roughened micro-pillars were so efficient that only a small part of the surface worked, at the upper part. The higher efficiency of their roughened surface precluded the full exploitation of the large surface area of the micro-pillars.

## 4 Conclusion

The electrodeposition technique used here succeeded in producing gold deposits favouring tight bacterial colonization and ensuring efficient electron transfer with electroactive cells. The porous layers manufactured in this way produced current densities of up to  $16.1 \text{ A.m}^{-2}$  ( $15.0 \text{ A.m}^{-2}$  on average on 3 electrodes). Nevertheless, the porous structure was far from being fully exploited because of the formation of a covering biofilm on the upper surface that clogged the porosity. As a major message, it should be kept in mind that pores several tens of micrometres in diameter were quickly clogged by the biofilm.

A similar result has already been suggested in the literature by Kipf et al. (2014), who observed that *Geobacter sulfurreducens* unexpectedly gave similar performance on activated carbon and graphite felt [46]. The thick biofilm formed was suggested to be an element of the explanation. Similarly, microbial anodes formed on 2-dimensional carbon cloth have been shown to perform as efficiently as those formed on porous felt, because the biofilm formed on the upper side of the carbon felt clogged the porosity of the felt electrode [27]. In this case, the operating conditions were very different, microbial anodes were formed in wastewater, fed with food waste and inoculated with biological sludge. The present study confirmed that, even in well-controlled pure culture conditions, electroactive biofilms can clog pores several tens of micrometres in diameter quite fast during their formation phase.

With respect to the basic nano-rough electrode, current density was multiplied by a factor greater than 7 when the porous layer was used. The porous structure greatly improved the current density. This improvement was directly linked to the increase in surface roughness. Porosity acted as an increase of surface roughness, i.e. through the 2-dimensional effect it induced on the upper surface, rather than through a 3-dimensional effect. This is a major conclusion that should be kept in mind to possibly re-interpret the impact of porosity on microbial anode performance. Actually, some current increases that have been roughly attributed to the effect of porosity in the literature so far may have been due to the impact of the porosity on the upper surface roughness.

Protuberant micro-structures have been shown to improve the performance of microbial anodes, mainly by increasing the surface area available for biofilm growth. Gold cross-shaped micro-pillars  $40 \mu\text{m}$  wide and  $8 \mu\text{m}$  high have been shown to increase the current produced by *S. cerevisiae* 4.9 fold because they expanded the surface area to volume ratio by 4.5 [33]. The presence of  $20 \mu\text{m}$  high and  $20 \mu\text{m}$  diameter cylindrical micro-pillar arrays improved the current produced by *S. marcescens* 1.5 times [36]. In our previous study,  $100 \mu\text{m}$  wide and  $500 \mu\text{m}$  high micro-pillar patterning led to current densities being improved by factors of up to 8, related to higher surface area [38].

Here, it was decided to use the same micro-pillar arrays as previously investigated, with the objective of improving the performance by roughening the pillar surfaces. The largest spacing of  $200 \mu\text{m}$  was used in order to avoid the biofilm clogging that was observed with the porous structure. The effect of roughening was not as impressive as expected. Current density values were similar to those obtained without roughening with, at best, a very modest 1.3-fold gain. The theoretical approach indicated that local current improvement was probably effective but the local high current density produced at the top of the micro-pillars exacerbated the mass transfer limitation. Mass transfer of the buffering species was no longer able to mitigate the acidification at the bottom of the micro-pillar array. The upper part of the roughened micro-

pillars was too efficient and precluded functioning of the bottom part. The theoretical approach indicated that, with the roughened surface, micro-pillars of around 50- $\mu\text{m}$  height would be sufficient. This issue points out, once again, the crucial importance of interfacial acidification [42–44] and the importance of ion transport to mitigate it [47].

The micro-design of the interface may be improved by spacing the micro-pillars farther apart. Nevertheless, in this case, the surface area of the interface will decrease. An optimum should exist between opening the micro-structure to enhance mass transfers and decreasing the interfacial surface area. Obviously, the best ways to improve the interfacial performance would be to find acidophilic electroactive strains, but they remain rare and not really efficient [48], and to increase the concentration of the buffer species while acclimating electroactive species to high buffer concentrations. To the best of our knowledge, these research directions have been little investigated so far, even though, here, they appeared to provide major ways of exploiting the possible great improvement that interface micro-designing could bring.

It seems quite easy to find efficient surfaces that favour both biofilm development and fast electron transfer [41] but, in the current state of the art, micro-designing an optimum electrode/biofilm interface with these surfaces is heavily constrained by the sensitivity of electroactive microorganisms to pH below neutrality. It is thus difficult to engineer the right topography in order to both increase the local surface area and avoid local acidification. In the current state of knowledge of electroactive biofilms, it seems that macro-designs, at the millimetre scale, may be the right scale for engineering optimum electrode architectures. Actually, the highest current density reported so far with microbial anodes, of 390  $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , supports this assumption. This record was reached with carbonized corrugated cardboard with flute layer heights of 1.4 to 3.2 mm [32].

### **Closing remarks**

Do porous structures improve microbial anode performance through porosity or through their impact on surface roughness? What is the right pattern size to develop optimal electroactive biofilms? This study has put forward non-current opinions about these two major issues. According to the results presented here, any future experimental work dealing with the increase of current density of microbial electrodes should now consider the possible impact of surface roughness first, before concluding on the effect of other parameters such as porosity or accelerated electron transfers.

### **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 Koropokkuru (ANR-14-CE05-0004).

The authors would like to acknowledge Luc Etcheverry, Frédéric Dacosta, Jean-Pierre Escafit and Vincent Loisel (Laboratoire de Génie Chimique) for their help in designing and setting up the reactors. Marie-Line De Solan and Benjamin Erable (Laboratoire de Génie Chimique) are gratefully acknowledged for their implication in the SEM and fluorescence imaging acquisition, and Vincent Baylac (CIRIMAT- NNC OVM RTS) for his great help with the topographical analysis.

## Declaration of interest

None.

## References

- [1] A. Kumar, L.H.-H. Hsu, P. Kavanagh, F. Barrière, P.N.L. Lens, L. Lapinsonnière, J.H. Lienhard V, U. Schröder, X. Jiang, D. Leech, The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions, *Nat. Rev. Chem.* 1 (2017) 0024. doi:10.1038/s41570-017-0024.
- [2] B.E. Logan, M.J. Wallack, K.-Y. Kim, W. He, Y. Feng, P.E. Saikaly, Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (2015) 206–214. doi:10.1021/acs.estlett.5b00180.
- [3] H. Wang, J.-D. Park, Z.J. Ren, Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 3267–3277. doi:10.1021/es5047765.
- [4] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, *J. Power Sources.* 356 (2017) 225–244. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.109.
- [5] M. Olliot, L. Etcheverry, A. Mosdale, R. Basseguy, M.-L. Delia, A. Bergel, Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance, *J. Power Sources.* 356 (2017) 389–399. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.016.
- [6] V.G. Gude, Wastewater treatment in microbial fuel cells - an overview, *J. Clean. Prod.* 122 (2016) 287–307. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.022.
- [7] P. Pandey, V.N. Shinde, R.L. Deopurkar, S.P. Kale, S.A. 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. doi:10.1016/j.apenergy.2016.01.056.
- [8] L. He, P. Du, Y. Chen, H. Lu, X. Cheng, B. Chang, Z. Wang, Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71 (2017) 388–403. doi:10.1016/j.rser.2016.12.069.
- [9] E. Blanchet, F. Duquenne, Y. Rafrafi, L. Etcheverry, B. Erable, A. Bergel, Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction, *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 3731–3744. doi:10.1039/C5EE03088A.
- [10] A. Schievano, T.P. Sciarria, K. Vanbroekhoven, H. De Wever, S. Puig, S.J. Andersen, K. Rabaey, D. Pant, Electro-Fermentation - Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 866–878. doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.007.
- [11] A. Kadier, M.S. Kalil, P. Abdesahian, K. Chandrasekhar, A. Mohamed, N.F. Azman, W. Logrono, Y. Simayi, A.A. Hamid, Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (MECs) for microbial production of hydrogen and value-added chemicals, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 61 (2016) 501–525. doi:10.1016/j.rser.2016.04.017.
- [12] G. Kumar, P. Bakonyi, G. Zhen, P. Sivagurunathan, L. Kook, S.-H. Kim, G. Toth, N. Nemestothy, K. Belafi-Bako, Microbial electrochemical systems for sustainable biohydrogen production: Surveying the experiences from a start-up viewpoint, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 70 (2017) 589–597. doi:10.1016/j.rser.2016.11.107.
- [13] Y.V. Nancharaiyah, S. Venkata Mohan, P.N.L. Lens, Metals removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review, *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 102–114. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.058.

- [14] X. Dominguez-Benetton, J.C. Varia, G. Pozo, O. Modin, A. Ter Heijne, J. Fransaeer, K. Rabaey, Metal recovery by microbial electro-metallurgy, *Prog. Mater. Sci.* 94 (2018) 435–461. doi:10.1016/j.pmatsci.2018.01.007.
- [15] 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) 319–326. doi:10.1080/08927014.2011.564615.
- [16] B. Maturro, C. Cruz Viggi, 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). doi:10.3389/fmicb.2017.00952.
- [17] M. Sun, F. Zhang, Z.-H. Tong, G.-P. Sheng, Y.-Z. Chen, Y. Zhao, Y.-P. Chen, S.-Y. Zhou, G. Liu, Y.-C. Tian, H.-Q. Yu, A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 338–343. doi:10.1016/j.bios.2010.08.010.
- [18] L. Peng, S.-J. You, J.-Y. Wang, Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1248–1251. doi:10.1016/j.bios.2009.10.002.
- [19] Y. Fan, S. Xu, R. Schaller, J. Jiao, F. Chaplen, H. Liu, Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1908–1912. doi:10.1016/j.bios.2010.05.006.
- [20] L. Pons, M.-L. Délia, A. Bergel, Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2678–2683. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.138.
- [21] D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable, A. Bergel, Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9645–9652. doi:10.1039/C2EE22429A.
- [22] K. Guo, B.C. Donose, A.H. Soeriyadi, A. PrévotEAU, S.A. Patil, S. Freguia, J.J. Gooding, K. Rabaey, Flame Oxidation of Stainless Steel Felt Enhances Anodic Biofilm Formation and Current Output in Bioelectrochemical Systems, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7151–7156. doi:10.1021/es500720g.
- [23] P. Champigneux, C. Renault-Sentenac, D. Bourrier, C. Rossi, M.-L. Delia, A. Bergel, Impact of surface micro-roughness on biofilm formation and current production of microbial anodes, (In press).
- [24] X. Xie, C. Criddle, Y. Cui, Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 3418–3441. doi:10.1039/C5EE01862E.
- [25] T.H.J.A. Sleutels, R. Lodder, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport, *Int. J. Hydrog. Energy.* 34 (2009) 9655–9661. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.09.089.
- [26] S. Chen, H. Hou, F. Harnisch, S.A. Patil, A.A. Carmona-Martinez, S. Agarwal, Y. Zhang, S. Sinha-Ray, A.L. Yarin, A. Greiner, U. Schroeder, Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 1417–1421. doi:10.1039/c0ee00446d.
- [27] 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. doi:10.1016/j.elecom.2016.02.017.
- [28] R. Karthikeyan, B. Wang, J. Xuan, J.W.C. Wong, P.K.H. Lee, M.K.H. Leung, Interfacial electron transfer and bioelectrocatalysis of carbonized plant material as effective anode of microbial fuel cell, *Electrochimica Acta.* 157 (2015) 314–323. doi:10.1016/j.electacta.2015.01.029.

- [29] S. Chen, G. He, X. Hu, M. Xie, S. Wang, D. Zeng, H. Hou, U. Schröder, A Three-Dimensionally Ordered Macroporous Carbon Derived From a Natural Resource as Anode for Microbial Bioelectrochemical Systems, *ChemSusChem*. 5 (2012) 1059–1063. doi:10.1002/cssc.201100783.
- [30] S.F. 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) 1633–1637. doi:10.1039/c3ee44114h.
- [31] V. Lanas, Y. Ahn, B.E. Logan, Effects of carbon brush anode size and loading on microbial fuel cell performance in batch and continuous mode, *J. Power Sources*. 247 (2014) 228–234. doi:10.1016/j.jpowsour.2013.08.110.
- [32] S. Chen, G. He, Q. Liu, F. Harnisch, Y. Zhou, Y. Chen, M. Hanif, S. Wang, X. Peng, H. Hou, U. Schröder, Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis, *Energy Environ. Sci.* 5 (2012) 9769–9772. doi:10.1039/C2EE23344D.
- [33] C.P.B. Siu, M. Chiao, A Microfabricated PDMS Microbial Fuel Cell, *J. Microelectromechanical Syst.* 17 (2008) 1329–1341. doi:10.1109/JMEMS.2008.2006816.
- [34] S. Inoue, E.A. Parra, A. Higa, Y. Jiang, P. Wang, C.R. Buie, J.D. Coates, L. Lin, Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements, *Sens. Actuators Phys.* 177 (2012) 30–36. doi:10.1016/j.sna.2011.09.023.
- [35] T. Kano, E. Suito, K. Hishida, N. Miki, Effect of Microscale Surface Geometry of Electrodes on Performance of Microbial Fuel Cells, *Jpn. J. Appl. Phys.* 51 (2012) 06FK04. doi:10.1143/JJAP.51.06FK04.
- [36] J. Kim, J. Hwan Ko, J. Lee, M. Jun Kim, D. Byun, Power enhancement of a  $\mu\text{l}$ -scale microbial fuel cells by surface roughness, *Appl. Phys. Lett.* 104 (2014) 223702. doi:10.1063/1.4880596.
- [37] P. Champigneux, M.-L. Delia, A. Bergel, Impact of electrode micro- and nano-scale topography on the formation and performance of microbial electrodes, *Biosens. Bioelectron.* (In press).
- [38] P. Champigneux, C. Renault-Sentenac, D. Bourrier, C. Rossi, M.-L. Delia, A. Bergel, Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches, *Bioelectrochemistry*. 121 (2018) 191–200. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.02.005.
- [39] L.D. Burke, P.F. Nugent, The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media, *Gold Bull.* 30 (1997) 43–53. doi:10.1007/BF03214756.
- [40] K.A. Marcus, Torres César I., Rittmann Bruce E., Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 1171–1182. doi:10.1002/bit.21533.
- [41] 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) 162–169. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.069.
- [42] A.K. Marcus, C.I. Torres, B.E. Rittmann, Analysis of a microbial electrochemical cell using the proton condition in biofilm (PCBIOFILM) model, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 253–262. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.100.
- [43] S.C. Papat, C.I. Torres, Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 265–273. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.136.
- [44] B.G. Lusk, P. Parameswaran, S.C. Papat, B.E. Rittmann, C.I. Torres, The effect of pH and buffer concentration on anode biofilms of *Thermincola ferriacetica*, *Bioelectrochemistry*. 112 (2016) 47–52. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.07.007.
- [45] J.R. Rumble, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 98th Edition, 98th Edition, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2018. <https://www.crcpress.com/CRC-Handbook-of-Chemistry-and-Physics-98th-Edition/Rumble-Haynes/p/book/9781498784542> (accessed November 27, 2017).

- [46] E. Kipf, R. Zengerle, J. Gescher, S. Kerzenmacher, How Does the Choice of Anode Material Influence Electrical Performance? A Comparison of Two Microbial Fuel Cell Model Organisms, *ChemElectroChem*. 1 (2014) 1849–1853. doi:10.1002/celc.201402036.
- [47] M. Olliot, S. Galier, H. Roux de Balman, A. Bergel, Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review, *Appl. Energy*. 183 (2016) 1682–1704. doi:10.1016/j.apenergy.2016.09.043.
- [48] M. Dopson, G. Ni, T.H.J.A. Sleutels, Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems, *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (2016) 164–181. doi:10.1093/femsre/fuvo44.

## 5. ULTRA-MICROELECTRODES, DIFFUSION ET CONDUCTIVITE AU SEIN DU BIOFILM

Les études présentées précédemment ont amené des conclusions intéressantes en termes d'adhésion bactérienne et de formation de bioanodes. Cependant, des questions concernant les mécanismes de fonctionnement du biofilm électroactif sont apparues. Il a été remarqué que l'épaississement du biofilm pouvait être défavorable à la production de courant. En effet, l'épaississement d'un biofilm cause l'appauvrissement des couches internes en éléments nutritifs et son acidification, réduisant ainsi son activité catalytique (Franks et al, 2010, Renslow et al, 2013). De plus, les couches externes du biofilm, plus éloignées de la surface de l'électrode rencontrent plus de résistance pour transmettre les électrons à l'électrode (Liu et al, 2010, Malvankar et al, 2011). L'épaisseur optimale d'un biofilm de *G. sulfurreducens* a été évaluée à 20  $\mu\text{m}$  (Sun et al, 2015).

Comme observé précédemment, la conception d'une électrode offrant un environnement propice au développement d'un biofilm n'est pas forcément un critère d'optimisation suffisant. Il faut aussi amener le biofilm à se maintenir et à réaliser les transferts électroniques les plus efficaces possibles. Une meilleure compréhension des phénomènes ayant lieu à l'intérieur du biofilm est donc primordiale. Dans cet objectif, une partie du projet Koropokkuru avait été orientée vers la compréhension des processus de transferts d'électrons extracellulaires au sein des biofilms en ayant recours à des ultra-microélectrodes.

Les microélectrodes sont utilisées en électrochimie parce que la diffusion semi-hémisphérique qu'elles induisent repousse les limites dues aux transferts de masse. Dans le cas des biofilms électroactifs, des microélectrodes ont montrées qu'il était possible de profiter de cette diffusion radiale pour accroître la production de courant (Liu et al, 2010, Pocaznoi et al, 2012). Il a donc été envisagé d'utiliser des microélectrodes pour évaluer l'impact de la diffusion sur la formation du biofilm puis sur la production de courant. Les microélectrodes ont été élaborées sous forme de bandes conductrices d'or NG de largeurs variables : 25, 50 et 200  $\mu\text{m}$ . L'effet microélectrode devrait être perçu pour les bandes de 25 et 50  $\mu\text{m}$ , celles de 200  $\mu\text{m}$  servant de contrôle.

Ces dispositifs étaient également envisagés pour apporter des éléments d'information sur la conductivité des biofilms, en cherchant à évaluer la distance sur laquelle le transport d'électrons au sein du biofilm est possible. Pour observer cela, l'idée était de placer les bandes d'or de largeurs variables par deux sur un support non conducteur et de faire varier l'espacement entre les bandes de 100, 200, 500  $\mu\text{m}$  et jusqu'à 9 mm. L'objectif serait d'observer si un biofilm continu parviendrait à se développer entre les deux bandes et, le cas échéant, pourrait assurer un transfert d'électrons de l'une à l'autre, ou pas. Pour répondre à cette seconde question, une seule bande serait polarisée afin d'évaluer le flux d'électrons qui serait dirigé vers la seconde en fonction de l'écartement des bandes.

Malgré la longueur des bandes de 3 cm, les bioanodes ont une surface géométrique faible et ne produisent donc que de faibles courants. Il était à craindre que les écarts expérimentaux puissent être assez élevés. Pour s'affranchir au moins de la variabilité biologique, les bioanodes

ont été formées avec des dispositifs permettant de tester 4 électrodes simultanément dans le même réacteur. La combinaison des variations de largeur et d'espacement devait donc permettre de recueillir des données sur l'impact des deux paramètres.

Cependant, malgré la répétition de l'expérience une dizaine de fois, les résultats se sont montrés inexploitable. Dans certains cas aucun signal électrochimique n'était détecté après plus d'une semaine, dans d'autre cas le signal variait en l'espace d'une heure de 0 à 2 A/m<sup>2</sup>. Une seule expérience a montré des résultats exploitables. Les bioanodes étaient formées sur des bandes larges de 200 µm et présentant les quatre espacements de 100, 200, 500 µm et 9 mm sur un support en oxyde de silice. Les quatre électrodes, mises en œuvre dans un réacteur unique inoculé à 10% avec *G. sulfurreducens* et alimenté avec 10 mM d'acétate, sont polarisées à 0,1 V/ECS pendant une vingtaine de jours (Figure 5). Les bandes espacées de 9 mm et 500 µm produisent les mêmes densités de courant. On peut en conclure qu'au-delà de 500 µm l'espacement entre les bandes n'a pas d'influence sur le biofilm. En revanche, pour les distances de 500, 200 et 100 µm, les densités de courant augmentent lorsque l'espacement diminue. Cette augmentation pourrait résulter d'une densité de colonisation plus importante lorsque les bandes sont rapprochées.

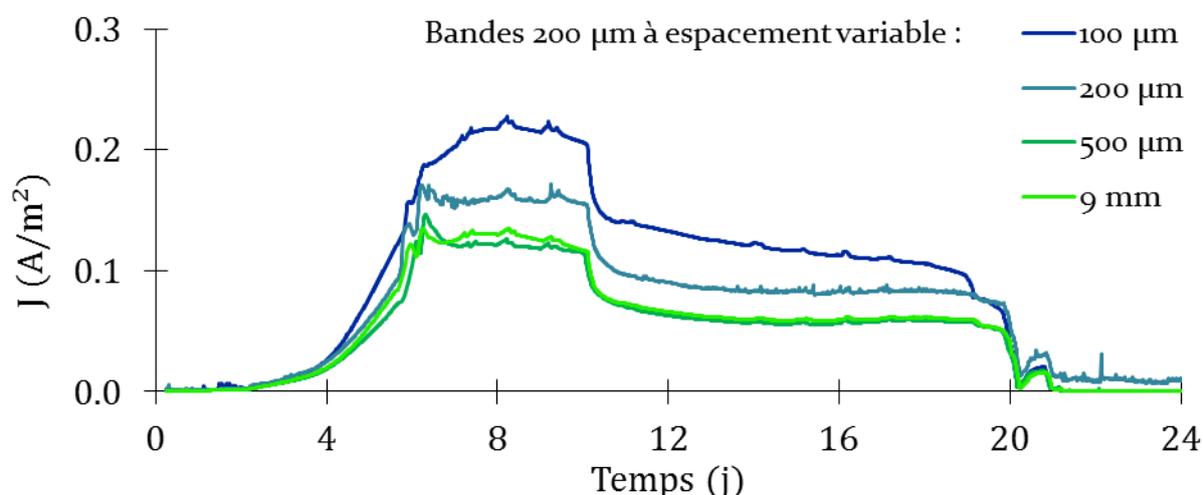


Figure 5 : Chronoampérogrammes des bandes de 200 µm avec des espacements variables.

En fin d'expérience, les électrodes sont marquées au Syto 9 et observées au microscope à épifluorescence. L'observation microscopique ne permet pas de confirmer l'hypothèse d'une présence plus importante de biomasse lorsque les bandes sont rapprochées. De plus, la biomasse se trouve de façon indifférenciée sur la zone conductrice d'or ou sur la zone d'oxyde de silice (Figure 6.A). Il semblerait même la partie centrale de la bande soit moins densément colonisée que ses bords. Cela suggérerait que la colonisation sur les bandes pourrait provenir d'une croissance depuis la zone d'oxyde de silice plutôt que d'une colonisation directe de la bande d'or. Ces observations mettent en évidence un premier problème : les bandes d'or ne favorisent pas plus l'adhésion que la surface isolante.

Des tests complémentaires ont été effectués pour confirmer cette observation en formant des bioanodes avec des électrodes présentant une moitié en or et une moitié en oxyde de silice. L'observation de ces électrodes en épifluorescence a confirmé le fait que le biofilm se développe aussi bien sur l'une que sur l'autre des surfaces (Figure 6.B). Il n'est donc pas possible d'utiliser ce dispositif pour observer le développement du biofilm électroactif.

Ces observations soulèvent des questions sur les conditions de croissance de *G. sulfurreducens* qui ne devrait pas se développer en dehors des surfaces conductrices. En effet, il n'y a pas d'accepteur final d'électrons en solution, et les anodes en or devraient être le seul accepteur final d'électrons du système. Cependant, la croissance est bien observée sur l'oxyde de silice ainsi que sous forme planctonique. Cette question est abordée dans la section suivante 6.

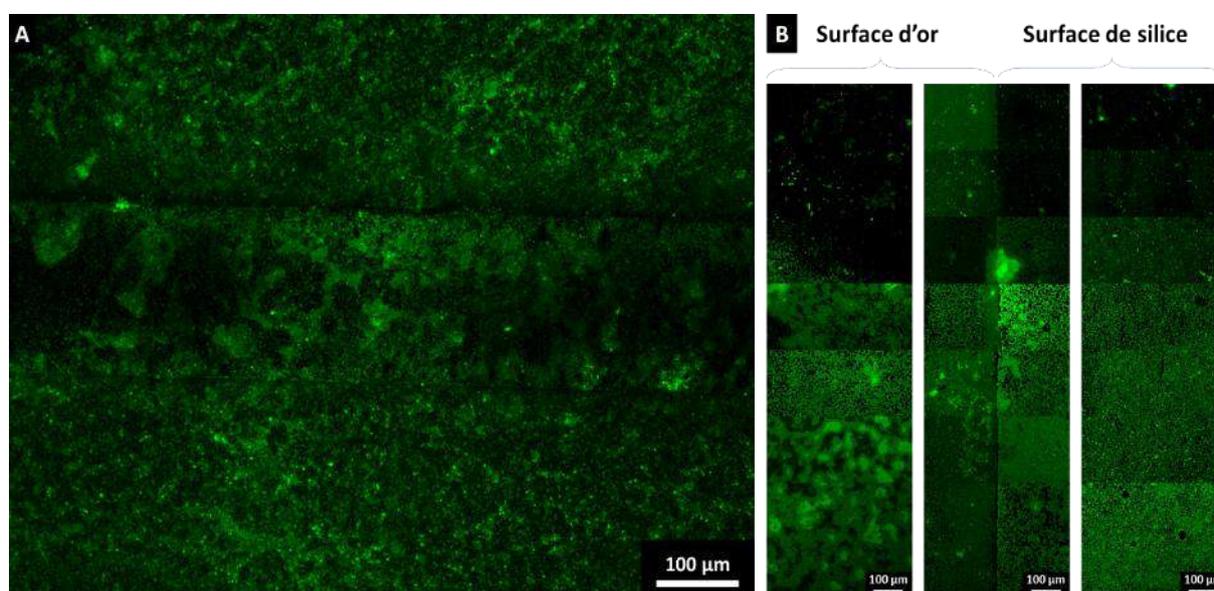


Figure 6 : (A) Imagerie en épifluorescence de la colonisation d'une bande de 200 µm. (B) Combinaison de 7 images réalisées sur la surface d'or, l'interface or/silice et la surface de silice de l'électrode mixte.

L'observation des électrodes comportant des bandes de 25 et 50 µm a en outre montré plusieurs cassures ou déformations des bandes d'or. Cela pourrait expliquer les comportements très variables de la production de courant durant certaines expériences, avec des problèmes de connectivité et des phénomènes de charges et décharges au sein du biofilm. Malgré les efforts investis dans cette série d'expérience destinée à étudier les mécanismes de formation des biofilms électroactifs, cet axe du projet n'a pu être mené à bien car confronté à de fortes contraintes techniques.

## 6. INVESTIGATION D'UNE EVENTUELLE VOIE METABOLIQUE ANNEXE CHEZ *GEOBACTER SULFURREDUCTENS*

A la lecture de ces travaux, une analyse aura peut-être manqué à un électrochimiste averti : les calculs de rendement faradique. Cette valeur, couramment appelée efficacité coulombique dans le domaine des technologies électro-microbiennes, indique le rendement du procédé ou d'une électrode en termes de conversion d'énergie. Dans le cas d'une anode, l'efficacité coulombique compare l'énergie électrique fournie au circuit à l'énergie apportée sous forme chimique. Pour les bioanodes présentées dans le cadre de ce travail de thèse, l'efficacité coulombique correspond au taux de conversion de l'acétate qui est le seul donneur d'électrons, en charge électrique:

$$\text{Efficacité coulombique (\%)} = \frac{\text{Charge transférée au circuit (C)}}{\text{Charge consommée en acétate (C)}} \quad \text{Equation 1}$$

La charge transférée au circuit est calculée en intégrant le courant mesuré sur une période de temps donnée et la charge totale délivrée par l'acétate qui a été oxydé est calculé avec la formule :

$$\text{Charge consommée en acétate} = (C_0 - C_t)nFV \quad \text{Equation 2}$$

où  $C_0$  et  $C_t$  sont les concentrations en acétate au début et à la fin de la période de mesure (mol/L),  $n$  le nombre de moles d'électrons produit par l'oxydation d'une mole d'acétate (8 mol e<sup>-</sup>/mol),  $F$  la constante de Faraday (96500 C/mol e<sup>-</sup>) et  $V$  le volume du réacteur (L).

Le choix de *G. sulfurreducens* comme micro-organisme modèle avait été motivé en partie par les fortes efficacités coulombiques rapportées dans la bibliographie (Nevin et al, 2008). Il a été montré que *G. sulfurreducens* est capable de convertir plus de 95% de l'acétate en courant électrique et les valeurs varient couramment entre 70 et 90%. Cependant, au sein de nos réacteurs, les efficacités coulombiques étaient faibles, avec des valeurs maximales de l'ordre de 50% pour les expériences ayant produit le plus de courant. Une majorité de réacteurs donnaient des valeurs en-dessous de 25%.

Ces valeurs d'efficacité coulombique faibles sont à associer une croissance planctonique significative sur l'ensemble des réacteurs. Cela traduit un détournement de la voie électro-catalytique. Pourtant, le seul accepteur final d'électrons dans nos systèmes devrait être l'électrode. La pré-culture des cellules est effectuée par respiration de fumarate (Figure 7.A), des traces de fumarate pourraient donc être présentes, mais pas en quantité suffisante pour expliquer une telle croissance planctonique (Tableau1). Les cellules ne devraient donc pas se développer en dehors du biofilm au contact de l'électrode qui constitue la voie classique et privilégiée d'évacuation des électrons dans un système électro-microbien.

Tableau 1 : Concentrations apportée lors de l'inoculation de *G. sulfurreducens* (mesurées par HPLC)

	Acétate	Fumarate	Succinate
Concentration apportée par l'inoculation (mM)	0,72	0,51	0,28

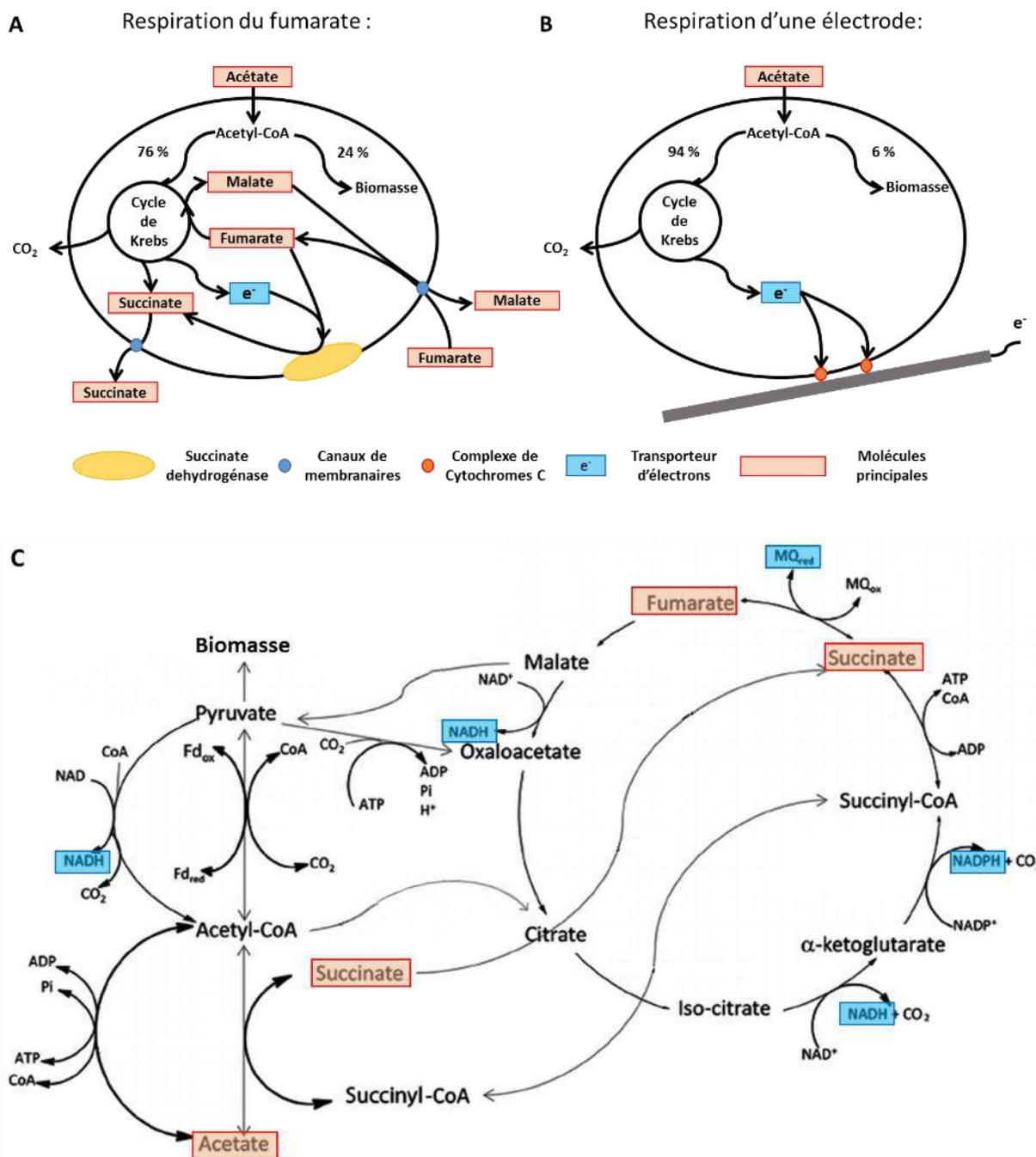
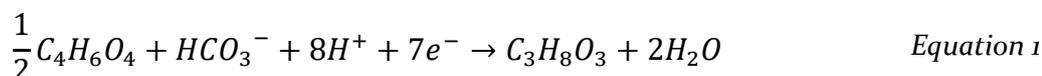


Figure 7 : Représentation du métabolisme de l'acétate chez *Geobacter* (A) en condition de croissance sur fumarate, (B) en condition de croissance sur une électrode et (C) détail des réactions mises en jeu dans l'assimilation de l'acétate.

Pour tenter de cerner les mécanismes mis en jeu lors de la croissance de *Geobacter sulfurreducens* dans les réacteurs, une série d'expériences a été menée avec trois conditions de culture différentes en suivant la croissance des cellules et la concentration des molécules clés pour les voies métaboliques. La croissance cellulaire planctonique a été suivie par mesure de la densité optique (DO) du milieu et de 4 molécules : acétate, fumarate, succinate et glycérol ont

été dosés par HPLC au cours du temps. Le choix de doser le glycérol résulte d'observations effectuées précédemment au sein de l'équipe (Soussan et al, 2013). La production de quantités significatives de glycérol par *Geobacter sulfurreducens* a été observée sur des biocathodes alimentées en succinate et de CO<sub>2</sub> selon l'équation suivante :



Le succinate pourrait donc constituer un accepteur final d'électrons en produisant du glycérol qui constituerait en quelques sortes un mode de stockage tampon des électrons.

Les réacteurs sont préparés comme précédemment avec du milieu stérile supplémenté en vitamines et éléments trace et maintenus en anaérobiose (Chapitre 2, section 2.1). Une pré-culture de *Geobacter sulfurreducens* est utilisée pour inoculer les réacteurs à 10% (v/v) après 20 minutes de bullage de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, selon le même protocole que pour l'ensemble des expériences réalisées en culture pure. Le substrat reste l'acétate à 10 mM. Trois cas sont étudiés qui diffèrent par la nature de l'accepteur d'électrons présent, ou non, en solution:

- aucun accepteur final d'électron n'est introduit,
- du fumarate à 50 mM est introduit (condition identique à la pré-culture)
- une électrode constitue le seul accepteur final d'électron.

Deux réacteurs (R1 et R2) sont mis en oeuvre sans accepteur final, deux avec du fumarate (R3 et R4) et un dernier réacteur (R5) avec une électrode en or NG. La production de courant observée dans le réacteur R5 est similaire aux résultats présentés précédemment sur or NG avec un J<sub>max</sub> de 1.8 A/m<sup>2</sup> et une efficacité coulombique de 8.1 %. Une croissance planctonique a été observée dans l'ensemble des réacteurs. Les mesures de DO varient de 0,57 à 0,68 ce qui correspond à des concentrations cellulaires de 2,6 à 3,2 x 10<sup>5</sup> UFC/mL (Figure 8.A) La concentration finale de micro-organismes est donc équivalente dans les différents réacteurs. La phase exponentielle de cette croissance planctonique a eu lieu dans l'ensemble des réacteurs entre le jour 3 et le jour 4. Avant le jour 3 une croissance plus légère était observable dans les réacteurs comportant un accepteur d'électrons (R3 à R5) mais pas dans les réacteurs dépourvus d'accepteur (R1 et R2). Après le jour 4, la croissance stagne dans les réacteurs R3 et R4 qui sont arrivés à la phase de plateau. Au contraire, les réacteurs R1, R2 et R5 n'atteignent pas de phase stationnaire et rattrapent progressivement leur retard de croissance sur les réacteurs R3 et R4 jusqu'au jour 11. L'absence de fumarate ou d'électrode qui devrait proscrire la croissance des bactéries puisqu'il n'y aurait alors pas d'accepteur final d'électrons n'entraîne en fait qu'un retard de quelques jours, mais la croissance s'établit tout de même.

Les analyses par HPLC ont permis de suivre les concentrations en acétate, fumarate et succinate. Dans l'ensemble des réacteurs, on observe une consommation rapide de l'acétate qui est presque totalement absent à partir du jour 4. Cela coïncide bien avec la phase exponentielle de croissance observée par la mesure de DO. Cette consommation d'acétate est accompagnée d'une augmentation de la concentration en succinate. En présence de fumarate, dans R3 et R4, la concentration en succinate continue d'augmenter alors que le fumarate est consommé. En revanche, dans les réacteurs R1, R2 et R5 la concentration en succinate retombe lentement à 0

vers le jour 15. Cette diminution de la concentration en succinate pourrait être liée à la croissance observée après la phase de croissance exponentielle dans ces réacteurs. Concernant le glycérol, aucune concentration significative n'a été observée au cours des expériences.

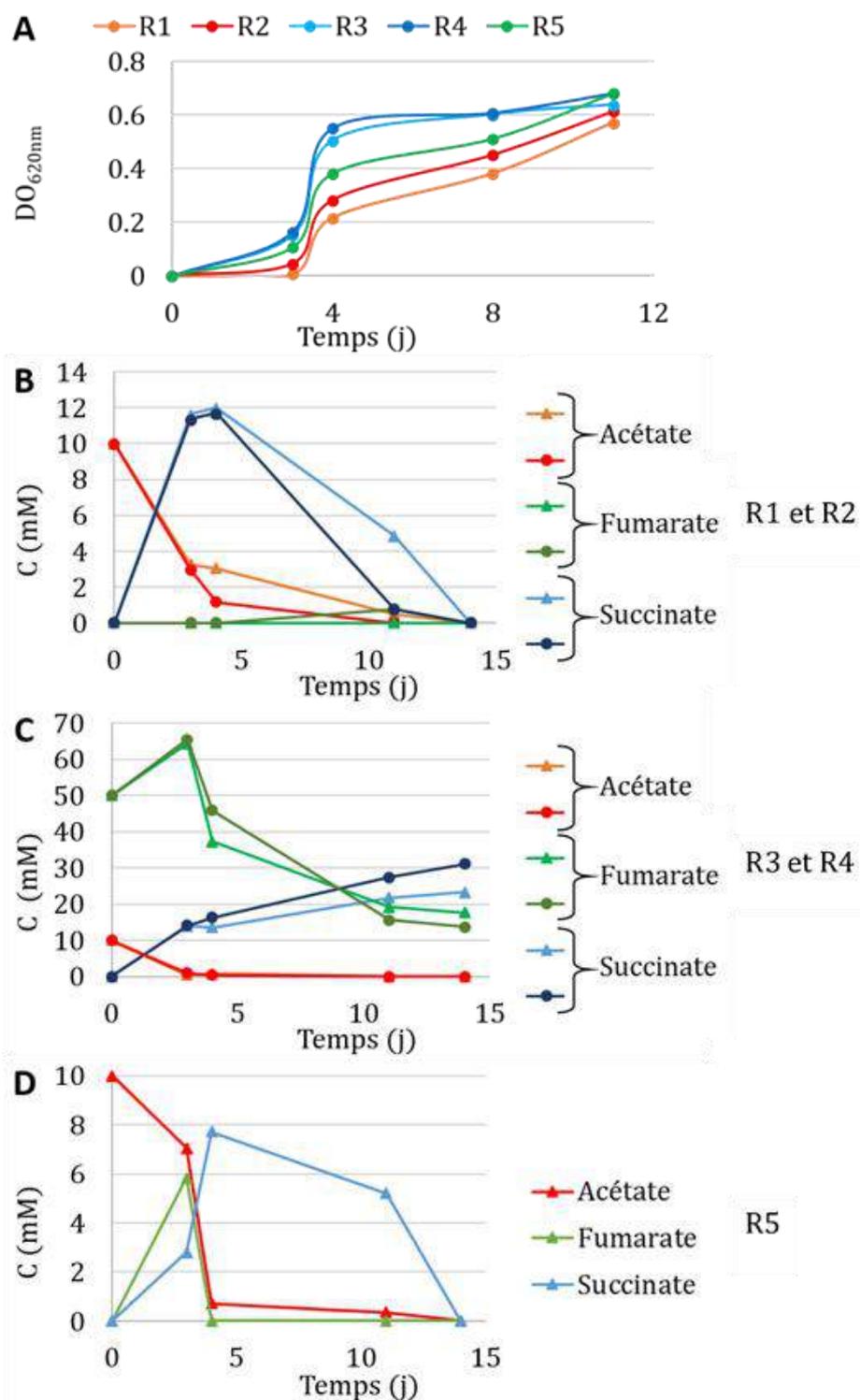


Figure 8 : Suivis de croissance ; (A) densités optiques à 620 nm ; concentrations de l'acétate, fumarate et succinate (B) dans R1 (carré) et R2 (Triangle), (C) dans R3 (carré) et R4 (triangle) et (D) dans R5 (triangle).

Les analyses HPLC ont aussi révélé la présence d'un pic précis et reproductible sur plusieurs échantillons qui ne faisait pas partie des 4 composés testés dans l'étalonnage. Il n'a pas été possible d'identifier et de doser ce composé mais les résultats sont discutés ci-dessous en termes de concentration relative. Ce composé, noté molécule A, n'est présent que dans les réacteurs R3 et R4 et dans des proportions qui semblent importantes au vu des pics observés par HPLC. Il est supposé que la molécule A soit du malate, du fait du couplage de l'assimilation du fumarate et de la libération de malate dans le mécanisme de respiration du fumarate (Figure 7.A).

Ces données n'étaient pas suffisantes pour comprendre les mécanismes mis en jeu, une extraction du contenu cellulaire a donc été effectuée afin de mesurer les concentrations intracellulaires de ces composés en fin d'expériences. En effet, il se peut que certains composés soient stockés par la cellule comme cela avait été présumé pour le glycérol (Soussan et al, 2013). Les dosages effectués après la récupération des cellules par centrifugation et leur lyse (Chapitre 2, section 4.2) ont mis en évidence l'absence d'acétate dans les cellules, ce qui démontre sa consommation totale, ainsi que l'absence de glycérol qui élimine l'hypothèse d'un stock intracellulaire de glycérol qui permettrait une croissance à court terme. Concernant le fumarate et le succinate, alors que les cellules des réacteurs R1 et R2 en sont dépourvues, des concentrations importantes sont mesurées dans les cellules des réacteurs R3 à R5 (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations intracellulaires mesurées par HPLC après récupération des cellules par centrifugation et lyse chimique pour récupérer le contenu cellulaire.

	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<b>Fumarate (mM)</b>	17	12	52
<b>Succinate (mM)</b>	24	28	22

Il n'est pas étonnant de retrouver du fumarate et du succinate dans les cellules des réacteurs R3 et R4, puisque ces réacteurs contiennent initialement 50 mM de fumarate et le fumarate est l'un des accepteurs d'électrons courants de *G. sulfurreducens* (Figure 7.A) :



Il est important de noter que les observations effectuées à ce stade sur les cellules des réacteurs R3 et R4 donnent des informations sur l'état des cellules utilisées pour l'inoculation des réacteurs. En effet, elles proviennent d'un milieu de culture identique à celui des pré-cultures mais elles sont analysées plus tôt dans la phase de croissance, après 3 jours seulement. Les concentrations élevées en fumarate, en succinate et l'hypothèse de la présence importante de malate après 3 jours suggèrent que les cellules servant d'inoculum doivent comprendre des quantités importantes de ces composés. Il est donc possible que la croissance observée repose en partie sur cet apport initial en fumarate, succinate et malate. En effet, ce sont des composés

très proches et le fumarate et le malate sont tous deux des accepteurs finaux d'électrons utilisables par *G. sulfurreducens*.

Bien que cela n'ait pas encore été démontré expérimentalement, en termes de potentiels d'oxydo-réduction le couplage entre l'oxydation de l'acétate et la réduction du succinate, du malate, ou évidemment du fumarate, sont thermodynamiquement possibles. Le Tableau 3 donne les potentiels redox apparents à pH 7.0 de ces demi-réactions calculés à partir des enthalpies libres à pH 7.0. L'oxydation de l'acétate en CO<sub>2</sub> a un potentiel redox apparent de -0.532 V/ECS. Les trois demi-réactions ont potentiel redox apparent plus haut peuvent donc être couplées avec cette oxydation.

Tableau 3 : Réactions d'oxydation et de réduction envisagées avec leur potentiel redox apparent ( $E^0'$ ) calculés à pH 7.0, 25°C, 100 kPa pour la pression de CO<sub>2</sub>, pour des concentrations égales à 1 M et une force ionique de 0 (les enthalpies libres apparentes sont tirées du Handbook of Chemistry and Physics, section Biochemistry, J.R. Rumble, 98<sup>th</sup> edition).

Oxydation	$E^0'$ V/ECS*	Réduction
Acétate → 2 CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O → 2 CO <sub>2</sub> + 8 H <sup>+</sup> + 8e <sup>-</sup>	-0.532	
	-0.405	Succinate → 2 acétate C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> + 2 H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → 2 C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
	-0.310	Malate → 2 acetate C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> → 2 C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O
	-0.196	Fumarate → succinate C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>

\* il faut ajouter 0.241 V à ces valeurs de potentiels pour les exprimer par rapport à ESH

Une forte concentration en fumarate est observée dans les cellules du réacteur R5 alors qu'il n'y avait pas initialement de fumarate dans ce réacteur. Cela est à mettre en perspective avec l'absence de fumarate dans les cellules des réacteurs R1 et R2. De la même manière, la présence de succinate à une concentration de l'ordre de 22 mM dans le réacteur R5 et son absence dans les réacteurs R1 et R2 sont à souligner. Une hypothèse peut être avancée pour expliquer cette différence. Pour le réacteur R5, une partie de l'acétate est utilisé pour la production de courant à hauteur de 8,1% selon le calcul de l'efficacité coulombique. Environ 90% de l'acétate est donc utilisé pour la croissance. En procédant par comparaison avec les réacteurs R1 et R2 où 100% de l'acétate est consommé pour la croissance, les concentrations en fumarate et succinate intracellulaires observées dans R5 peuvent s'expliquer de deux façons :

- soit ce sont des molécules formées du fait de la production de courant,
- soit elles étaient présentes initialement et n'ont pas été consommées dans R5 car les voies de consommation ont été inhibées par la production de courant.

Cependant de telles concentrations de fumarate et de succinate formées par *G. sulfurreducens* en présence d'une électrode n'ont jamais été reportées. L'explication

métabolique de la croissance de *G. sulfurreducens* en absence de fumarate ou d'électrode s'oriente donc, sans plus d'information et après ces discussions, vers la consommation de résidus de la première mise en culture qui suffiraient à la croissance. Si cette hypothèse est valide, il suffirait de prolonger le fonctionnement des bioanodes suffisamment longtemps en ajoutant de l'acétate pour voir l'efficacité coulombique se rapprocher de 100%. Le choix de réaliser des expérimentations de relativement courte durée pour focaliser les mécanismes de formation des bioanodes aurait donc pénalisé les rendements faradiques. Cette conclusion est arrivée trop tard dans le déroulement de la thèse pour que nous puissions la vérifier expérimentalement. Ce serait un prolongement du travail à considérer en priorité. Toutefois, une voie annexe de consommation de l'acétate ne peut pas être totalement écartée.

Pour confirmer cela, il aurait fallu mesurer l'ensemble des concentrations intracellulaires et les concentrations du milieu après 3 jours de pré-culture et faire un bilan plus complet mais cela n'a pas été possible dans le cadre de la thèse. L'élucidation de ce phénomène de croissance annexe pourrait aussi être très utile pour de futurs travaux avec *Geobacter sulfurreducens* car il pourrait être à la base de la perte d'électroactivité décrite dans la section 3.4.

## **7. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES EXPERIENCES MENEES EN CULTURE PURE DE *GEOBACTER SULFURREDUCENS***

L'utilisation d'une bactérie anaérobie en culture pure s'est révélée être plus difficile que prévue. Par exemple les limitations de rendements présentées ci-dessus n'ont pas permis d'atteindre les objectifs fixés par le projet Koropokkuru en termes de densités de courant. Une analyse plus poussée en termes de microbiologie serait nécessaire pour élucider la source de cette croissance annexe. Il semble que les métabolites impliqués dans le cycle de Krebs soient à l'origine de ce détournement de la voie électro-catalytique. L'identification et le dosage des composés impliqués n'ont pas pu être menés mais devraient permettre d'optimiser l'efficacité de conversion de l'acétate en courant et augmenter de façon importante la production de courant dans nos systèmes. L'éclaircissement de ce mécanisme pourrait également lever la difficulté rencontrée au niveau de la conservation et du repiquage de la souche électroactive de *Geobacter sulfurreducens* décrite dans le chapitre 3.

A ces problèmes se sont ajoutées des déceptions comme l'absence de réponse des bactéries sur les électrodes de cuivre, ce qui aurait permis de simplifier le procédé de fabrication des électrodes et donc de bénéficier d'un plus grand nombre, ou l'impossibilité d'utiliser les ultra-microélectrodes « bandes » qui pourtant aurait ouvert un axe d'investigation très intéressant.

Une fois ces problèmes surmontés, ou en s'en accommodant, la mise en œuvre de *Geobacter sulfurreducens* sur des surfaces d'électrode de topographie parfaitement contrôlée a apporté de nombreux enseignements. Ces travaux constituent la première réalisation de bioanodes sur or au sein de l'équipe et cette approche reste rare au sein de la communauté scientifique. La stabilité des bioanodes, la biocompatibilité de l'or et la reproductibilité des expériences lorsqu'elles sont effectuées dans les bonnes conditions sont des résultats qui devraient entraîner une utilisation accrue de l'or en tant que support de bioanodes pour les études fondamentales.

Les études réalisées avec les électrodes rugueuses ont mis lumière l'existence de différents types d'impacts de la rugosité sur la morphologie et l'efficacité des biofilms électroactifs. Trois domaines de rugosité ont ainsi été distingués, allant de l'échelle nanométrique à l'échelle micrométrique en passant par une rugosité intermédiaire de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres.

Au niveau nanométrique, les variations de rugosité n'impactent que très peu la colonisation et les performances du biofilm. Les topographies de l'ordre du nanomètre (rugosité de 0,8 et 4,5 nm) entraînent de grandes variabilités en termes de colonisation et de production de courant. De plus, l'adhésion sur ces électrodes s'est montrée très fragile du fait du manque de point d'ancrage pour les cellules.

L'incidence de la topographie est beaucoup plus marquée pour la rugosité au-delà de la centaine de nanomètres. En offrant aux bactéries une surface de contact plus importante, cette échelle la rugosité permet un attachement plus fort des bactéries à la surface. Les aspérités de cet ordre de grandeur semblent également améliorer les caractéristiques électrochimiques et la conduction des électrons au sein du biofilm via un effet de bord ou un comportement local de type ultra-microélectrode. Il faudrait pour confirmer cela réaliser des bioanodes sur des électrodes constituées d'un réseau d'ultra-microélectrodes bien différenciées, comme par exemple les électrodes sous forme de microbandes qui avaient été envisagées, mais cela n'a pas été possible pour des raisons techniques.

Enfin, les structures d'une dizaine de micromètres se sont montrées très efficaces pour l'établissement des biofilms électroactifs efficaces en favorisant l'adhésion des bactéries et grâce à l'accroissement de la surface à coloniser. Cet environnement propice à la constitution d'un biofilm robuste tend à modifier sa maturation mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ce point. Les surfaces rugueuses ont mené à accroissement des densités de courant d'un facteur supérieur à 4. Ces performances pourraient se révéler bien plus importantes dans un système mis en œuvre à plus long terme et si les limitations au niveau de l'efficacité coulombique sont levées.

La structuration de la surface de l'électrode avec des micro-piliers de 500  $\mu\text{m}$  de haut a grandement amélioré l'établissement du biofilm et la stabilité de la production de courant par rapport aux surfaces nano-rugueuses planes, alors que les piliers sont constitués du même or nano-rugueux. L'enthousiasme suscité par ce type de structuration a atteint son apogée lorsque des structures de biofilms ont été observées sous forme de ponts reliant les piliers. Ceci laissait présager une augmentation du rapport biofilm/surface qui aurait permis d'obtenir des performances exceptionnelles. Malheureusement, ces observations se sont révélées être des artefacts expérimentaux.

Cette petite déconvenue ne doit pas faire oublier que les électrodes comportant un réseau de micro-piliers ont permis une colonisation intégrale et homogène de la surface, alors que la même surface plane n'était que faiblement colonisée avec des taux de recouvrement par le biofilm assez erratiques. De plus, l'augmentation conséquente de la surface active grâce à la présence des piliers a accru la production de courant d'un facteur 10 pour le réseau de pilier le

plus efficace. Il a toutefois été mis en évidence que des limitations apparaissaient dues à la diffusion réduite au sein du réseau. La possibilité d'une forte acidification locale semble être le phénomène le plus limitant. En effet, l'activité du biofilm entraîne la production de protons que la diffusion des espèces tampons au sein du réseau de piliers ne permet pas de compenser.

La formation de bioanodes de *Geobacter sulfurreducens* sur des électrodes d'or poreuses a offert de bons résultats en termes de production de courant ainsi que des conclusions importantes sur la structure du biofilm et les conditions du maintien de son activité. Les structures d'or poreux présentant un réseau de pores de taille variable entre 5 à 30  $\mu\text{m}$  ont favorisé la production de courant. Des densités de courant jusqu'à 16  $\text{A}/\text{m}^2$  ont été atteintes, ce qui constitue les meilleures valeurs obtenues dans le cadre de ces travaux thèse. Au-delà de ces valeurs élevées, les bioanodes poreuses ont également permis de maintenir un biofilm productif pendant une période plus longue que n'importe quelle autre électrode testée ici. Cela s'explique par la formation d'un biofilm dense et recouvrant à la surface supérieure de la structure poreuse qui offre une forte activité catalytique. Cependant, la formation de ce biofilm à la surface externe présente aussi le désavantage de colmater l'importante surface active présente au sein de la structure poreuse.

La création de rugosité sur un réseau de micro-piliers a donc été tentée afin d'éviter la formation d'un biofilm colmatant. Avec des micro-piliers espacés de 200  $\mu\text{m}$  nous espérons mettre en œuvre la microrugosité sur une grande surface, éviter le phénomène de colmatage et réduire l'acidification locale. Les performances n'ont pas été à la hauteur de nos attentes, avec des densités de courant de seulement 8  $\text{A}/\text{m}^2$ . Les observations par microscopie soutenues par le modèle théorique développé pour les micro-piliers lisses ont permis de cerner les causes de l'échec. La rugosité était principalement située en haut des piliers et de ce fait la colonisation était plus importante sur les hauts des piliers rugueux alors qu'elle était uniformément répartie dans le cas des piliers lisses. En outre, lorsque la partie supérieure des micro-piliers assure localement une densité de courant élevée, les espèces tampons de la solution sont consommées sur le haut des piliers et ne pénètrent que très peu la structure. Le bas des piliers subit une acidification importante qui inhibe le biofilm. Les structures en réseau de micro-piliers est donc victime de l'efficacité de la surface micro-rugueuse. En d'autres termes, seuls quelques dizaines de micromètres sont exploités en haut des piliers. Il s'agit là de premières bases pour le design de structures optimales d'électrodes microbiennes.

Ce voyage dans le nano-/micro-monde de la rugosité, porosité, structuration de surface a permis d'établir quelques premières règles d'ingénierie pour aller vers des structures d'électrodes optimales. La surface offerte pour la colonisation du biofilm reste le paramètre essentiel, et il semble que les porosités en deçà de quelques dizaines de micromètres soient des solutions illusoire pour l'augmenter. Les micro-structurations de quelques centaines de micromètres font merveille pour la colonisation du biofilm. Elles sont efficaces en termes d'accroissement de la densité de courant lorsque l'électro-catalyse n'est pas très performante mais elles sont fortement limitées par l'acidification locale lorsque l'électro-catalyse devient sérieuse. Ce processus peut être approché par un modèle de diffusion-réaction classiquement utilisée en génie chimique pour le design des catalyseurs.



*Chapitre 6:*  
*Essais en conditions*  
*d'inoculation réelle*



## 1. OBJECTIF DU PASSAGE A UN INOCULUM MULTI-ESPECES

Les travaux présentés jusqu'ici s'insèrent dans le premier axe de recherche du projet Koropokkuru qui vise à comprendre et optimiser la formation de biofilms électroactifs grâce aux technologies microsystèmes. Le second axe du projet est lui tourné vers l'implémentation des optimisations résultant du premier axe pour la conception d'une pile à combustible benthique. Ce dernier chapitre n'a pas pour ambition la conception de cette pile mais fait office de travail préparatoire pour la mise en place de l'axe 2 du projet.

Le choix des sédiments de marais salants est effectué sur la base des nombreux travaux réalisés au LGC à partir de cet inoculum et des bonnes performances qu'il a démontrées. Cependant, à la lecture de ces travaux, il a été observé que les biofilms formés à partir de cet inoculum sont très complexes et relativement boueux comme le montre la Figure 1 issue de la thèse de Raphaël Rousseau. Afin de pouvoir évaluer l'impact des structures d'électrodes proposées ici sur la formation du biofilm, il est nécessaire de favoriser la formation d'un biofilm moins « sale » à la surface des anodes. De plus, comme présenté dans la série de tests préliminaires à partir d'un inoculum multi-espèces (Chapitre 3, section 5), il existe dans cette configuration une compétition entre les espèces électro-actives et d'autres espèces au niveau de la consommation du substrat. Afin de limiter ces interférences, diverses solutions visant à épurer le milieu dans les réacteurs ont donc été envisagées.

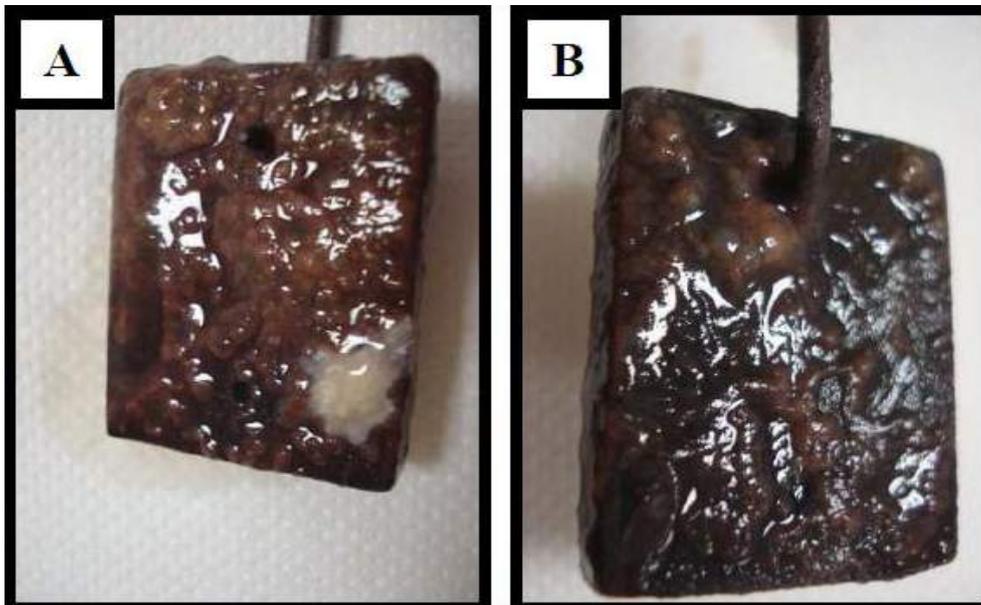


Figure 1: Photographie de biofilm formé à partir de sédiments de marais salants sur une électrode de graphite après 25 jours d'inoculation (Rousseau, 2013).

## 2. EXPERIMENTATION DE DIFFERENTES TECHNIQUES D'INOCULATION

### 2.1. Réduction du taux d'inoculation

La première technique envisagée pour limiter la charge boueuse dans le milieu et les développements de populations concurrentes hors électrode pendant la réaction est de réduire le taux de sédiments marins apportés initialement. Pour les travaux précédents au LGC déjà évoqués (Rousseau, 2013), le taux d'inoculation en sédiments était fixé à 10% v/v. Les essais suivants ont pour but d'évaluer l'impact d'une diminution de ce taux à 5, 2 ou 1 % v/v dans les réacteurs de 500mL. Ces expériences sont réalisées avec une anode en feutre de carbone selon le protocole décrit dans la section 3.3 du chapitre 2. Le milieu est préparé initialement avec une inoculation à 10% v/v pour le volume correspondant à l'ensemble des réacteurs puis lors du remplissage on procède par dilution pour atteindre les taux d'inoculations souhaités à 1, 2 et 5 % v/v.

En observant visuellement l'évolution des réacteurs au cours du temps, il est clair que l'effet d'épuration du milieu est atteint. Pour un inoculum à 10% v/v, il est fréquemment observé une couche de bactéries, de champignons et autres micro-organismes se développant à la surface et sur les parois du réacteur. La diminution du taux d'inoculation permet de réduire ce développement au sein des réacteurs.

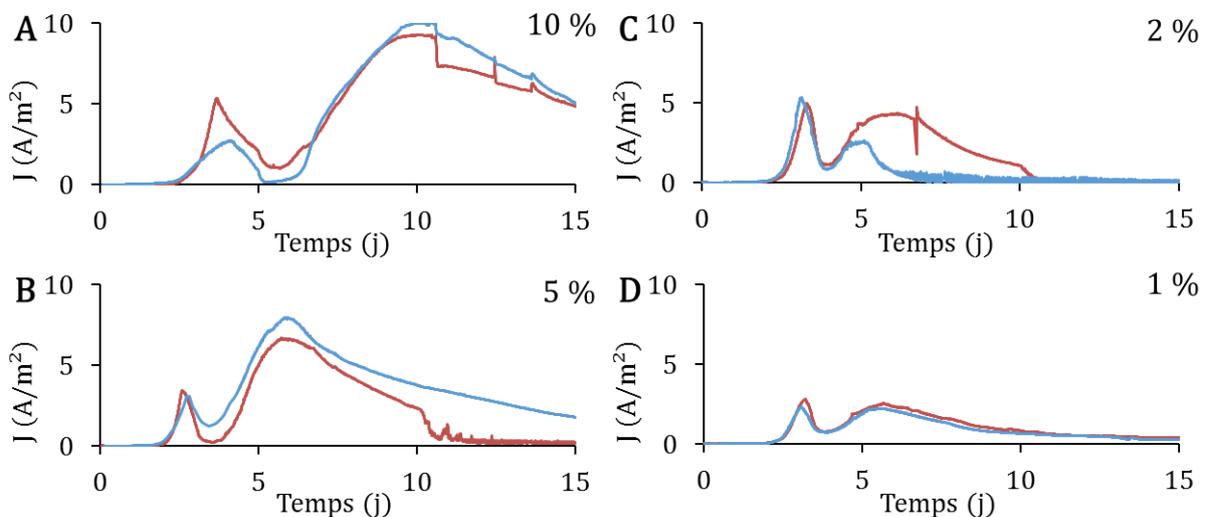


Figure 2 : Chronoampérogrammes des anodes inoculées à (A) 10, (B) 5, (C) 2 et (D) 1% v/v par des sédiments marins.

Malheureusement, les performances des bioanodes au niveau des densités de courant produites sont impactées par la diminution du taux d'inoculum (Figure 2). Les anodes formées avec 10% v/v de sédiments marins atteignent des densités de courant de 10,2 et 9,4 A/m<sup>2</sup> alors qu'une inoculation à 1% v/v ne permet pas de dépasser 2,5 A/m<sup>2</sup>. A 5% v/v d'inoculation, la diminution des performances est très modérée. Les densités maximales de courant atteintes sont de 8,5 et 7,8 A/m<sup>2</sup>. La chronoampérométrie indique une production de courant plus rapide, la

valeur maximale étant obtenue après seulement 6 jours contre 10 jours pour une inoculation à 10% v/v. Cette observation suggère un effet d'accélération de la colonisation de l'électrode, également visible sur les réacteurs inoculés à 2% et 1% v/v. Dans tous les cas, notons, mais sans pouvoir l'expliquer, la physionomie des courbes avec une production de courant en deux temps. Cette spécificité se retrouve sur la plupart des expériences effectuées en sédiments marins.

Enfin, les observations effectuées en microscopie à épifluorescence ne montrent pas de véritables améliorations liées à la diminution de la charge initiale en sédiments marins sur l'imagerie des biofilms entre les inoculations à 5 et à 10% v/v (Figure 3). Dans les deux cas, certaines zones colonisées sont très lumineuses et masquent le reste de la colonisation moins importante.

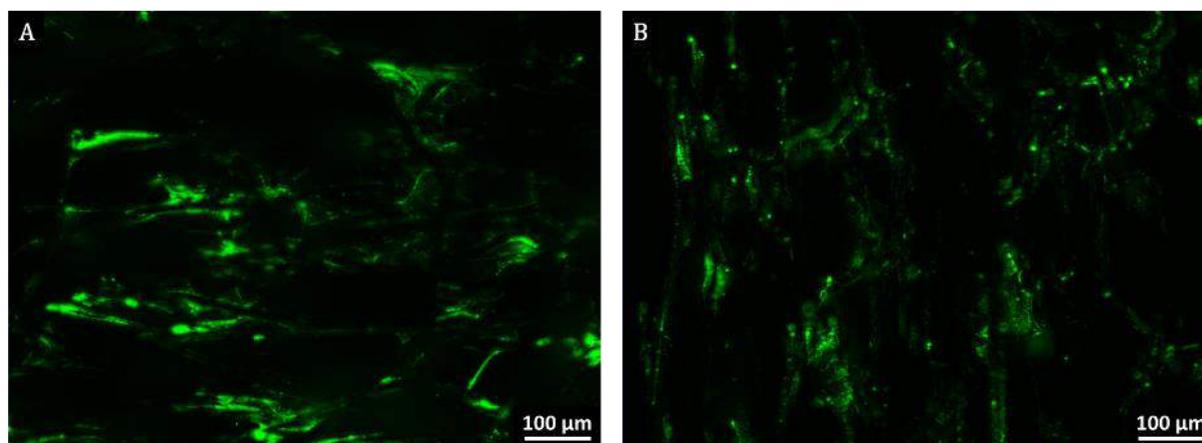


Figure 3 : Imagerie en épifluorescence de biofilms formés sur des feutres de carbone inoculés (A) à 10% et (B) 5% v/v avec des sédiments de marais salants.

L'inoculation à 5% au lieu de 10% v/v peut donc être envisagée comme solution pour « épurer » le milieu en gardant à l'esprit qu'elle affecte légèrement les performances électrochimiques du biofilm. Cependant son influence en termes d'observation microscopique n'est pas significative. Il a donc été décidé de poursuivre vers d'autres solutions d'épuration du milieu.

## 2.2. Filtration du milieu de culture après inoculation

La deuxième option envisagée pour limiter la complexité du milieu est la filtration afin d'en retirer des débris organiques et inorganiques ainsi que des organismes de taille importante tels que les champignons se développant ensuite parfois dans les réacteurs.

La procédure de préparation du milieu reste la même que celle présentée précédemment avec une inoculation à 10% v/v et le milieu est passé à travers un filtre lors du remplissage du réacteur.

Dans un premier temps, la filtration est réalisée sur un papier filtre de type filtre à café. Ce filtre en papier est formé de filaments d'environ 20 µm de large qui bloque des particules

supérieures à environ 15  $\mu\text{m}$ . Les résultats ne sont pas présentés ici car aucun courant d'oxydation n'a été détecté lors de ces expériences. Il semble dans ce cas que la porosité du filtre bien que pouvant laisser passer les cellules bactériennes soit trop sélective pour tous les éléments de type agrégat ou les débris de petite taille sur lesquels des bactéries pourraient être adhérentes. De plus certains éléments indispensables au développement des bactéries dans ce milieu pauvre pourraient avoir été éliminés lors de cette étape restant liés au support terreux.

L'essai a donc été renouvelé avec un filtre de porosité plus large. Pour la seconde série d'expériences le milieu a été filtré au travers d'une feuille d'essuie-tout, pressée en fin de filtration afin de permettre le passage d'une quantité plus importante de petites particules.

Cette filtration s'avère efficace pour limiter le développement de micro-organismes en dehors de la surface de l'électrode car, contrairement aux essais classiques à 10% v/v, aucune formation de pellicule en surface ou sur les parois en verre n'est observée. De plus, le milieu reste relativement limpide tout au long de l'expérience. En termes de performances électrocatalytiques, les deux réacteurs présentent des densités maximales de courant de 4 et 6,5  $\text{A}/\text{m}^2$  peu reproductibles (Figure 4). Ces valeurs sont bien inférieures à celle obtenues pour une inoculation équivalente sans filtration qui permettait d'atteindre 10  $\text{A}/\text{m}^2$ . Elles sont également en deçà de celles obtenues en réduisant l'inoculum à 5% v/v. Enfin, l'obtention de ces valeurs maximales de densités de courant est plus tardive, 12 et 14 jours, que pour les autres conditions testées. La filtration du milieu n'a donc pas été retenue dans le cadre de cette étude.

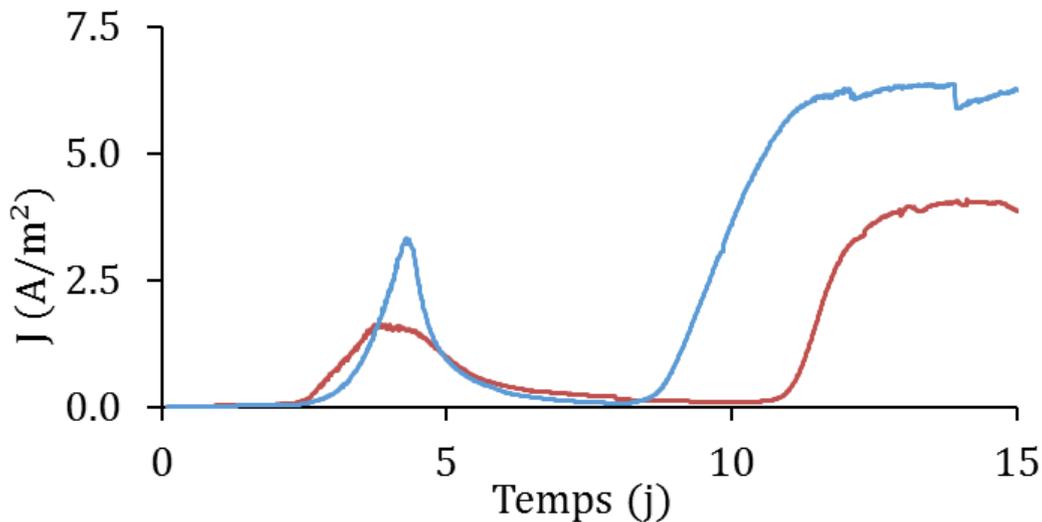


Figure 4 : Chronoampérogrammes de deux électrodes en feutre de carbone immergées dans un milieu filtré sur du papier de type « essuie tout ».

### 2.3. Passage par une électrode primaire

L'inoculation d'un réacteur à partir d'une communauté provenant d'un réacteur existant est largement répandue. Le plus souvent elle est effectuée en récupérant le biofilm d'une électrode et en le mettant en culture pour ensemercer un nouveau réacteur. Certains travaux utilisent directement une électrode formée dans un premier réacteur au contact d'un milieu complexe

chargé en particules pour inoculer un second réacteur (Liu et al., 2008). Cette technique a été employée à de nombreuses reprises au sein de l'équipe (Cercado Quezada et al., 2013; Blanchet et al., 2015) mais jamais dans le cas d'un inoculum initial de sédiments de marais salants.

La procédure utilisée ici consiste à former une première électrode dite « anode primaire » dans un réacteur selon le protocole décrit dans la section 3.3 du chapitre 2 avec une inoculation du réacteur à 10% v/v en sédiments et une polarisation à 0,1 V/ECS. Puis l'électrode étant ainsi colonisée, le réacteur est vidangé. On laisse une légère couche de sédiment dans le fond de la cuve que l'on remplit de milieu synthétique Starkey modifié. Une seconde électrode, neuve, dite « anode secondaire » est alors implantée dans le même réacteur et polarisée en même temps que l'anode primaire (Figure 5).

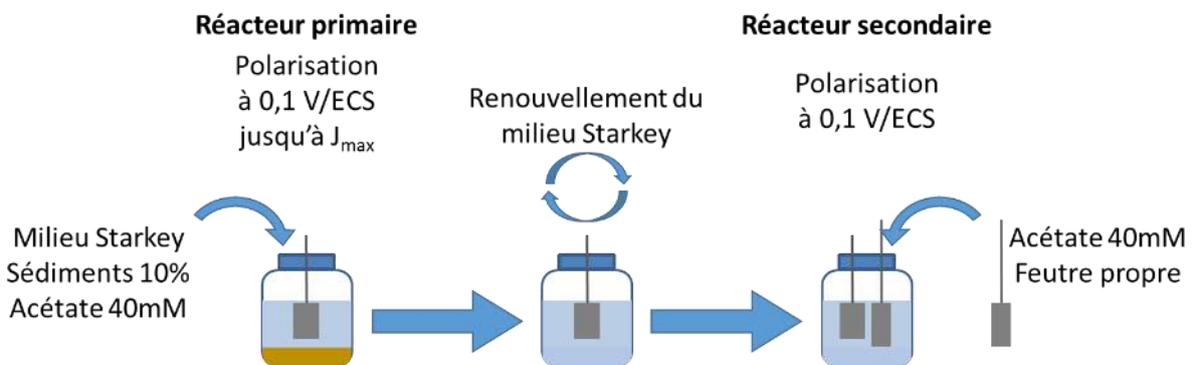


Figure 5 : Protocole d'inoculation avec étapes primaires et secondaires

La première étape consiste en la formation de deux bioanodes primaires dans deux réacteurs distincts à partir de feutre de carbone. La figure 6 permet de visualiser leur évolution en parallèle au cours du temps. Les densités de courant observées sont de 8 et 8,2 A/m<sup>2</sup> pour les deux feutres. Après 8 jours, les deux anodes ont atteint leur maximum en termes de densité de courant.

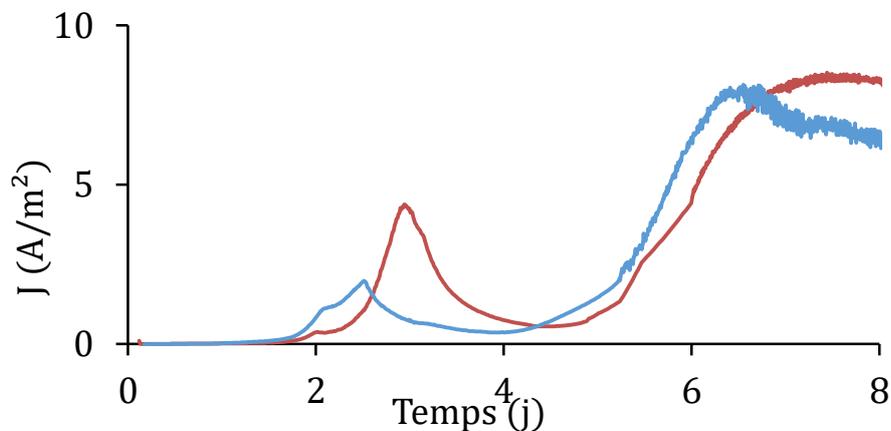


Figure 6 : Chronoampérogrammes d'anodes primaires polarisées à 0,1 V/ECS à partir de sédiments marins (10%v/v)

Après le changement de milieu, une électrode en feutre de carbone neuve est insérée dans le montage afin de former l'anode secondaire. Lors de la vidange des réacteurs, un léger dépôt de sédiments marins est laissé sciemment au fond de la cuve. En effet, il a été constaté dans des expériences non présentées ici que le remplacement total du milieu ne permettait pas de coloniser une bioanode secondaire à partir d'une anode primaire dans un milieu totalement renouvelé. Il semble que certains composés présents dans les sédiments soient indispensables au fonctionnement de ce système. Cette observation est cohérente avec les résultats précédents obtenus lors des essais de filtration du milieu.

Les deux feutres sont alors polarisés conjointement à 0,1 V/ECS pendant 15 jours afin de permettre la colonisation de l'anode secondaire à partir de l'anode primaire (Figure 7.A). Le courant ainsi mesuré englobe la contribution des deux électrodes implantées dans le même réacteur. Des voltammétries cycliques sont effectuées aux jours 5 et 10 pour observer la répartition du courant enregistré en chronoampérométrie entre les deux électrodes (Figure 7.B et 6.C). Il est ainsi possible d'évaluer leur efficacité respective.

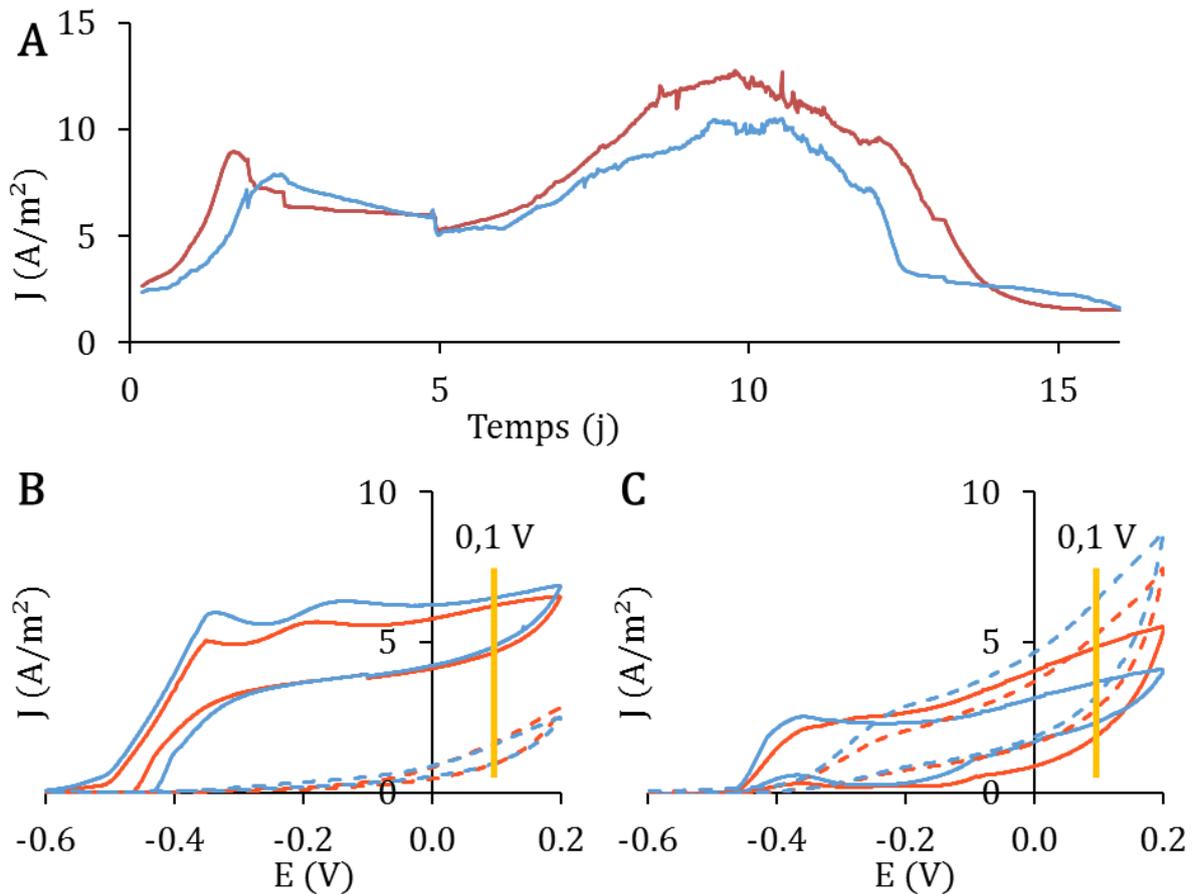


Figure 7 : (A) Chronoampérogrammes des anodes primaires et secondaires polarisées à 0,1 V/ECS pour deux réacteurs indépendants. Voltammogrammes effectués au jour 5 (B) et 10 (C) sur les électrodes primaires (traits pleins) et les électrodes secondaires (traits pointillés). La barre orange permet de visualiser le courant obtenu à 0,1 V/ECS

Les densités de courant en fin de formation des anodes primaires étaient de 6 et 8 A/m<sup>2</sup>. Un courant d'oxydation est observé dès le changement de milieu et l'ajout de la nouvelle électrode. A la reprise des acquisitions, les densités de courant sont largement inférieures avec 2,5 et 2,7 A/m<sup>2</sup>, résultat logique puisque la surface de l'électrode secondaire vierge est prise en compte dans le calcul. Cependant, il est intéressant de noter que les performances sont rapidement rétablies avec un premier maximum atteint au deuxième jour avec 7,8 et 8,8 A/m<sup>2</sup> respectivement sur les deux réacteurs. Les voltammétries cycliques effectuées le cinquième jour montrent que la contribution des électrodes secondaires à ce courant est faible et qu'il est principalement produit par l'anode primaire dans les deux réacteurs.

Puis, le courant augmente régulièrement entre le cinquième et le dixième jour. Les anodes délivrent alors le maximum de courant, avec des densités élevées de 10,3 et 12,3 A/m<sup>2</sup>. Les CV effectuées à ce moment-là montrent l'évolution des deux électrodes. Après 10 jours de contact, l'électrode secondaire a gagné en efficacité et devient même plus productive que l'anode primaire. La contribution des électrodes secondaires au courant total est respectivement de 58 et 66 %. Ce résultat valide le protocole d'ensemencement par une électrode primaire pour les systèmes inoculés avec des sédiments marins. L'inconvénient de la procédure réside dans le temps nécessaire pour développer la bioanode primaire.

Au quinzième jour, le courant retombe à zéro. A cette fin de cycle, les électrodes sont récupérées et observées au microscope à épifluorescence. Les anodes primaires sont couvertes de biofilms très épais, à l'aspect granuleux et dans lesquels des inclusions non marquées par le fluorochrome semblent indiquer la présence de particules inorganiques (Figure 8). En revanche, le biofilm présent sur les électrodes secondaires est épais, homogène et lisse. Il recouvre partiellement l'électrode avec par endroit le colmatage des espaces entre les fibres (Figure 9). Certaines parties des électrodes ne sont pas ou très peu colonisées ce qui laisse présager que la production de courant pourrait dépasser les valeurs obtenues ici si la colonisation est complète. Ce constat est encourageant car en présence d'une quantité plus importante de substrat il serait alors possible d'augmenter les performances de l'anode.

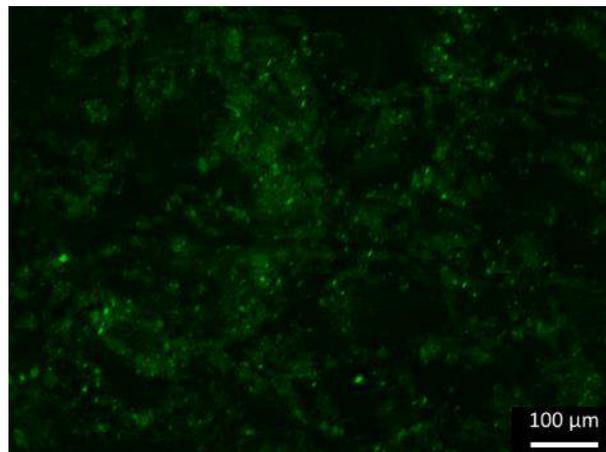


Figure 8 : Observation microscopique de biofilms formés sur une anode primaire en feutre de carbone.

L'inoculation via une anode primaire a donné des résultats satisfaisants à la fois en termes de production de courant mais aussi en vue de l'observation des biofilms en microscopie à épifluorescence. La technique est plus lourde à mettre en œuvre qu'une simple adaptation du taux d'inoculation mais semble mieux convenir aux objectifs fixés. Elle sera donc retenue pour tester les électrodes en or avec les sédiments de marais salants comme source de bactéries.

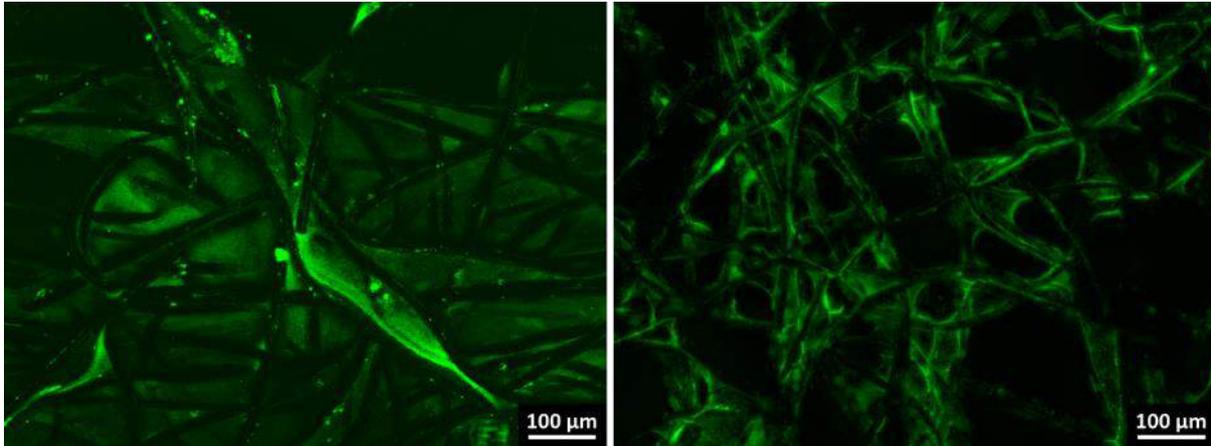


Figure 9 : Observation microscopique de biofilms formés sur les anodes secondaires en feutre de carbone.

### 3. FORMATION D'UNE ANODE SUR UNE SURFACE D'OR STRUCTUREE A PARTIR D'UNE ELECTRODE PRIMAIRE

L'électro-activité d'un biofilm sédimentaire sur une surface en or micro-structurée a été testée en ensemençant le milieu à partir d'une électrode primaire en feutre de carbone.

Partant d'un inoculum multi-espèces, une analyse des populations a été réalisée en fin d'essai pour évaluer l'impact de la sélectivité des surfaces et de la procédure associant anodes primaires et secondaires sur l'écologie du biofilm. Des séquençages de différents échantillons ont donc été effectués afin d'observer les évolutions en termes de diversité microbienne.

Pour cette série d'expériences, afin de réduire la variabilité entre les différents réacteurs tests, les anodes primaires ont été formées au sein d'un même réacteur. Six feutres de carbone sont placés dans un réacteur rempli de 500 mL de milieu de culture inoculé à 10% v/v et polarisés ensemble à 0.1 V/ECS. Le processus de formation des anodes primaires et secondaires est présenté sur la Figure 10

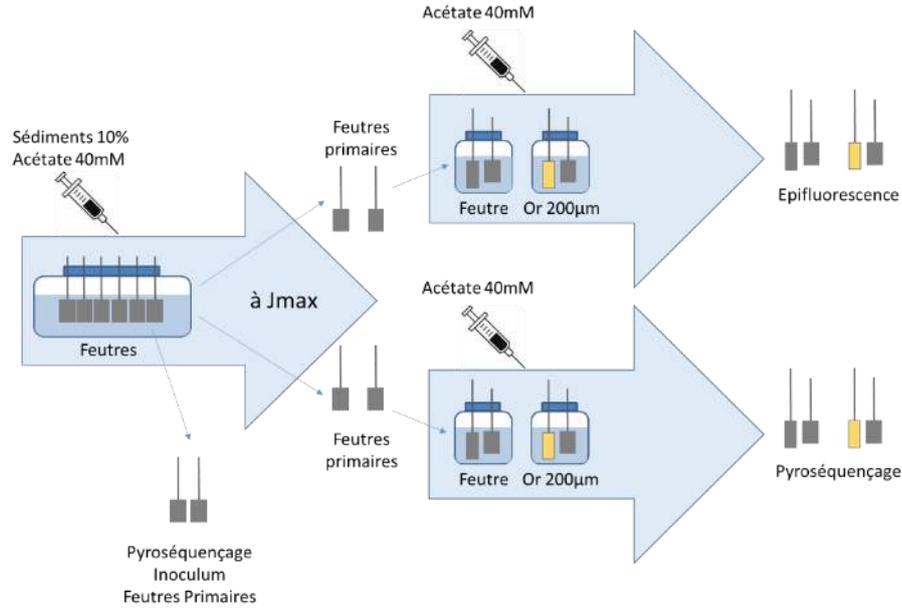
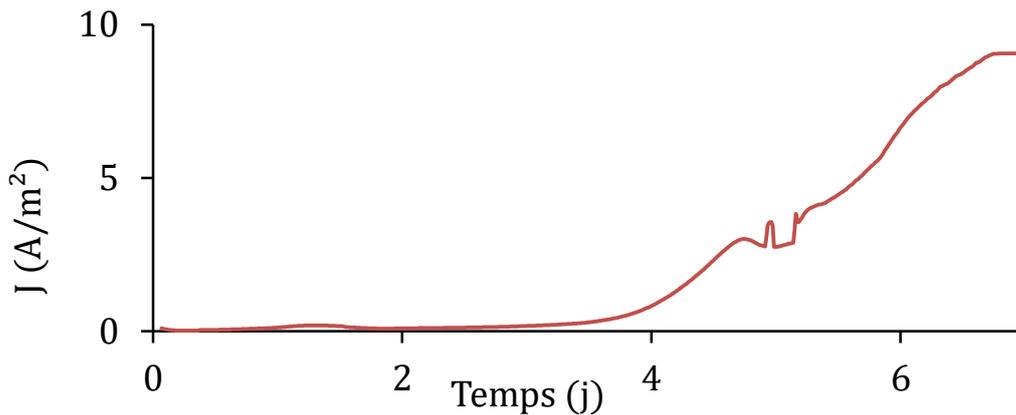


Figure 10 : Description de l'expérience d'inoculation de l'or à partir d'électrodes primaires

La formation des anodes primaires est effectuée en une semaine (Figure 11). Le signal enregistré correspond à la moyenne observée pour l'ensemble des 6 feutres. A ce stade, les électrodes sont polarisées tour à tour pendant 1h afin de mesurer le courant produit par chaque électrode indépendamment. Les feutres primaires produisent entre 8.5 et 10,5 A/m<sup>2</sup> après 7 jours. La réalisation de CV après cette phase de polarisation, courbes non présentées, a permis de s'assurer que les 6 feutres ont un comportement électrochimique similaire en fin d'expérience.



	Feutre 1	Feutre 2	Feutre 3	Feutre 4	Feutre 5	Feutre 6
Densités de courant après 7 jours (A/m <sup>2</sup> )	8,81	9,46	9,15	9,23	8,52	10,57

Figure 11 : Chronoampérogramme pour les 6 anodes primaires en feutre de carbone formées simultanément et densités de courant obtenues en fin de formation pour chaque électrode primaire.

A l'issue de cette phase de formation, deux anodes primaires (Feutre 1 et 2) sont utilisées pour inoculer des réacteurs contenant une électrode secondaire en feutre (R1 et R2), deux autres (Feutre 3 et 4) pour inoculer des réacteurs avec des électrodes en or structurées avec des piliers espacés de 200  $\mu\text{m}$  (R3 et R4). Les deux dernières présentant les densités de courant les plus éloignées (Feutre 5 et 6) sont conservées pour l'analyse des populations sur les électrodes primaires. Les réacteurs sont préparés comme indiqué à la section 2.3 précédente, la couche de dépôt sédimentaire est récupérée pour les 6 cuves dans celle ayant permis la formation des anodes primaires. Pour chaque réacteur, les électrodes primaires et secondaires sont polarisées conjointement à 0,1 V/ECS. Des CV sont effectuées aux cinquième et dixième jours afin de caractériser chaque bioanode individuellement.

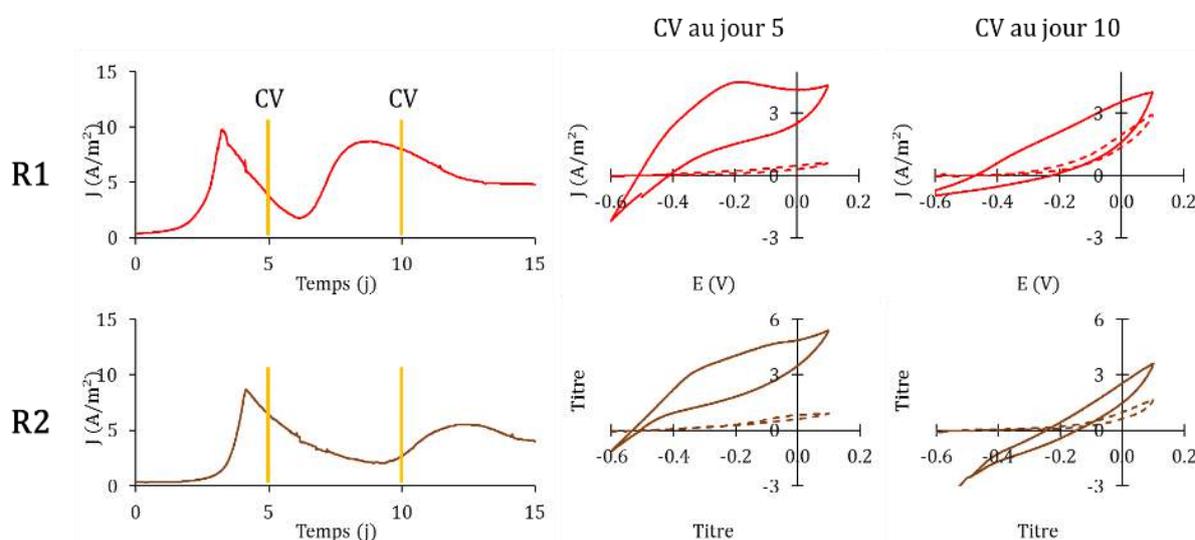


Figure 12 : Chronoampérogrammes enregistrés dans les réacteurs contenant une anode secondaire en feutre de carbone. A droite : Voltammogrammes réalisés aux jours 5 et 10 sur l'anode primaire en feutre (trait plein) et sur l'anode secondaire en feutre (trait pointillé)

Les chronoampérogrammes sont différents de ceux obtenus lors de la mise au point du protocole. Le pic initial est plus prononcé avec une phase de diminution plus importante. Sur le second pic, les densités de courant obtenues pour les réacteurs R1 et R2 sont inférieures aux précédentes (Figure 12). Toutefois, les électrodes primaires présentent de bonnes capacités électrocatalytiques. La densité de courant enregistrée à la connexion avec les électrodes secondaires n'est que de 1 A/m<sup>2</sup> contre 3 A/m<sup>2</sup> précédemment. Le maximum de 10,1 et 8,7 A/m<sup>2</sup> est atteint pour R1 et R2 respectivement, ces valeurs sont à comparer aux 10 et 12 A/m<sup>2</sup> de l'expérience précédente. La cinétique de colonisation semble plus lente cette fois, le premier pic de densité de courant observé au jour 2 initialement n'est atteint ici qu'après 4 jours. Il semble que la nouvelle technique consistant à former toutes les anodes primaires ensemble sur un même lot soit moins performante. La surface plus importante de feutre disponible pour un même volume, la caractérisation individuelle des électrodes impliquant la déconnexion temporaire des autres ou le transfert dans un nouveau réacteur pourraient avoir altéré les

performances des anodes primaires. Les variations de densité observées restent cependant tout à fait acceptables et dans la gamme habituelle de reproductibilité sur ce type d'inoculum complexe.

Les CV effectuées au jour 5 illustrent le démarrage de l'activité des anodes secondaires en feutre. Leur contribution au courant total mesuré est respectivement de 11 et 12 % pour R1 et R2. Cette fois, l'anode secondaire n'a pas pris le pas sur l'anode primaire. Après 10 jours, la contribution en courant est de 42 et 32% contre 58 et 66% précédemment (Figure 12). La transition entre l'anode primaire et l'anode secondaire est donc moins efficace ici et les résultats obtenus sur l'or structuré à suivre sont analysés en tenant compte de cette observation.

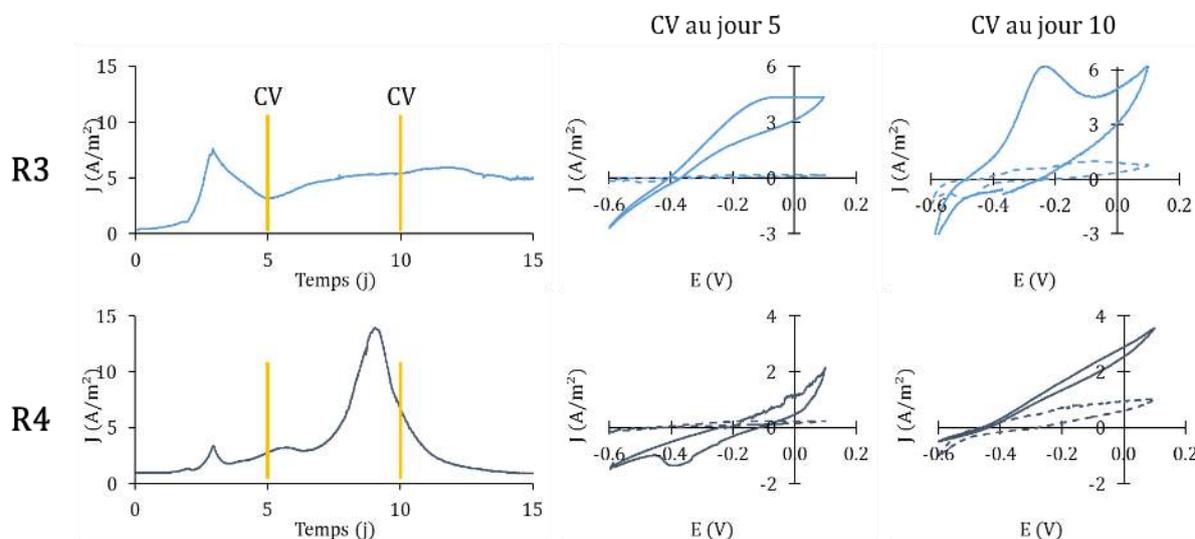


Figure 13 : Chronoampérogrammes enregistrés dans les réacteurs contenant une anode secondaire en or structuré. A droite : Voltammogrammes réalisés aux jours 5 et 10 sur l'anode primaire en feutre (trait plein) et l'anode secondaire en or (trait pointillé)

Les mesures effectuées sur les réacteurs R3 et R4 contenant une électrode secondaire en or sont moins reproductibles que celles observées sur les réacteurs avec des anodes en feutre. Pourtant, les électrodes primaires utilisées présentent des performances initiales comparables à celles de R1 et R2 (8,81 et 9,46 contre 9,15 et 9,23 A/m<sup>2</sup>).

Lors de la connexion avec l'électrode secondaire, la densité de courant est de l'ordre de 1 A/m<sup>2</sup>. Le premier maximum est atteint juste avant le quatrième jour. La Figure 13 montre clairement que le second réacteur R4 présente un comportement différent des autres. Le premier pic est relativement faible, autour de 3,5 A/m<sup>2</sup>. Puis on observe une forte augmentation du courant avec des densités de l'ordre de 15 A/m<sup>2</sup>. Le réacteur R3, quant à lui, présente un profil similaire à ceux des réacteurs R1 et R2 avec feutre. Sur les CV effectuées au cinquième jour, le courant fourni par les anodes primaires de R3 et R4 représente la majorité du courant produit, ceux imputables aux anodes secondaires en or ne sont pas significatifs à 0,1 V/ECS. Néanmoins, au jour 10, les anodes secondaires en or sont responsables respectivement de 14 et 22 % du courant total. Dans le réacteur R4, où sont atteints rapidement 15 A/m<sup>2</sup>, l'électro-

activité de l'anode secondaire en or semble s'être fortement développée en 5 jours. La mesure n'ayant pu être effectuée au maximum de production, il est donc impossible de savoir quelle est l'exacte contribution de l'or à ce stade. Toutefois, le développement d'un biofilm électroactif efficace sur l'électrode d'or est indéniable (Figure 13). A noter cette fois une franche amélioration des performances de l'électrode primaire.

Lors de l'observation des voltammogrammes, un aspect attire l'attention. Sur la CV effectuée au jour 10 sur l'électrode primaire en feutre de carbone du réacteur R3 (Figure 13), un pic d'oxydation apparaît, centré vers -0.25 V/ECS. Ce genre de pic a déjà été observé dans plusieurs études (Liu et al., 2005; Pocaznoi et al., 2012c) et a été théorisé par le groupe de D. Lovley (Strycharz et al., 2011). Le modèle théorique décrit la cinétique du transfert électronique au sein d'une bioanode en 5 étapes successives:

- 1 : la diffusion de l'acétate vers le biofilm et au sein du biofilm,
- 2 : l'oxydation de l'acétate au sein des cellules microbiennes,
- 3 : le transfert d'électrons de l'intérieur de la cellule vers le système de transport extracellulaire (médiateur, pili, réseau de cytochromes...),
- 4 : le transport des électrons au sein de la matrice du biofilm vers la surface de l'électrode,
- 5 : le transfert électronique au niveau de la surface de l'électrode

Les voltammogrammes théoriques tracés avec ce modèle ne présentent un pic que lorsque la troisième étape est limitante. Suivant ce modèle, le pic observé avec l'électrode primaire au jour 10 dans le réacteur R3 indique que la connexion électrochimique entre les cellules microbiennes et le système de transport des électrons au sein de la matrice constitue l'étape limitant la cinétique de cette bioanode. Il est possible que le biofilm primaire formé sur le feutre dans R3 soit effectivement en train de subir soit un vieillissement soit une restructuration qui entrainerait cette limitation de la cinétique au niveau cellulaire. Cependant, un suivi plus régulier des électrodes serait nécessaire pour corrélérer de façon certaine ce pic d'oxydation avec une modification des propriétés du biofilm.

En fin d'expérience, les duplicats ont été divisés en 2 lots. Les électrodes des réacteurs R1 et R3 ont été observées en microscopie à épifluorescence pour caractériser la structure spatiale du biofilm (Figure 14), celles des réacteurs R2 et R4 ont été destinées à l'analyse des populations par pyroséquençage (Figure 15).

Les anodes primaires formées sur feutre de carbone sont relativement semblables à celles décrites dans les sections précédentes. Le biofilm est très épais, dense par endroit et présente un aspect granuleux. Le biofilm semble se développer initialement le long des fibres de carbone puis gagne ensuite l'espace entre les fibres pour combler le réseau. A l'inverse, le biofilm formé sur l'électrode en feutre secondaire de R1 apparaît lâche et peu dense, d'un aspect général moins irrégulier sur les parties colonisées (pas de granules). Il ne semble pas formé préférentiellement le long des fibres mais se développe assez librement dans l'espace inter-fibres. Sur l'électrode secondaire en or structuré, on observe un biofilm bien développé, recouvrant à la fois les piliers et la base de l'électrode. Le biofilm observé est très homogène sur la base de l'électrode (Figure 14). L'hypothèse émise est que le réseau de piliers pourrait agir en partie comme un filtre permettant la formation d'un biofilm plus épuré. Il est important de noter que le haut des piliers semble très fortement colonisé du fait de la saturation de la couleur mais ceci est un effet lié à

l'acquisition des données. En effet, la lumière pénètre mal dans le réseau de piliers de 500  $\mu\text{m}$  de haut. Il a été nécessaire de forcer l'exposition de l'image. Les parties hautes qui elles captent normalement la lumière sont donc surexposées.

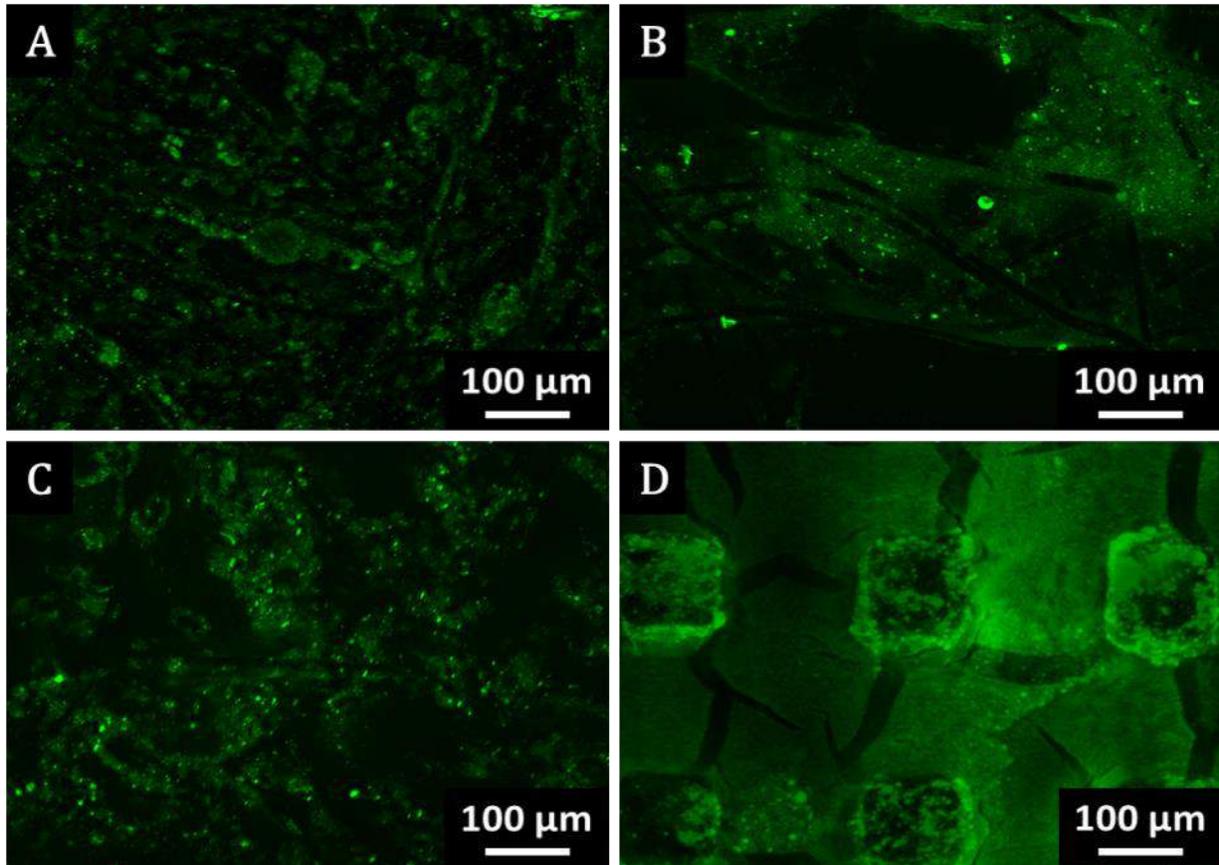


Figure 14 : Observation microscopique des biofilms formés dans le réacteur R1 sur l'anode primaire en feutre (A) et l'anode secondaire en feutre (B) ; et ceux formés dans le réacteur R3 sur l'anode primaire en feutre (C) et sur l'anode secondaire en or structuré avec des piliers (D).

Malgré une indéniable efficacité pour le feutre de carbone pour lequel on obtient une électroactivité presque équivalente de l'électrode secondaire, la transition du biofilm de l'anode primaire vers l'anode secondaire reste assez pauvre et lente. A la vue de ces résultats encourageants, nous constatons que la technique de passage par une anode primaire reste largement perfectible. Des améliorations de la procédure de formation de l'anode primaire, des conditions de transfert de la bioanode primaire d'un réacteur à l'autre, en particulier une anaérobiose plus stricte, et un positionnement respectif des deux électrodes seraient à optimiser. Ces résultats sont novateurs car, à notre connaissance, la procédure n'avait jamais été tentée à partir de sédiments marins. Nous avons complété ce travail par une analyse des communautés bactériennes en fin d'expérience afin de voir l'impact de l'inoculation par le biofilm anodique et d'identifier une éventuelle sélection des populations sur les électrodes secondaires. La composition bactérienne pourrait-elle aider à expliquer les phénomènes observés ?

L'analyse de la diversité microbienne est effectuée sur dix échantillons (Figure 15). La liste, ci-dessous, précise l'origine de chaque échantillon et la dénomination correspondante.

Origine de l'échantillon	Nom de l'échantillon
Sédiments de marais salants initial	Sédiments
Milieu de culture du réacteur de formation de l'anode primaire	Milieu I <sup>r</sup>
Biofilms de bioanodes primaires à la fin de leur formation (duplicat)	Anode I <sup>r</sup> init 1 Anode I <sup>r</sup> init 2
Milieus de culture des réacteurs de formation des anodes secondaires :	
Réacteur avec anode secondaire en feutre R2	Milieu II <sup>r</sup> R2
Réacteur avec anode secondaire en or R4	Milieu II <sup>r</sup> R4
Biofilms de bioanodes primaires à la fin :	
Anode primaire réacteur R2	Anode I <sup>r</sup> fin 1
Anode primaire réacteur R4	Anode I <sup>r</sup> fin 2
Biofilms de bioanodes secondaires à la fin :	
Anode secondaire en feutre R2	Anode II <sup>r</sup> fin 1
Anode secondaire en or R4	Anode II <sup>r</sup> fin 2

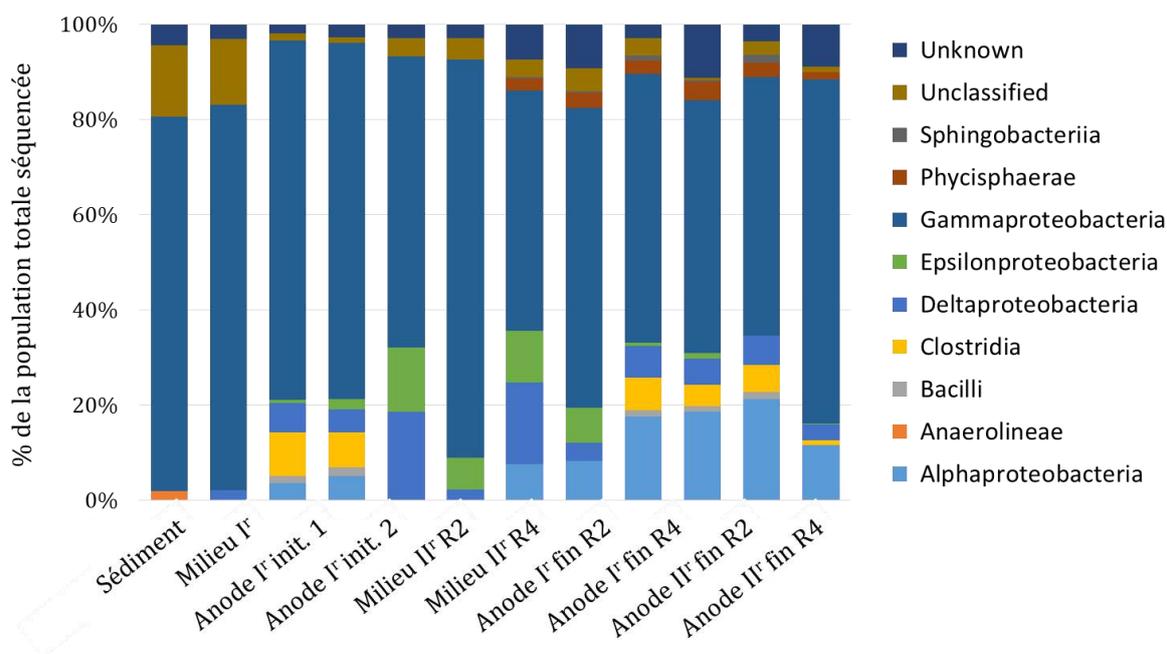


Figure 15: Résultats de l'analyse par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 16S: Espèces bactériennes en pourcentage de la population totale séquencée.

La première indication de ces données de pyroséquençage confirme la sélection exercée par les anodes sur les populations. On observe clairement la différence entre la nature des communautés identifiées dans les sédiments et celles des biofilms anodiques sur les électrodes primaires et secondaires. Cet effet sélectif a déjà été rapporté pour les sédiments de marais salant par Rousseau (2013) et sur les lixiviats de terreau (Oliot, 2017).

Cependant, cette fois, la population initiale des sédiments marins, source de l'inoculum bactérien, est largement dominée par la classe des *Gammaproteobacteria*. 73% des séquences identifiées correspondent à *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (10%) et *Marinobacterium sp* (63%). Le phylotype *Marinobacter* a déjà été identifié dans de fortes proportions dans des biofilms d'anodes Rousseau et al. (2014), mais, il n'était présent qu'à 1,3% dans les sédiments initiaux correspondants. Dans ce travail, la présence à un tel niveau dans l'inoculum initial est donc surprenante. Une proportion élevée se retrouve dans l'ensemble des échantillons, le phylotype *Marinobacter* représente toujours au minimum 42% des séquences. Pour la suite, nous concentrerons notre attention sur les autres classes et genres.

Alors qu'elles n'étaient pas détectées significativement dans l'inoculum, des espèces des classes Clostridia (de 1 à 9%) et, dans une moindre mesure, Bacilli (1 à 2%) sont présentes uniquement sur les électrodes. Une seule espèce de Bacilli a été retrouvée mais n'a pas pu être identifiée. En ce qui concerne la classe des Clostridia, les électrodes présentent jusqu'à 5% de *Clostridium* et de *Fusibacter*. Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies et 7 espèces appartenant à ce genre ont déjà été identifiées comme électroactives (Koch et Harnisch, 2016). L'enrichissement spécifique des électrodes en *Clostridium* pourrait donc être une des sources de production de courant dans nos systèmes. Notons que la proportion de *Clostridium* sur l'électrode d'or est très faible. La nature de la surface semble donc influencer l'équilibre des populations électroactives. L'or pourrait être moins favorable au développement des bactéries de ce genre, ce qui pourrait expliquer en partie les différences de courant obtenues entre l'or et le feutre.

Une autre classe, les *Deltaproteobacteria*, est apparue au cours des expériences. Les électrodes en comptent en moyenne 5% et seulement deux espèces ont été identifiées dans les biofilms anodiques: *Desulfuromonas acetoxidans* (de 3 à 5%) et une espèce de *Geobacteraceae* (1 à 3%). L'espèce *Desulfuromonas acetoxidans* a déjà été reconnue comme électroactive (Bond et al., 2002). Elle est capable d'oxyder l'acétate pour produire du courant. L'autre espèce de la famille des *Geobacteraceae*, famille très présente dans les études sur l'électroactivité, n'a pu être identifiée plus précisément. Une dizaine d'espèces de cette famille, dont l'organisme de référence *Geobacter sulfurreducens*, sont décrites comme électroactives (Koch et Harnisch, 2016). Cette espèce de *Geobacteraceae* retrouvée uniquement sur les électrodes est donc susceptible d'être impliquée dans la production de courant.

La classe des *Epsilonproteobacteria* n'est détectée que sur les électrodes primaires et dans le milieu de culture des réacteurs secondaires R2 et R4. Seules trois espèces apparaissent en quantité significative. En particulier, deux espèces d'*Arcobacter* sont présentes uniquement sur les électrodes. Elles sont connues pour être capables de dégrader l'acétate ou le lactate et produire du courant (Pereira-Medrano et al., 2013). Ces deux espèces sont retrouvées

uniquement sur les électrodes primaires, cela pourrait traduire leur faible propension à migrer vers une électrode neuve.

Enfin, les *Shingobacteriia* et les *Phycisphaerae* apparaissent dans les réacteurs secondaires et les électrodes secondaires. Pour les *Shingobacteriia*, un enrichissement a été identifiées lors d'études sur des électrodes réversibles avec une prédominance dans les communautés anodiques mais leur électroactivité reste encore à démontrer (Yun et al., 2016). Les bactéries de la classe *Phycisphaerae* n'ont jamais été rapportées comme électroactives. Elles pourraient bénéficier d'un environnement plus favorable à leur développement grâce au nouvel équilibre des populations sans toutefois participer à la génération du courant.

Différentes espèces électroactives ont donc pu être identifiées sur les électrodes alors qu'elles n'étaient pas en proportions significatives dans l'inoculum sédimentaire initial. On assiste bien à un enrichissement logique des électrodes en bactéries électroactives. Le phylotype *Marinobacter* reste prépondérant dans tous les cas. Cependant en observant plus précisément les communautés des électrodes primaires et secondaires, il semble que certaines de bactéries telles *Arcobacter* ne soient pas transférées sur l'anode secondaire. Ceci pourrait-il expliquer partiellement les performances moindres de ces anodes ?

Plus spécifiquement, dans les conditions expérimentales imposées, l'électrode secondaire en or est moins propice au développement de bactéries électroactives avec une très faible présence des *Clostridium*. Le changement de la nature de la surface entre électrode primaire et secondaire n'est peut-être pas étranger à cela. Il est possible que la bactérie présente une affinité moindre pour l'or par rapport aux fibres de carbone.

Ces analyses permettent de comprendre en partie les différences observées sur la production de courant et d'ouvrir quelques pistes de réflexion pour envisager des techniques d'enrichissement ciblées envers les espèces électroactives identifiées.

#### 4. FORMATION D'UNE ANODE SUR OR EN INOCULATION DIRECTE

A ce stade, il n'a pas été possible de former une bioanode efficace sur une électrode en or à partir d'une anode primaire. Le courant délivré demeure faible. Le choix est donc fait de revenir à une inoculation directe à partir de sédiments pour tester les électrodes d'or microstructurées.

Les tests sont réalisés sur quatre électrodes : deux électrodes d'or nano-rugueux NG et deux électrodes d'or  $\mu$ P200NG (réseau de piliers de 500  $\mu$ m de haut espacés de 200  $\mu$ m). L'ensemencement est réalisé à 5% v/v en sédiments dans des réacteurs de 500mL de volume utile.

Le courant commence à augmenter après 2 jours avec l'établissement progressif d'un biofilm électroactif (Figure 16). Pour les électrodes NG, les densités de courant continuent de croître jusqu'au sixième jour puis plafonnent autour de  $0.67 \pm 0.05$  A/m<sup>2</sup>. Le courant se maintient alors pendant environ 4 jours. Les électrodes  $\mu$ P200NG produisent des densités de courant beaucoup plus élevées. Le courant s'intensifie pendant 9 jours pour atteindre un plateau autour de  $2,6 \pm 0.1$  A/m<sup>2</sup>. Par contre, la vitesse d'augmentation du courant est similaire pour les deux types d'électrodes (droites noires sur la Figure 16) avec une valeur de 0.37 A/m<sup>2</sup>/j. Ainsi,

le développement du biofilm s'effectue à la même vitesse sur les deux types d'électrodes, mais développer un biofilm électroactif couvrant l'ensemble des piliers des anodes  $\mu\text{P200NG}$  nécessite plus de temps. Ce résultat apparaît logique vu que la surface active de l'électrode est plus élevée du fait de la structuration. Les densités de courant mentionnées précédemment étant exprimées par rapport à la surface projetée de  $1\text{ cm}^2$ , il est donc cohérent d'atteindre des densités de courant plus élevées sur l'or microstructuré. Cette différence de surface suffit-elle à expliquer l'écart observé ?

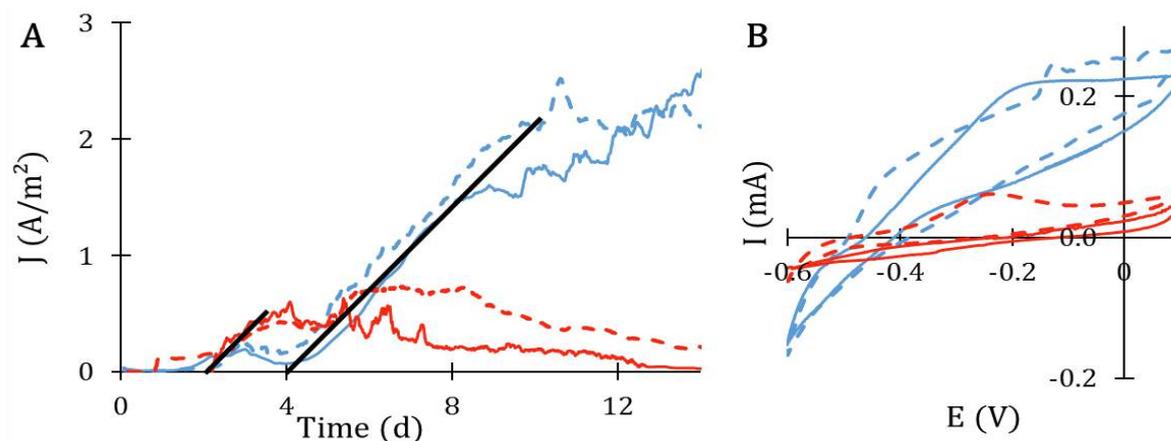


Figure 16 : (A) Chronoampérommes avec polarisation à  $0,1\text{ V/ECS}$  obtenus lors de l'inoculation à partir de sédiments marins à 5% d'électrodes d'or plan (courbes grises) et d'or microstructuré (courbes noires). La ligne noire matérialise le taux moyen d'augmentation du courant lors du développement du biofilm. (B) Voltammogrammes au jour 10 effectués à  $1\text{ mV/s}$  entre  $0,1$  et  $-0,6\text{ V/ECS}$ .

La surface active du réseau de piliers a été alors estimée par méthode électrochimique, elle est de  $3,26\text{ cm}^2$ . Le rapport entre les densités de courant mesurées est de 3,9 soit légèrement plus élevé que le rapport des surfaces. Les électrodes d'or microstructurées présentent de performances respectables. En exprimant les densités de courant par rapport à la surface réellement accessible pour le biofilm, les valeurs respectives sont de  $0,67 \pm 0,05\text{ A/m}^2$  pour les électrodes NG et  $0,80 \pm 0,03\text{ A/m}^2$  en présence de piliers. La structuration des électrodes par des piliers augmente donc les capacités électrocatalytiques du biofilm. Cette augmentation pourrait être due au fait que les microstructures génèrent des effets de bords au niveau des arrêtes des piliers. Ces effets de bords sont susceptibles d'induire des modifications de la distribution des lignes de champs lié à un effet de type micro-électrode. Ces conditions pourraient favoriser le transfert électronique au sein du biofilm et améliorer ainsi ses caractéristiques électroactives comme cela a été observé pour des ultramicroélectrodes par Pocznoi et al. (2012b).

Enfin, les vitesses identiques d'augmentation du courant sur les deux types d'électrodes confirment l'absence de limitation et le développement équivalent du biofilm sur les électrodes NG et  $\mu\text{P200NG}$ . Le phénomène de limitation observé sur les mêmes électrodes avec une culture pure de *G. sulfurreducens* n'apparaît plus. Un milieu plus complexe avec un inoculum multi-espèces permettrait donc de s'affranchir des limitations dues à l'acidification.

L'observation au microscope à épifluorescence en fin d'expérience (Figure 17) montre que l'électrode d'or NG est recouverte entièrement d'un biofilm dense. Dans le cas des piliers, le biofilm est également présent sur l'ensemble de la surface. On observe également des « structures » ou « ponts » de biofilm entre les piliers. Contrairement à ce qui a été observé sur les piliers pour les cultures pures de *G.sulfurreducens*, ces connexions ne sont pas des artéfacts. Il y a trop de biofilm et il est trop dense pour les attribuer à un biais dû au protocole de marquage des cellules par le fluorochrome. La formation de biofilm entre les piliers pourrait expliquer la production de courant plus importante sur les réseaux de piliers que celle couplée à un simple effet de surface.

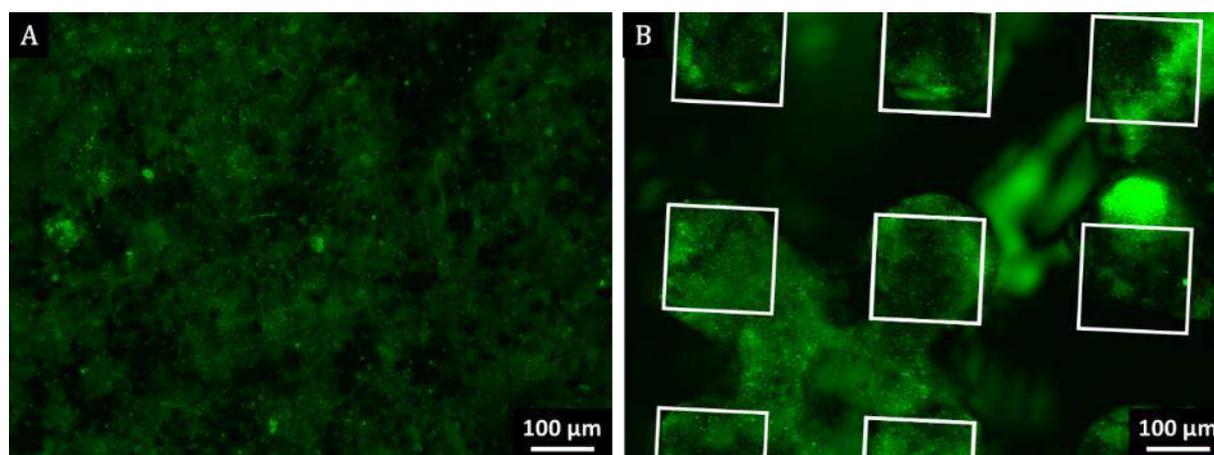


Figure 17 : Observation microscopique de biofilms formés (A) sur l'anode NG et (B) sur l'anode en or structuré avec des piliers  $\mu$ P200NG. Les carrés définissent l'implantation des piliers.

## 5. CONCLUSION QUANT A L'UTILISATION DE L'OR AVEC UN INOCULUM SEDIMENTAIRE

Après avoir démontré de bons résultats en culture pure, le passage à un inoculum multi-espèces provenant de sédiments de marais salants représentait un challenge pour l'utilisation de l'or en tant que bioanode. Les résultats obtenus au cours de ces expériences sont en demi-teinte. D'un côté, l'or n'a pas très bien répondu aux différentes techniques d'inoculation testées. L'utilisation d'une électrode primaire a été envisagée pour optimiser la formation d'un biofilm plus efficace mais les performances des biofilms formés sur l'or sont restées sensiblement les mêmes que celles de 1 à 2 A/m<sup>2</sup> obtenues lors des premières expériences avec 10% de sédiments en inoculation directe sur de l'or lisse (Chapitre 3, section 5.2). La technique peut cependant permettre d'obtenir de meilleurs résultats à l'avenir si une optimisation est effectuée. Le potentiel pour sélectionner les bactéries électroactives dans un premier temps est important et pourrait permettre la formation d'un biofilm aux caractéristiques améliorées.

L'utilisation de structures à la surface des anodes d'or a démontré un bon potentiel et a permis d'augmenter la production de courant. L'effet couplé du gain de surface active et de la formation de biofilm entre les piliers pourrait permettre d'obtenir une biomasse adhérente à

l'électrode plus importante que pour une anode plane. Il serait ainsi peut-être envisageable d'améliorer les performances de ces bioanodes sur le long terme. Toutefois, si le développement du biofilm couvrant se poursuit, ne risque-t-il pas de gommer l'effet structuration ? Cette hypothèse devra être vérifiée en maintenant la polarisation sur plusieurs ajouts d'acétate.

Ces résultats constituent des avancées intéressantes en vue de l'implantation des électrodes dans un dispositif PCM en conditions sédimentaires. Des optimisations plus poussées seront certes nécessaires. Les enseignements quant à l'impact de la structure de l'électrode sur la formation du biofilm et son efficacité restent cependant encore faibles. Cela conforte la décision d'effectuer les travaux de recherche plus fondamentaux en culture pure. Enfin un biofilm constitué d'une population multi-espèces devrait être un gage d'une plus grande robustesse face aux variations des conditions environnementales. Toutes les bactéries n'étant pas affectées de la même façon, un pool microbien plus complexe pourrait permettre de conserver de bonnes capacités de production de courant.

L'utilisation des sédiments ne peut représenter une voie d'investigation indépendante du fait de la complexité du milieu. Nous avons prouvé qu'elle n'en demeure pas moins réalisable.



# *Conclusions générales*



L'étude des propriétés électrochimiques des biofilms a pris un formidable essor depuis la découverte, au début des années 2000, de leur capacité à catalyser les réactions d'anode de piles à combustible. Le développement d'une couche catalytique de micro-organismes dans les piles à combustible microbiennes s'effectue spontanément et le biofilm électro-catalytique s'adapte à son environnement. Les impacts de nombreux paramètres environnementaux (substrat, milieu, matériau d'électrode, potentiel, température...) sur les biofilms électroactifs ont été étudiés et pour la plupart considérablement optimisés. Les mécanismes de transfert d'électrons et les voies métaboliques mis en jeu ont été l'objet de nombreux travaux mais de nombreuses questions restent en suspens quant aux règles régissant les microbiotes électro-catalytiques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du projet Koropokkuru. L'objectif principal de ce projet est d'avancer dans la compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent les interfaces biofilm/électrode. A terme, il s'agit de développer une application tournée vers l'alimentation électrique de capteurs autonomes distribués dans l'environnement. L'approche innovante apportée par le projet Koropokkuru repose sur l'utilisation des technologies microsystèmes pour forger de nouveaux outils d'investigation qui sont ensuite couplés aux outils analytiques plus courants de l'électrochimie et de la microscopie. Les technologies microsystèmes sont encore peu exploitées comme outils de recherche dans le domaine de l'électrochimie électro-microbienne, alors qu'elles offrent les échelles pertinentes, de quelques nanomètres à quelques centaines de micromètres, pour l'investigation locale des biofilms. Nous espérons que ces travaux de thèse ont contribué à l'avancée des connaissances dans le domaine et surtout à démontrer l'intérêt des micro-technologies pour ouvrir des pistes de recherche innovantes.

Le premier objectif de la thèse était d'arrêter les différents choix nécessaires pour la suite des travaux. En termes de matériau d'électrode, le nickel et l'argent ont été rapidement écartés puis, dans un second temps, le cuivre a également été abandonné notamment à cause de l'absence de croissance de *Geobacter sulfurreducens* à sa surface. L'or a donné des résultats prometteurs avec des densités de courant entre 3 et 6 A.m<sup>-2</sup> avec *G. sulfurreducens* et des performances similaires lors de l'inoculation avec des sédiments marins. A ce stade, les performances étaient en deçà de celles observées sur le graphite mais sur une surface d'or qui n'est pas optimisée et laissait donc une large marge de progression. Au-delà de l'importance de ces résultats pour la suite de la thèse, ils représentent aussi la première mise en évidence de la formation d'une bioanode à partir de sédiments marins sur de l'or.

La deuxième partie de ce travail de thèse a porté sur l'optimisation de la surface par la mise en œuvre de rugosités micrométriques. Des densités de courant de 14 A/m<sup>2</sup> ont été obtenues avec les électrodes les plus rugueuses ( $S_a = 6,7 \mu\text{m}$ ) proche de la valeur maximale reportée dans la bibliographie pour l'or, de 16 A/m<sup>2</sup> (Liu et al., 2010). Notons que cette valeur a été atteinte dans des conditions très particulières, grâce à l'effet ultra-microélectrode. La caractérisation précise et quantitative de la topographie de ces surfaces a permis de mettre en évidence que l'augmentation de la densité de courant produite est directement corrélée à l'évolution du paramètre de rugosité  $S_a$  et non pas à la surface active. Si une surface active plus importante est forcément un atout pour la formation d'une bioanode, c'est bien la rugosité qui sera le paramètre à optimiser lors de la conception des électrodes. Rappelons à ce propos que la mesure de la surface active par électrochimie, comme nous l'avons réalisée dans ces travaux

de thèse, ne peut donner qu'une évaluation ayant en fait peu de rapport avec la surface réellement exploitable par les micro-organismes. La mesure électrochimique repose sur la couverture de la surface par quelques couches atomiques d'oxydes, alors que les cellules microbiennes ont un encombrement de l'ordre du micromètre.

Le principal avantage de la rugosité qui a été créée ici par électrodéposition d'or est de modifier l'équilibre des forces mises en jeu dans l'adhésion des bactéries. La surface d'accroche est augmentée par la structure ramifiée du dépôt à l'échelle de la centaine de nanomètres, alors que les cavités micrométriques offrent des protégées des forces de cisaillement. Cela permet d'assurer la formation rapide d'un biofilm totalement recouvrant contrairement à la colonisation aléatoire observée sur l'or nano-rugueux.

Au sein des cavités micrométriques, l'examen attentif de la structure du biofilm nous a amené à supposer que des mécanismes spécifiques pourraient être mis en jeu à cause de la concentration cellulaire plus élevée et de la possible accumulation locale de composés moléculaires. La présence de cavités pourrait ainsi accélérer localement la maturation du biofilm. Les techniques analytiques utilisées ne permettent pas d'évaluer ces impacts et cela aurait éloigné les travaux des objectifs initiaux. Ce serait une piste intéressante pour continuer les travaux au sein du projet Koropokkuru.

La structure ramifiée du dépôt d'or pourrait avoir un impact sur les caractéristiques électrochimiques et la conduction des électrons au sein du biofilm via un effet de bord ou un comportement local de type ultra-microélectrode. Les expériences envisagées avec les électrodes sous forme de microbandes d'or avaient en partie pour but d'élucider certains de ces points mais, comme cela a été présenté, des problèmes techniques n'ont pas permis d'exploiter ces électrodes. La piste de recherche reste donc ouverte et intéressante.

La structuration de la surface d'or nano-rugueux avec des piliers de 500  $\mu\text{m}$  de haut a entraîné une colonisation intégrale et homogène de la surface. Le fait qu'une telle colonisation ne soit jamais observée sur les surfaces planes ayant les mêmes caractéristiques souligne le grand intérêt de la micro-structuration en termes de colonisation bactérienne. Ces électrodes ont atteint des densités de courant de 8,5  $\text{A}/\text{m}^2$  (exprimée par rapport à la surface projetée). Cependant les densités de courant n'étaient pas proportionnelles à l'augmentation de la surface engendrée par la structuration en réseaux de micro-piliers. Une modélisation mathématique de type diffusion-réaction a mis en évidence la limitation par le transfert diffusif des espèces. La diffusion de l'acétate au sein du réseau de micro-piliers peut être limitante, mais c'est la diffusion des espèces tampon qui a l'effet le plus délétère. La réaction d'oxydation de l'acétate produit des protons que la diffusion des espèces tampon ne parvient pas à compenser. L'acidification du bas de la structure est donc significative et entrave l'exploitation de la surface totale du biofilm.

Heureux des bons résultats obtenus avec les électrodes micro-rugueuses, nous avons tenté de pousser l'effet en élaborant des surfaces d'or poreuses suivant le même procédé. Les bioanodes formées avec *Geobacter sulfurreducens* sur ces électrodes ont produit des densités de courant jusqu'à 16  $\text{A}/\text{m}^2$ . Ce sont les meilleurs résultats connus pour des bioanodes en or. Malgré ce succès par rapport à l'état de l'art, ces expériences ont mis en lumière le colmatage de la structure poreuse par un biofilm dense et très recouvrant. Le biofilm est donc très loin

d'exploiter la structure poreuse, dont l'effet positif peut en fait être interprété en termes d'accroissement de la rugosité de surface.

Une nouvelle série d'expériences a été menée pour s'affranchir du problème de colmatage en utilisant un réseau de micro-piliers rugueux. L'objectif était alors de simuler une structure poreuse plus lâche que la précédente et parfaitement ouverte, en remplaçant les pores de quelques dizaines de micromètres de diamètre par des intervalles de 200  $\mu\text{m}$  entre les micro-piliers. Il a effectivement été possible d'éviter ainsi la formation d'un biofilm colmatant mais les piliers rugueux n'ont produit que 1,25 fois plus de courant que les piliers lisses. Les observations en microscopie et la modélisation mathématique ont permis d'identifier les raisons de ce piètre succès. D'une part la base du réseau de micro-piliers est apparue faiblement colonisée par rapport à la partie supérieure des piliers qui était recouverte d'un biofilm compact et épais. La plus forte rugosité sur le haut des piliers pourrait avoir favorisé cette différence de colonisation. D'autre part le modèle montre que la présence d'un biofilm très actif sur le haut des micro-piliers engendre l'acidification drastique du bas de la structure. Le biofilm n'est donc pleinement développé et efficace que sur la partie haute des micro-piliers. La colonisation d'une partie réduite de l'électrode, environ 60  $\mu\text{m}$  seulement pour des piliers de 500  $\mu\text{m}$  de hauteur, a tout de même suffi à produire des densités de courant de 8  $\text{A}/\text{m}^2$ .

Il faut voir dans ces séries d'expérience et leur interprétation de premières bases d'ingénierie des interfaces électro-microbiennes. L'expérience et le modèle s'accordent pour indiquer que, pour la surface rugueuse mise en œuvre ici, la hauteur optimale des piliers est de l'ordre de 60  $\mu\text{m}$ . Au-delà de cette hauteur la surface est inexploitée. Si de grandes surfaces d'électrodes étaient à produire, il serait ainsi possible d'optimiser la quantité d'or à utiliser. Le modèle pourrait également être utilisé pour optimiser les trois paramètres géométriques, hauteur, côté et espacement des micro-piliers afin de maximiser la densité de courant. Il faut toutefois noter que c'est le microbiologiste qui a la carte maîtresse en main. En effet, le moyen le plus efficace pour accroître la densité de courant serait d'augmenter la concentration de l'espèce (ou des espèces) tampon, à condition que le biofilm l'accepte. Dans le futur, les travaux destinés à optimiser les bioanodes devraient viser l'augmentation de la concentration d'espèces tampon et, le cas échéant, l'acclimatation des biofilms à ces fortes concentrations comme un objectif prioritaire.

En parallèle, les expérimentations en culture pure ont mis en évidence un comportement inattendu de *Geobacter sulfurreducens*. L'hypothèse principale supposant que les cellules sont capables de croître en utilisant des métabolites issus de la pré-culture devrait être vérifiée au plus tôt par des expériences de longue durée avec des ajouts d'acétate.

L'évolution des bioanodes vers des conditions proches de l'application envisagée dans le projet a été initiée en utilisant un inoculum multi-espèces issu de sédiments marins. Les premiers travaux ont été dédiés à l'optimisation des conditions opératoires. Ils ont eu pour objectif de simplifier le milieu afin de favoriser la formation de biofilms électroactifs les plus efficaces possibles tout en facilitant la mise en évidence de l'impact des structurations de surface sur la colonisation. La formation des bioanodes a été réalisée en deux phases. Une bioanode primaire est formée dans un milieu inoculé avec le sédiment, puis cette bioanode est utilisée pour inoculer une seconde électrode dans un milieu synthétique minimal. Cette

procédure a donné des bioanodes satisfaisantes sur des supports en feutre de carbone. Par contre les densités de courant sont faibles lorsque la seconde électrode est une anode en or structurée par un réseau de micro-piliers. L'analyse des communautés microbiennes indique cependant une grande similitude des populations bactériennes sur les deux types de surface. Dans les deux cas, cette procédure n'est pas aussi efficace qu'une inoculation directe. Ces travaux ont apporté des pistes de réflexion quant au passage en conditions réelles mais ils ne paraissent pas être une voie à poursuivre.

Les connaissances apportées par ces travaux de thèse jettent de premières bases pour la conception de bioanodes à surface structurée. L'analyse des résultats expérimentaux a ouvert quelques questionnements qui n'avaient pas été anticipés. Des hypothèses ont été formulées et leur validation nécessite encore des travaux spécifiques. La réponse à ces questionnements permettra au LGC de continuer à avancer à la frontière des connaissances. Enfin, ces travaux n'ont fait qu'effleurer les énormes possibilités qu'offrent les technologies microsystèmes pour déchiffrer les processus à l'œuvre dans les biofilms électroactifs. Nous n'avons aucun doute sur les envies qu'il a fait naître, ou qu'il a confortées, pour continuer à explorer cette voie.





# Références bibliographiques



- Aelterman, P., Rabaey, K., Clauwaert, P., Verstraete, W., 2006. Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54, 9–15.
- Aelterman, P., Versichele, M., Marzorati, M., Boon, N., Verstraete, W., 2008. Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes. *Bioresour. Technol.* 99, 8895–8902. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.061>
- Aguirre-Sierra, A., Bacchetti-De Gregoris, T., Berna, A., Salas, J.J., Aragon, C., Esteve-Nunez, A., 2016. Microbial electrochemical systems outperform fixed-bed biofilters in cleaning up urban wastewater. *Environ. Sci.-Water Res. Technol.* 2, 984–993. <https://doi.org/10.1039/c6ew00172f>
- Ahn, Y., Logan, B.E., 2010. Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour. Technol.* 101, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.039>
- Alatraktchi, F.A., Zhang, Y., Noori, J.S., Angelidaki, I., 2012. Surface area expansion of electrodes with grass-like nanostructures and gold nanoparticles to enhance electricity generation in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 123, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.048>
- Anderson, C.R., Turnbull, I.M., Rosen, M.R., 2003. Microbial ecology and geochemistry of soils containing iron pans. *Environ. Geol.* 45, 209–220. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0868-0>
- Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B.E., Hamelin, A., Stoicoviciu, L., 1987. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au Part II. A chemical and structural basis of oxidation of the (111) plane. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 228, 429–453. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80122-5](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80122-5)
- Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B.E., Hamelin, A., Stoicoviciu, L., 1986. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au—I. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. *Electrochimica Acta* 31, 1051–1061. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(86\)80020-2](https://doi.org/10.1016/0013-4686(86)80020-2)
- Antolini, E., 2015. Composite materials for polymer electrolyte membrane microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 69, 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.013>
- Anwar, H., Strap, J.L., Costerton, J.W., 1992. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalixin and tobramycin in a chemostat system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 890–893. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.890>
- Arenas, J., Tommassen, J., 2017. Meningococcal biofilm formation: Let's stick together. *Trends Microbiol.* 25, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.005>
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D.P., Sarma, P.M., Pant, D., 2016. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renew. Energy, Special Issue: New Horizons in Biofuels Production and Technologies* 98, 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., Schröder, U., 2015. Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2048–2055. <https://doi.org/10.1039/C5EE00866B>

- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.M., 2003. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>
- Bennetto, H.P., Dew, M.E., Stirling, J.L., Tanaka, K., 1981. Rates of reduction of phenothiazine “redox” dyes by *E. coli*. *Chem. Ind. Chichester* 776–778.
- Bergel, A., 2012. Les piles à combustible à micro-organismes.
- Berk, R.S., Canfield, J.H., 1964. Bioelectrochemical energy conversion. *Appl. Microbiol.* 12, 10–12.
- Beveridge, T.J., Hughes, M.N., Lee, H., Leung, K.T., Poole, R.K., Savvaidis, I., Silver, S., Trevors, J.T., 1996. Metal-microbe interactions: contemporary approaches, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in microbial physiology*. Academic Press, pp. 177–243. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60158-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60158-7)
- Blanchet, E., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bridier, A., Bouchez, T., Bergel, A., 2015a. Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment. *Bioresour. Technol.* 185, 106–115.
- Blanchet, E., Duquenne, F., Rafrafi, Y., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2015b. Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction. *Energy Environ. Sci.* 8, 3731–3744. <https://doi.org/10.1039/C5EE03088A>
- Bombelli, P., Zarrouati, M., Thorne, R.J., Schneider, K., Rowden, S.J.L., Ali, A., Yunus, K., Cameron, P.J., Fisher, A.C., Ian Wilson, D., Howe, C.J., McCormick, A.J., 2012. Surface morphology and surface energy of anode materials influence power outputs in a multi-channel mediatorless bio-photovoltaic (BPV) system. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 14, 12221–12229. <https://doi.org/10.1039/c2cp42526b>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1066771>
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- Borjas, Z., Ortiz, J.M., Aldaz, A., Feliu, J., Esteve-Núñez, A., 2015. Strategies for reducing the start-up operation of microbial electrochemical treatments of urban wastewater. *Energies* 8, 14064–14077. <https://doi.org/10.3390/en81212416>
- Bouchez, T., Bridier, A., Le Quémener, E., 2016. Method and device for controlling the activity of a bioelectrochemical system comprising both a bioanode and a biocathode. WO/2016/051064.
- Bridier, A., Desmond-Le Quemener, E., Bureau, C., Champigneux, P., Renvoise, L., Audic, J.-M., Blanchet, E., Bergel, A., Bouchez, T., 2015. Successive bioanode regenerations to maintain efficient current production from biowaste. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.05.007>

- Brown, N.L., Camakaris, J., Lee, B.T., Williams, T., Morby, A.P., Parkhill, J., Rouch, D.A., 1991. Bacterial resistances to mercury and copper. *J. Cell. Biochem.* 46, 106–114. <https://doi.org/10.1002/jcb.240460204>
- Brummer, S.B., Makrides, A.C., 1964. Surface oxidation of gold electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 111, 1122–1128. <https://doi.org/10.1149/1.2425933>
- Burke, L.D., Nugent, P.F., 1997. The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bull.* 30, 43–53. <https://doi.org/10.1007/BF03214756>
- Burkhart, C.T., Maki, K.L., Schertzer, M.J., 2017. Effects of interface velocity, diffusion rate, and radial velocity on colloidal deposition patterns left by evaporating droplets. *J. Heat Transf.* 139, 111505–111505–9. <https://doi.org/10.1115/1.4036681>
- Butler, J.E., Young, N.D., Aklujkar, M., Lovley, D.R., 2012. Comparative genomic analysis of *Geobacter sulfurreducens* KN400, a strain with enhanced capacity for extracellular electron transfer and electricity production. *BMC Genomics* 13, 471. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-471>
- Butler, J.E., Young, N.D., Lovley, D.R., 2010. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* 11, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-40>
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
- Capodaglio, A.G., Molognoni, D., Dallago, E., Liberale, A., Cella, R., Longoni, P., Pantaleoni, L., 2013. Microbial fuel cells for direct electrical energy recovery from urban wastewaters. *Sci. World J.* <https://doi.org/10.1155/2013/634738>
- Cercado Quezada, 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. *Bioresour. Technol.* 134, 276–284.
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2011. Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes. *Electrochem. Commun.* 13, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.02.015>
- Chabert, N., Amin Ali, O., Achouak, W., 2015. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.004>
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., Bergel, A., 2018. Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.005>
- Characklis, W.G., 1973a. Attached microbial growths - I. Attachment and growth. *Water Res.* 7, 1113–1127. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90066-3)
- Characklis, W.G., 1973b. Attached microbial growths - II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.* 7, 1249–1258. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90002-X)
- Characklis, W.G., Cooksey, K.E., 1983. Biofilms and microbial fouling, in: Laskin, A.I. (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 93–138. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70355-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70355-1)

- Characklis, W.G., Marshall, K.C., 1990. *Biofilms*. Wiley, New York.
- Chaudhuri, S.K., Lovley, D.R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/nbt867>
- Chen, S., He, G., Hu, X., Xie, M., Wang, S., Zeng, D., Hou, H., Schröder, U., 2012a. A three-dimensionally ordered macroporous carbon derived from a natural resource as anode for microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 5, 1059–1063. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100783>
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., Schröder, U., 2012b. Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 9769–9772. <https://doi.org/10.1039/C2EE23344D>
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schroeder, U., 2011. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417–1421. <https://doi.org/10.1039/c0ee00446d>
- Cheng, S., Logan, B.E., 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18871–18873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., Logan, B.E., 2009. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3953–3958. <https://doi.org/10.1021/es803531g>
- Chiao, M., Lam, K.B., Lin, L., 2006. Micromachined microbial and photosynthetic fuel cells. *J. Micromechanics Microengineering* 16, 2547. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/12/005>
- Chouler, J., Cruz-Izquierdo, Á., Rengaraj, S., Scott, J.L., Di Lorenzo, M., 2018. A screen-printed paper microbial fuel cell biosensor for detection of toxic compounds in water. *Biosens. Bioelectron.* 102, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.018>
- Chun, C.L., Payne, R.B., Sowers, K.R., May, H.D., 2013. Electrical stimulation of microbial PCB degradation in sediment. *Water Res.* 47, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.038>
- Clark, W., 1960. Oxidation reduction potentials of organic systems. *J. Phys. Chem.* 64, 192–192. <https://doi.org/10.1021/j100830a600>
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schampelaire, L., Ham, T.H., Boeckx, P., Boon, N., Verstraete, W., 2007. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3354–3360. <https://doi.org/10.1021/es062580r>
- Cohen, B., 1931. The bacteria culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol.* 21, 18–19.
- Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J., Lovley, D.R., 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3180–3187. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3180-3187.2001>
- Correa-Duarte, M.A., Wagner, N., Rojas-Chapana, J., Morsczeck, C., Thie, M., Giersig, M., 2004. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as

- scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Lett.* 4, 2233–2236. <https://doi.org/10.1021/nl048574f>
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cucu, A., Tiliakos, A., Tanase, I., Serban, C.E., Stamatina, I., Ciocanea, A., Nichita, C., 2016. Microbial fuel cell for nitrate reduction, in: Damian, R.M. (Ed.), *Eenviro-Yrc 2015 - Bucharest*. Elsevier Science Bv, Amsterdam, pp. 156–161.
- Cui, H.-F., Du, L., Guo, P.-B., Zhu, B., Luong, J.H.T., 2015. Controlled modification of carbon nanotubes and polyaniline on macroporous graphite felt for high-performance microbial fuel cell anode. *J. Power Sources* 283, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.02.088>
- Davey, M.E., O’toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- Davila, D., Esquivel, J.P., Sabate, N., Mas, J., 2011. Silicon-based microfabricated microbial fuel cell toxicity sensor. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2426–2430. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.10.025>
- Díaz, C., Schilardi, P., De Mele, M.F.L., 2008. Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals. *Artif. Organs* 32, 292–298. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00545.x>
- Ding, C., Lv, M., Zhu, Y., Jiang, L., Liu, H., 2015. Wettability-regulated extracellular electron transfer from the living organism of *Shewanella loihica* PV-4. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1446–1451. <https://doi.org/10.1002/anie.201409163>
- Ding, Y.-H.R., Hixson, K.K., Giometti, C.S., Stanley, A., Esteve-Nunez, A., Khare, T., Tollaksen, S.L., Zhu, W., Adkins, J.N., Lipton, M.S., Smith, R.D., Mester, T., Lovley, D.R., 2006. The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics* 1764, 1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.04.017>
- Dominguez-Benetton, X., Varia, J.C., Pozo, G., Modin, O., Ter Heijne, A., Fransaer, J., Rabaey, K., 2018. Metal recovery by microbial electro-metallurgy. *Prog. Mater. Sci.* 94, 435–461. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.007>
- Donlan, R.M., Pipes, W.O., Yohe, T.L., 1994. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water Res.* 28, 1497–1503. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90318-2)
- Du, J., Catania, C., Bazan, G.C., 2014. Modification of abiotic-biotic interfaces with small molecules and nanomaterials for improved bioelectronics. *Chem. Mater.* 26, 686–697. <https://doi.org/10.1021/cm401912j>

- Du, Q., An, J., Li, J., Zhou, L., Li, N., Wang, X., 2017. Polydopamine as a new modification material to accelerate startup and promote anode performance in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 343, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.01.093>
- Dumas, C., 2007. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible (phd).
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008a. Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta* 53, 2494–2500. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.018>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008b. Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta* 53, 5235–5241. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.056>
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008c. DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 53, 3200–3209. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.066>
- Dunaj, S.J., Vallino, J.J., Hines, M.E., Gay, M., Kobyljanec, C., Rooney-Varga, J.N., 2012. Relationships between soil organic matter, nutrients, bacterial community structure, and the performance of microbial fuel cells. <https://doi.org/10.1021/es2032532>
- Durruty, I., Bonanni, P.S., González, J.F., Busalmen, J.P., 2012. Evaluation of potato-processing wastewater treatment in a microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 105, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.095>
- Edwards, K.J., Rutenberg, A.D., 2001. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chem. Geol., Experimental and Theoretical Geomicrobiology* 180, 19–32. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00303-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00303-5)
- ElMekawy, A., Hegab, H.M., Losic, D., Saint, C.P., Pant, D., 2017. Applications of graphene in microbial fuel cells: The gap between promise and reality. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72, 1389–1403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.044>
- El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.M., Neilson, K.H., Gorby, Y.A., Tiedje, J.M., 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18127–18131.
- Erbale, B., Bergel, A., 2009. First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm. *Bioresour. Technol.* 100, 3302–3307.
- Erbale, B., Duteanu, N., Kumar, S.M.S., Feng, Y., Ghangrekar, M.M., Scott, K., 2009a. Nitric acid activation of graphite granules to increase the performance of the non-catalyzed oxygen reduction reaction (ORR) for MFC applications. *Electrochem. Commun.* 11, 1547–1549. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.057>
- Erbale, B., Lacroix, R., Etcheverry, L., Féron, D., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Marine floating microbial fuel cell involving aerobic biofilm on stainless steel cathodes. *Bioresour. Technol.* 142, 510–516.
- Erbale, B., Roncato, M.-A., Achouak, W., Bergel, A., 2009b. Sampling natural biofilms: a new route to build efficient microbial anodes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3194–3199.
- Erbale, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Délia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., Bergel, A., 2010. Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry* 78, 51–56.

- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Erbay, C., Pu, X., Choi, W., Choi, M.-J., Ryu, Y., Hou, H., Lin, F., de Figueiredo, P., Yu, C., Han, A., 2015. Control of geometrical properties of carbon nanotube electrodes towards high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources* 280, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.01.065>
- Escapa, A., Mateos, R., Martínez, E.J., Blanes, J., 2016. Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55, 942–956. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.029>
- Escapa, A., San-Martín, M.I., Mateos, R., Morán, A., 2015. Scaling-up of membraneless microbial electrolysis cells (MECs) for domestic wastewater treatment: Bottlenecks and limitations. *Bioresour. Technol.* 180, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.096>
- Esteve-Nunez, A., Rothermich, M., Sharma, M., Lovley, D., 2005. Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ. Microbiol.* 7, 641–648. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00731.x>
- Estevez-Canales, M., Berna, A., Borjas, Z., Esteve-Nunez, A., 2015. Screen-printed electrodes: new tools for developing microbial electrochemistry at microscale level. *Energies* 8, 13211–13221. <https://doi.org/10.3390/en81112366>
- Fan, Y., Xu, S., Schaller, R., Jiao, J., Chaplen, F., Liu, H., 2011. Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1908–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.006>
- Feng, H., Liang, Y., Guo, K., Chen, W., Shen, D., Huang, L., Zhou, Y., Wang, M., Long, Y., 2016. TiO<sub>2</sub> nanotube arrays modified titanium: a stable, scalable, and cost-effective bioanode for microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3, 420–424. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00410>
- Fornero, J.J., Rosenbaum, M., Angenent, L.T., 2010. Electric power generation from municipal, food, and animal wastewaters using microbial fuel cells. *Electroanalysis* 22, 832–843. <https://doi.org/10.1002/elan.200980011>
- Franks, A.E., Nevin, K.P., 2010. Microbial Fuel Cells, a current review. *Energies* 3, 899–919. <https://doi.org/10.3390/en3050899>
- Franks, A.E., Nevin, K.P., Glaven, R.H., Lovley, D.R., 2010. Microtoming coupled to microarray analysis to evaluate the spatial metabolic status of *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *ISME J.* 4, 509–519. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.137>
- Freguía, S., Tsujimura, S., Kano, K., 2010. Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes. *Electrochimica Acta* 55, 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.09.027>
- Futamata, H., Bretschger, O., Cheung, A., Kan, J., Owen, R., Nealson, K.H., 2013. Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortium fed with lactate. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.016>

- Ganigué, R., Puig, S., Batlle-Vilanova, P., Balaguer, M.D., Colprim, J., 2015. Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide. *Chem. Commun.* 51, 3235–3238. <https://doi.org/10.1039/C4CC10121A>
- García López, L.A., Veiga, M.C., Nogueira, R., Aparicio, A., Melo, L.F., 2003. A technique using a membrane flow cell to determine average mass transfer coefficients and tortuosity factors in biofilms. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 47, 61–67.
- García-Muñoz, J., Amils, R., Fernández, V.M., De Lacey, A.L., Malki, M., 2011. Electricity generation by microorganisms in the sediment-water interface of an extreme acidic microcosm. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 14, 73–81. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.137>
- Geppert, F., Liu, D., van Eerten-Jansen, M., Weidner, E., Buisman, C., ter Heijne, A., 2016. Bioelectrochemical Power-to-Gas: State of the Art and Future Perspectives. *Trends Biotechnol.* 34, 879–894. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.010>
- Gentile, F., Coluccio, M.L., Limongi, T., Perozziello, G., Candeloro, P., Di Fabrizio, E., 2014. The Five Ws (and one H) of Super-Hydrophobic Surfaces in Medicine. *Micromachines* 5, 239–262. <https://doi.org/10.3390/mi5020239>
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealsen, K.H., Fredrickson, J.K., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11358–11363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604517103>
- Gregory, K.B., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6, 596–604. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x>
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2013. Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- Guo, K., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Rabaey, K., 2015. Engineering electrodes for microbial electrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol., Environmental biotechnology • Energy biotechnology* 33, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.014>
- Guo, K., Donose, B.C., Soeriyadi, A.H., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Freguia, S., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2014. Flame oxidation of stainless steel felt enhances anodic biofilm formation and current output in bioelectrochemical systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7151–7156. <https://doi.org/10.1021/es500720g>
- Guzman, C.E., Bereza-Malcolm, L.T., De Groef, B., Franks, A.E., 2015. Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *Plos One* 10, e0133048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133048>
- Hansen, S.K., Haagenzen, J.A.J., Gjermansen, M., Jørgensen, T.M., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., 2007. Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-

- species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J. Bacteriol.* 189, 4932–4943. <https://doi.org/10.1128/JB.00041-07>
- He, Y.-R., Xiao, X., Li, W.-W., Sheng, G.-P., Yan, F.-F., Yu, H.-Q., Yuan, H., Wu, L.-J., 2012. Enhanced electricity production from microbial fuel cells with plasma-modified carbon paper anode. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 14, 9966–9971. <https://doi.org/10.1039/c2cp40873b>
- Hernandez, M.E., Newman, D.K., 2001. Extracellular electron transfer. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1562–1571. <https://doi.org/10.1007/PL00000796>
- Hewitt, L.F., 1948. Oxidation-reduction potentials in bacteriology and bio-chemistry. *Oxid.-Reduct. Potentials Bacteriol. Bio-Chem.*
- Hidalgo, D., Tommasi, T., Cauda, V., Porro, S., Chiodoni, A., Bejtka, K., Ruggeri, B., 2014. Streamlining of commercial Berl saddles: A new material to improve the performance of microbial fuel cells. *Energy* 71, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.05.012>
- Hindatu, Y., Anuar, M.S., Gumel, A.M., 2017. Mini-review: anode modification for improved performance of microbial fuel cell. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 73, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.138>
- Holmes, D.E., Bond, D.R., O’Neil, R.A., Reimers, C.E., Tender, L.R., Lovley, D.R., 2004. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178–190. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>
- Holmes, D.E., Chaudhuri, S.K., Nevin, K.P., Mehta, T., Methe, B.A., Liu, A., Ward, J.E., Woodard, T.L., Webster, J., Lovley, D.R., 2006. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* 8, 1805–1815. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01065.x>
- Holmes, D.E., O’Neil, R.A., Vrionis, H.A., N’Guessan, L.A., Ortiz-Bernad, I., Larrahondo, M.J., Adams, L.A., Ward, J.A., Nicoll, J.S., Nevin, K.P., Chavan, M.A., Johnson, J.P., Long, P.E., Lovley, D.R., 2007. Subsurface clade of *Geobacteraceae* that predominates in a diversity of Fe(III)-reducing subsurface environments. *ISME J.* 1, 663–677. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.85>
- Holmes, D.E., Dang, Y., Walker, D.J.F., Lovley, D.R., 2016. The electrically conductive pili of *Geobacter* species are a recently evolved feature for extracellular electron transfer. *Microb. Genomics* 2. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000072>
- Hongo, M., Iwahara, M., 1979. Application of Electro-energizing Method to L-Glutamic Acid Fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 43, 2075–2081. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.43.2075>
- Hori, T., Mueller, A., Igarashi, Y., Conrad, R., Friedrich, M.W., 2010. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by C-13-acetate probing. *ISME J.* 4, 267–278. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.100>
- Hou, B., Sun, J., Hu, Y., 2011. Effect of enrichment procedures on performance and microbial diversity of microbial fuel cell for Congo red decolorization and electricity generation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1563–1572. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3226-2>

- Hou, J., Liu, Z., Yang, S., Zhou, Y., 2014. Three-dimensional macroporous anodes based on stainless steel fiber felt for high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources* 258, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.02.035>
- Huang, D.-Y., Zhou, S.-G., Chen, Q., Zhao, B., Yuan, Y., Zhuang, L., 2011. Enhanced anaerobic degradation of organic pollutants in a soil microbial fuel cell. *Chem. Eng. J.* 172, 647–653. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.024>
- Huang, L., Gan, L., Zhao, Q., Logan, B.E., Lu, H., Chen, G., 2011. Degradation of pentachlorophenol with the presence of fermentable and non-fermentable co-substrates in a microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 102, 8762–8768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.063>
- Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56–58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>
- In Ho, P., Gnana Kumar, G., Kim, A.R., Kim, P., Suk Nahm, K., 2011. Microbial electricity generation of diversified carbonaceous electrodes under variable mediators. *Bioelectrochemistry* 80, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.06.007>
- Inoue, S., Parra, E.A., Higa, A., Jiang, Y., Wang, P., Buie, C.R., Coates, J.D., Lin, L., 2012. Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements. *Sens. Actuators Phys.*, 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 177, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.09.023>
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Wu, A., Yamanaka, Y., Neelson, K.H., Bretschger, O., 2013. Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res., Microbial ecology of drinking water and wastewater treatment* 47, 7120–7130. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.048>
- Islam, J., Singhal, N., 2004. A laboratory study of landfill-leachate transport in soils. *Water Res.* 38, 2035–2042. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.024>
- Jia, X., He, Z., Zhang, X., Tian, X., 2016. Carbon paper electrode modified with TiO<sub>2</sub> nanowires enhancement bioelectricity generation in microbial fuel cell. *Synth. Met.* 215, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.02.015>
- Jadhav, D.A., Ghadge, A.N., Ghangrekar, M.M., 2015. Enhancing the power generation in microbial fuel cells with effective utilization of goethite recovered from mining mud as anodic catalyst. *Bioresour. Technol.* 191, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.109>
- Jafary, T., Daud, W.R.W., Ghasemi, M., Kim, B.H., Jahim, J.M., Ismail, M., Lim, S.S., 2015. Biocathode in microbial electrolysis cell; present status and future prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.003>
- Kadier, A., Kalil, M.S., Abdesahian, P., Chandrasekhar, K., Mohamed, A., Azman, N.F., Logrono, W., Simayi, Y., Hamid, A.A., 2016. Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (MECs) for microbial production of hydrogen and value-added chemicals. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 61, 501–525. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.017>
- Kaewkannetra, P., Chiwes, W., Chiu, T.Y., 2011. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology. *Fuel* 90, 2746–2750. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.03.031>

- Kalathil, S., Pant, D., 2016. Nanotechnology to rescue bacterial bidirectional extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Rsc Adv.* 6, 30582–30597. <https://doi.org/10.1039/c6ra04734c>
- Kano, T., Suito, E., Hishida, K., Miki, N., 2012. Effect of microscale surface geometry of electrodes on performance of microbial fuel cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 51, 06FK04. <https://doi.org/10.1143/JJAP.51.06FK04>
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- Kargar, M., Wang, J., Nain, A.S., Behkam, B., 2012. Controlling bacterial adhesion to surfaces using topographical cues: a study of the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with nanofiber-textured surfaces. *Soft Matter* 8, 10254–10259. <https://doi.org/10.1039/C2SM26368H>
- Kargi, F., Eker, S., 2007. Electricity generation with simultaneous wastewater treatment by a microbial fuel cell (MFC) with Cu and Cu–Au electrodes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 658–662. <https://doi.org/10.1002/jctb.1723>
- Karra, U., Muto, E., Umaz, R., Kölln, M., Santoro, C., Wang, L., Li, B., 2014. Performance evaluation of activated carbon-based electrodes with novel power management system for long-term benthic microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 21847–21856. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.095>
- Karthikeyan, R., Wang, B., Xuan, J., Wong, J.W.C., Lee, P.K.H., Leung, M.K.H., 2015. Interfacial electron transfer and bioelectrocatalysis of carbonized plant material as effective anode of microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 157, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.01.029>
- Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S., 1977. Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1727–1733. <https://doi.org/10.1002/bit.260191112>
- Kerkhof, L.J., Williams, K.H., Long, P.E., McGuinness, L.R., 2011. Phase preference by active, acetate-utilizing bacteria at the rifle, CO integrated field research challenge site. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1250–1256. <https://doi.org/10.1021/es102893r>
- Ketep, S.F., Bergel, A., Bertrand, M., Achouak, W., Fourest, E., 2013. Sampling location of the inoculum is crucial in designing anodes for microbial fuel cells. *Biochem. Eng. J.* 73, 12–16.
- Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., Erable, B., 2014. Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633–1637. <https://doi.org/10.1039/c3ee44114h>
- Khare, P., Ramkumar, J., Verma, N., 2016. Carbon nanofiber-skinned three dimensional ni/carbon micropillars: high performance electrodes of a microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 219, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.09.140>
- Kim, B.H., Kim, H.J., Hyun, M.S., Park, D.H., 1999. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 127–131.
- Kim, B.H., Park, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Chang, I.S., Lee, J., Phung, N.T., 2004. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 672–681. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1412-6>

- Kim, J., Hwan Ko, J., Lee, J., Jun Kim, M., Byun, D., 2014. Power enhancement of a  $\mu$ l-scale microbial fuel cells by surface roughness. *Appl. Phys. Lett.* 104, 223702. <https://doi.org/10.1063/1.4880596>
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* 50, 61–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x>
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J.-U., Tolker-Nielsen, T., 2006. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x>
- Koch, C., Harnisch, F., 2016. Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem* 3, 1282–1295. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: The superficial life of microbes. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/441300a>
- Kreft, J.U., Wimpenny, J.W., 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 43, 135–141.
- Krieg, T., Sydow, A., Schröder, U., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends Biotechnol.* 32, 645–655. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.004>
- Kumar, G.G., Sarathi, V.G.S., Nahm, K.S., 2013. Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 43, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>
- Kumlanghan, A., Liu, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Mattiasson, B., 2007. Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2939–2944. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.014>
- Kundu, A., Sahu, J.N., Redzwan, G., Hashim, M.A., 2013. An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 1745–1757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.031>
- Kuzume, A., Zhumaev, U., Li, J., Fu, Y., Füeg, M., Esteve-Nuñez, A., Wandlowski, T., 2013. An in-situ surface electrochemistry approach toward whole-cell studies: Charge transfer between *Geobacter sulfurreducens* and electrified metal/electrolyte interfaces through linker molecules. *Electrochimica Acta* 112, 933–942. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.02.073>
- Lapinsonnière, L., Picot, M., Poriel, C., Barrière, F., 2013. Phenylboronic acid modified anodes promote faster biofilm adhesion and increase microbial fuel cell performances. *Electroanalysis* 25, 601–605. <https://doi.org/10.1002/elan.201200351>
- Latimer, W.M., 1952. Oxidation Potentials. Second Edition. *Soil Sci.* 74, 333.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558–6567. <https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6558-6567.1991>

- Lee, J.S., Kim, D.S., Jeon, H.J., Park, B.S., Yang, H.J., Hyun, M.S., Kim, M., 2015. Microbial fuel cell as a biosensor to monitor various toxic metal substances in water, in: 2015 9th International Conference on Sensing Technology (Icst). Ieee, New York, pp. 416–419.
- Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2015. The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food Bioprod. Process.* 93, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.005>
- Li, B., Zhou, J., Zhou, X., Wang, X., Li, B., Santoro, C., Grattieri, M., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., Schuler, A.J., 2014. Surface modification of microbial fuel cells anodes: approaches to practical design. *Electrochimica Acta* 134, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.136>
- Li, J., Li, Y., Zhang, G., 2011. A novel design of BOD biosensor based on immobilized microbial biosensor, in: Zeng, D. (Ed.), *Materials, Mechatronics and Automation*, Pts 1-3. Trans Tech Publications Ltd, Durnten-Zurich, pp. 316–320.
- Li, S., Cheng, C., Thomas, A., 2017. Carbon-based microbial-fuel-cell electrodes: from conductive supports to active catalysts. *Adv. Mater.* 29, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/adma.201602547>
- Lin, W.C., Coppi, M.V., Lovley, D.R., 2004. *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2525–2528. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2525-2528.2004>
- Liu, H., Grot, S., Logan, B.E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4317–4320. <https://doi.org/10.1021/es050244p>
- Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., 2004. Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2281–2285. <https://doi.org/10.1021/es034923g>
- Liu, J.L., Lowy, D.A., Baumann, R.G., Tender, L.M., 2007. Influence of anode pretreatment on its microbial colonization. *J. Appl. Microbiol.* 102, 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03051.x>
- Liu, J., Liu, J., He, W., Qu, Y., Ren, N., Feng, Y., 2014. Enhanced electricity generation for microbial fuel cell by using electrochemical oxidation to modify carbon cloth anode. *J. Power Sources* 265, 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.04.005>
- Liu, Y., Kim, H., Franklin, R., Bond, D.R., 2010. Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 3, 1782–1788. <https://doi.org/10.1039/C0EE00242A>
- 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. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006–1011. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.001>
- Lloyd, J.R., Leang, C., Hodges Myerson, A.L., Coppi, M.V., Cuifo, S., Methe, B., Sandler, S.J., Lovley, D.R., 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 369, 153–161. <https://doi.org/10.1042/BJ20020597>

- Logan, B.E., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G., 2007. Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3341–3346. <https://doi.org/10.1021/es062644y>
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>
- 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. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2, 206–214. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00180>
- Lovley, D.R., Chapelle, F., 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophys.* 33, 365–381. <https://doi.org/10.1029/95RG01305>
- Lovley, D.R., Phillips, E., 1988. Novel mode of microbial energy-metabolism - organic-carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472–1480.
- Lovley, D.R., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1442>
- Lovley, D.R., Coates, J.D., BluntHarris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445–448. <https://doi.org/10.1038/382445a0>
- Lovley, D.R., Stolz, J.F., Jr, G.L.N., Phillips, E.J.P., 1987. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330, 252–254. <https://doi.org/10.1038/330252a0>
- Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., Rotaru, A.-E., Holmes, D.E., Franks, A.E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K.P., 2011. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Adv. Microb. Physiol.* 59, 1–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>
- Lowy, D.A., Tender, L.M., Zeikus, J.G., Park, D.H., Lovley, D.R., 2006. Harvesting energy from the marine sediment–water interface II: Kinetic activity of anode materials. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2058–2063. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.033>
- Lu, N., Zhou, S., Zhuang, L., Zhang, J., Ni, J., 2009. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochem. Eng. J.* 43, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.005>
- Lyautey, E., Cournet, A., Morin, S., Boulêtreau, S., Etcheverry, L., Charcosset, J.-Y., Delmas, F., Bergel, A., Garabetian, F., 2011. Electroactivity of phototrophic river biofilms and constitutive cultivable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5394–5401. <https://doi.org/10.1128/AEM.00500-11>
- Maestro, B., Ortiz, J.M., Schrott, G., Busalmen, J.P., Climent, V., Feliu, J.M., 2014. Crystallographic orientation and electrode nature are key factors for electric current generation by *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry* 98, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.02.001>
- Mahadevan, R., Bond, D.R., Butler, J.E., Esteve-Nuñez, A., Coppi, M.V., Palsson, B.O., Schilling, C.H., Lovley, D.R., 2006. Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 72, 1558–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1558-1568.2006>
- Mahadevan, R., Palsson, B.Ø., Lovley, D.R., 2011. In situ to in silico and back: elucidating the physiology and ecology of *Geobacter* spp. using genome-scale modelling. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2456>
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K., Tremblay, P.-L., Evans-Lutterodt, K., Nykypanchuk, D., Martz, E., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2015. Structural Basis for Metallic-Like Conductivity in Microbial Nanowires. *Mbio* 6, e00084-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00084-15>
- Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K.P., Franks, A.E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2011. Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat. Nanotechnol.* 6, nnano.2011.119. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.119>
- Malvankar, N.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2012. Biofilm conductivity is a decisive variable for high-current-density *Geobacter sulfurreducens* microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 5790–5797. <https://doi.org/10.1039/C2EE03388G>
- Mansoorian, H.J., Mahvi, A.H., Jafari, A.J., Amin, M.M., Rajabizadeh, A., Khanjani, N., 2013. Bioelectricity generation using two chamber microbial fuel cell treating wastewater from food processing. *Enzyme Microb. Technol.* 52, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.004>
- Marcus, K.A., Torres, C.I., Rittmann, B.E., 2007. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 1171–1182. <https://doi.org/10.1002/bit.21533>
- Marshall, C.W., Ross, D.E., Fichot, E.B., Norman, R.S., May, H.D., 2013. Long-term operation of microbial electrosynthesis systems improves acetate production by autotrophic microbiomes. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6023–6029. <https://doi.org/10.1021/es400341b>
- Martins, G., Peixoto, L., Ribeiro, D.C., Parpot, P., Brito, A.G., Nogueira, R., 2010. Towards implementation of a benthic microbial fuel cell in lake Furnas (Azores): Phylogenetic affiliation and electrochemical activity of sediment bacteria. *Bioelectrochemistry, From fundamentals to microbial power plants: Electrochemically Active Biofilms* 78, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.07.003>
- Massazza, D., Parra, R., Busalmen, J.P., Romeo, H.E., 2015. New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2707–2712. <https://doi.org/10.1039/c5ee01498k>
- Mathis, B.J., Marshall, C.W., Milliken, C.E., Makkar, R.S., Creager, S.E., May, H.D., 2008. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 147–155. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1266-4>
- Mehdinia, A., Ziaei, E., Jabbari, A., 2014. Multi-walled carbon nanotube/SnO<sub>2</sub> nanocomposite: a novel anode material for microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 130, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.011>
- Merkey, B.V., Chopp, D.L., 2012. The Performance of a Microbial Fuel Cell Depends Strongly on Anode Geometry: A Multidimensional Modeling Study. *Bull. Math. Biol.* 74, 834–857. <https://doi.org/10.1007/s11538-011-9690-0>

- Methe, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M.J., Dodson, R.J., Madupu, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Sullivan, S.A., Haft, D.H., Selengut, J., Davidsen, T.M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H.A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Van Aken, S.E., Lovley, D.R., Fraser, C.M., 2003. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967–1969. <https://doi.org/10.1126/science.1088727>
- Miceli, J.F., Parameswaran, P., Kang, D.-W., Krajmalnik-Brown, R., Torres, C.I., 2012. Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10349–10355. <https://doi.org/10.1021/es301902h>
- Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J.M., Logan, B.E., 2005. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Res.* 39, 4961–4968. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.039>
- Mink, J.E., Hussain, M.M., 2013. Sustainable design of high-performance micro-sized microbial fuel cell with carbon nanotube anode and air cathode. *ACS Nano* 7, 6921–6927. <https://doi.org/10.1021/nn402103q>
- Mishra, P., Sharma, S., Jain, R., 2017. Carbon electrodes for bio-electricity generation in microbial fuel cells. *J. Indian Chem. Soc.* 94, 641–648.
- Mocali, S., Galeffi, C., Perrin, E., Florio, A., Migliore, M., Canganella, F., Bianconi, G., Mattia, E.D., Dell'Abate, M.T., Fani, R., Benedetti, A., 2013. Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1299–1315. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3906-6>
- Morozan, A., Dumitru, D.A.-A., Scott, P.K., 2007. Carbon electrodes for microbial fuel cells. *J. Optoelectron. Adv. Mater.*
- Morris, J.M., Jin, S., 2012. Enhanced biodegradation of hydrocarbon-contaminated sediments using microbial fuel cells. *J. Hazard. Mater.* 213, 474–477. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.029>
- Mustakeem, 2015. Electrode materials for microbial fuel cells: nanomaterial approach. *Mater. Renew. Sustain. Energy* 4, 22. <https://doi.org/10.1007/s40243-015-0063-8>
- Myers, C., Nealson, K., 1988. Microbial reduction of manganese oxides - interactions with iron and sulfur. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, 2727–2732. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90041-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90041-5)
- Nealson, K.H., Little, B., 1997. Breathing manganese and iron: solid-state respiration, in: Neidleman, S.L., Laskin, A.I. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 213–239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70264-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70264-8)
- Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, A.L., Jia, H., Zhang, M., Lovley, D.R., 2008. Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ. Microbiol.* 10, 2505–2514. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x>
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., Lovley, D.R., 2010. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio* 1, e00103-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-10>

- Nguyen, D.N., Yoon, H., 2016. Recent advances in nanostructured conducting polymers: from synthesis to practical applications. *Polymers* 8, 118. <https://doi.org/10.3390/polym8040118>
- Niessen, J., Harnisch, F., Rosenbaum, M., Schroder, U., Scholz, F., 2006. Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochem. Commun.* 8, 869–873. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.03.025>
- Oesch, U., Janata, J., 1983. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. *Electrochimica Acta* 28, 1237–1246. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(83\)85011-7](https://doi.org/10.1016/0013-4686(83)85011-7)
- Oh, S.-E., Logan, B.E., 2006. Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0066-y>
- Okamoto, A., Kalathil, S., Deng, X., Hashimoto, K., Nakamura, R., Nealsen, K.H., 2014. Cell-secreted flavins bound to membrane cytochromes dictate electron transfer reactions to surfaces with diverse charge and pH. *Sci. Rep.* 4, 5628. <https://doi.org/10.1038/srep05628>
- Oliot, M., Erable, B., Solan, M.-L.D., Bergel, A., 2017. Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature. *Electrochimica Acta* 258, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.10.110>
- Oliot, M., 2017. Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes (phd).
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 577–588. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>
- Pan, K., Zhou, P., 2015. Performance enhancement with a hydrophilic self-immobilized redox mediator modified anode in *Chlorella vulgaris*-based microbial solar cell. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3, 1974–1981. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00151>
- Parot, S., Délia, M.-L., Bergel, A., 2008. Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol., Exploring Horizons in Biotechnology: A Global Venture* 99, 4809–4816. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.047>
- Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2017. Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* 244, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.019>
- Patil, S., Harnisch, F., Schröder, U., 2010. Toxicity response of electroactive microbial biofilms - A decisive feature for potential biosensor and power source applications. *ChemPhysChem* 11, 2834–2837. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000218>
- Peixoto, L., Min, B., Martins, G., Brito, A.G., Kroff, P., Parpot, P., Angelidaki, I., Nogueira, R., 2011. In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon. *Bioelectrochemistry* 81, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.02.002>
- Peng, L., You, S.-J., Wang, J.-Y., 2010. Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.002>

- Picioareanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Curtis, T.P., Scott, K., 2010. Model based evaluation of the effect of pH and electrode geometry on microbial fuel cell performance. *Bioelectrochemistry* 78, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.04.009>
- Picot, M., Lapinonnière, L., Rothballer, M., Barrière, F., 2011. Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output. *Biosens. Bioelectron.* 28, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.017>
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2012a. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652. <https://doi.org/10.1039/C2EE22429A>
- Pocaznoi, D., Erable, B., Délia, M.-L., Bergel, A., 2012b. Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability. *Energy Environ. Sci.* 5, 5287–5296.
- Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012c. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 13332–13343. <https://doi.org/10.1039/C2CP42571H>
- Pons, L., Délia, M.-L., Bergel, A., 2011. Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresour. Technol.* 102, 2678–2683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.138>
- Potter, M.C., 1911. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc R Soc Lond B* 84, 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>
- Qi, P.S., Wang, W.B., Qi, Z., 2008. Effect of shear stress on biofilm morphological characteristics and the secretion of extracellular polymeric substances, in: 2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Presented at the 2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, pp. 3438–3441. <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2008.363>
- Qiao, Y.-J., Qiao, Y., Zou, L., Wu, X.-S., Liu, J.-H., 2017. Biofilm promoted current generation of *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cell via improving the interfacial redox reaction of phenazines. *Bioelectrochemistry* 117, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.04.003>
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, W., 2004. Biofuel Cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5373–5382. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004>
- Rabaey, K., Girguis, P., Nielsen, L.K., 2011. Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.010>
- Rabaey, K., Rozendal, R.A., 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Radu, A.I., Vrouwenvelder, J.S., van Loosdrecht, M.C.M., Picioareanu, C., 2010. Modeling the effect of biofilm formation on reverse osmosis performance: Flux, feed channel pressure drop and solute passage. *J. Membr. Sci.* 365, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.07.036>

- Rand, D.A.J., Woods, R., 1971. The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 31, 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(71\)80039-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(71)80039-6)
- Rawson, D.M., Willmer, A.J., Turner, A.P.P., 1989. Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors* 4, 299–311. [https://doi.org/10.1016/0265-928X\(89\)80011-2](https://doi.org/10.1016/0265-928X(89)80011-2)
- 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, 1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>
- Reimers, C.E., Girguis, P., Stecher, H.A., Tender, L.M., Ryckelynck, N., Whaling, P., 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4, 123–136. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00071.x>
- Reimers, C.E., Schrader, P.S., Wolf, M., 2017. Autonomous sensors powered by a benthic microbial fuel cell provide long-term monitoring of the northeast pacific oxygen minimum zone, in: *OCEANS 2017 - Aberdeen*. Presented at the *OCEANS 2017 - Aberdeen*, pp. 1–4. <https://doi.org/10.1109/OCEANSE.2017.8084602>
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Fertig, S., Wang, W., 2001. Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environ. Sci. Technol.* 35, 192–195. <https://doi.org/10.1021/es001223s>
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W., Wood, T.K., 2004. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 515–524. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1517-y>
- Renslow, R., Babauta, J., Dohnalkova, A., Boyanov, M., Kemner, K., Majors, P., Fredrickson, J., Beyenal, H., 2013. Metabolic spatial variability in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 6, 1827–1836. <https://doi.org/10.1039/C3EE40203G>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R., 2008. Electricity generation by *geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir* 24, 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Richter, H., Nevin, K.P., Jia, H., Lowy, D.A., Lovley, D.R., Tender, L.M., 2009. Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy Environ. Sci.* 2, 506–516. <https://doi.org/10.1039/B816647A>
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 16, 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/c4cp01698j>
- Rimboud, M., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bouchez, T., Bergel, A., 2015. Multi-system Nernst–Michaelis–Menten model applied to bioanodes formed from sewage sludge. *Bioresour. Technol., Microbial Fuel Cells* 195, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.069>
- Rodrigo, J., Boltes, K., Esteve-Nunez, A., 2014. Microbial-electrochemical bioremediation and detoxification of dibenzothiophene-polluted soil. *Chemosphere* 101, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.060>

- Rodrigo Quejigo, J., Doerfler, U., Schroll, R., Esteve-Nunez, A., 2016. Stimulating soil microorganisms for mineralizing the herbicide isoproturon by means of microbial electroremediating cells. *Microb. Biotechnol.* 9, 369–380. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12351>
- Roling, W.F.M., van Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B., van Verseveld, H.W., 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4619–4629. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4619-4629.2001>
- Rooney-Varga, J.N., Anderson, R.T., Fraga, J.L., Ringelberg, D., Lovley, D.R., 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3056–3063.
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., Angenent, L.T., 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol., Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells* 102, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.008>
- Rosenbaum, M., Zhao, F., Quaas, M., Wulff, H., Schröder, U., Scholz, F., 2007. Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Appl. Catal. B Environ.* 74, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.02.013>
- Roubaud, E., Lacroix, R., Da Silva, S., Bergel, A., Basséguy, R., Erable, B., in press. Catalysis of the hydrogen evolution reaction by hydrogen carbonate to decrease the voltage of microbial electrolysis cell fed with domestic wastewater. *Electrochimica Acta*.
- Rousseau, R., 2013. Production de biohydrogène par électro-catalyse microbienne (phd).
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* 33, 1–4.
- Rousseau, R., Rimboud, M., Delia, M.-L., Bergel, A., Basseguy, R., 2015. Electrochemical characterization of microbial bioanodes formed on a collector/electrode system in a highly saline electrolyte. *Bioelectrochemistry* 106, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.011>
- Rousseau, R., Santaella, C., Achouak, W., Godon, J.-J., Bonnafous, A., Bergel, A., Délia, M.-L., 2014. Correlation of the Electrochemical Kinetics of High-Salinity-Tolerant Bioanodes with the Structure and Microbial Composition of the Biofilm. *ChemElectroChem* 1, 1966–1975. <https://doi.org/10.1002/celec.201402153>
- Rozendal, R., Buisman, C., 2005. Bio-Electrochemical Process for Producing Hydrogen. WO/2005/005981.
- Sadhukhan, J., Lloyd, J.R., Scott, K., Premier, G.C., Yu, E.H., Curtis, T., Head, I.M., 2016. A critical review of integration analysis of microbial electrosynthesis (MES) systems with waste biorefineries for the production of biofuel and chemical from reuse of CO<sub>2</sub>. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 56, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.015>
- Saito, T., Mehanna, M., Wang, X., Cusick, R.D., Feng, Y., Hickner, M.A., Logan, B.E., 2011. Effect of nitrogen addition on the performance of microbial fuel cell anodes. *Bioresour. Technol.* 102, 395–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.063>

- Salvin, P., Roos, C., Robert, F., 2012. Tropical mangrove sediments as a natural inoculum for efficient electroactive biofilms. *Bioresour. Technol.* 120, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.131>
- Santoro, C., Babanova, S., Artyushkova, K., Cornejo, J.A., Ista, L., Bretschger, O., Marsili, E., Atanassov, P., Schuler, A.J., 2015. Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation. *Bioelectrochemistry* 106, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.05.002>
- Santoro, C., Guilizzoni, M., Correa Baena, J.P., Pasaogullari, U., Casalegno, A., Li, B., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., 2014. The effects of carbon electrode surface properties on bacteria attachment and start up time of microbial fuel cells. *Carbon* 67, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.071>
- Scheibe, T.D., Mahadevan, R., Fang, Y., Garg, S., Long, P.E., Lovley, D.R., 2009. Coupling a genome-scale metabolic model with a reactive transport model to describe in situ uranium bioremediation. *Microb. Biotechnol.* 2, 274–286. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00087.x>
- Schembri M.A., Kjærsgaard K., Klemm P., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48, 253–267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x>
- Schröder, U., 2007. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 2619–2629. <https://doi.org/10.1039/B703627M>
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Schröder, U., Harnisch, F., 2017. Life Electric—Nature as a blueprint for the development of microbial electrochemical technologies. *Joule* 1, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2017.07.010>
- Scott, K., Rimbu, G.A., Katuri, K.P., Prasad, K.K., Head, I.M., 2007. Application of modified carbon anodes in microbial fuel cells. *Process Saf. Environ. Prot.* 85, 481–488. <https://doi.org/10.1205/psep07018>
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., Schink, B., 1998. A periplasmic and extracellular c-Type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J. Bacteriol.* 180, 3686–3691.
- Segura, D., Mahadevan, R., Juarez, K., Lovley, D.R., 2008. Computational and experimental analysis of redundancy in the central metabolism of *Geobacter sulfurreducens*. *Plos Comput. Biol.* 4, e36. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040036>
- Sherafatmand, M., Ng, H.Y., 2015. Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresour. Technol.* 195, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.002>
- Shi, L., Chen, B., Wang, Z., Elias, D.A., Mayer, M.U., Gorby, Y.A., Ni, S., Lower, B.H., Kennedy, D.W., Wunschel, D.S., Mottaz, H.M., Marshall, M.J., Hill, E.A., Beliaev, A.S., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Squier, T.C., 2006. Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme c-Type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 188, 4705–4714. <https://doi.org/10.1128/JB.01966-05>

- Siu, C.P.B., Chiao, M., 2008. A microfabricated PDMS Microbial Fuel Cell. *J. Microelectromechanical Syst.* 17, 1329–1341. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2008.2006816>
- Sleutels, T.H.J.A., Lodder, R., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2009. Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 9655–9661. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.089>
- Snider, R.M., Strycharz-Glaven, S.M., Tsoi, S.D., Erickson, J.S., Tender, L.M., 2012. Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15467–15472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209829109>
- 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. *Biosens. Bioelectron.* 90, 558–576. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.014>
- Soussan, L., Riess, J., Erable, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2013a. Electrochemical reduction of CO<sub>2</sub> catalysed by *Geobacter sulfurreducens* grown on polarized stainless steel cathodes. *Electrochem. Commun.* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2012.11.033>
- Soussan, L., Erable, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2013b. The open circuit potential of *Geobacter sulfurreducens* bioanodes depends on the electrochemical adaptation of the strain. *Electrochem. Commun.* 33, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.013>
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A., 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52, 917–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x>
- Stein, L.Y., La Duc, M.T., Grundl, T.J., Nealson, K.H., 2001. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ. Microbiol.* 3, 10–18. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00154.x>
- Stoodley, S., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Strycharz, S.M., Glaven, R.H., Coppi, M.V., Gannon, S.M., Perpetua, L.A., Liu, A., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2011. Gene expression and deletion analysis of mechanisms for electron transfer from electrodes to *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 80, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.07.005>
- Sulonen, M.L.K., Kokko, M.E., Lakaniemi, A.-M., Puhakka, J.A., 2015. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *J. Hazard. Mater.* 284, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.045>
- Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., Cheng, S., 2016. The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *Int. J. Hydrog. Energy, Special Issue: Hydrogen and Fuel Cell Developments: A special issue on the 8th International Conference on Sustainable Energy and Environmental Protection (SEEP 2015)*, 11–14 August 2015, Paisley, Scotland, UK 41, 16523–16528. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.163>
- Sun, J.-J., Zhao, H.-Z., Yang, Q.-Z., Song, J., Xue, A., 2010. A novel layer-by-layer self-assembled carbon nanotube-based anode: Preparation, characterization, and application

- in microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 55, 3041–3047. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.103>
- Sun, M., Sheng, G.-P., Zhang, L., Xia, C.-R., Mu, Z.-X., Liu, X.-W., Wang, H.-L., Yu, H.-Q., Qi, R., Yu, T., Yang, M., 2008. An MEC-MFC-Coupled System for Biohydrogen Production from Acetate. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8095–8100. <https://doi.org/10.1021/es801513c>
- Sun, M., Zhang, F., Tong, Z.-H., Sheng, G.-P., Chen, Y.-Z., Zhao, Y., Chen, Y.-P., Zhou, S.-Y., Liu, G., Tian, Y.-C., Yu, H.-Q., 2010. A gold-sputtered carbon paper as an anode for improved electricity generation from a microbial fuel cell inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosens. Bioelectron.* 26, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.010>
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Electroactive bacteria-molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8481–8495. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6005-z>
- Tao, Y., Liu, Q., Chen, J., Wang, B., Wang, Y., Liu, K., Li, M., Jiang, H., Lu, Z., Wang, D., 2016. Hierarchically three-dimensional nanofiber based textile with high conductivity and biocompatibility as a microbial fuel cell anode. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7889–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00648>
- Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A., Pilobello, K., Fertig, S.J., Lovley, D.R., 2002. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat. Biotechnol.* 20, 821–825. <https://doi.org/10.1038/nbt716>
- ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., Saakes, M., Buisman, C.J.N., 2008. Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 53, 5697–5703. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.032>
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M., 2006. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* 17, 68–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Thorne, R., Hu, H., Schneider, K., Bombelli, P., Fisher, A., M. Peter, L., Dent, A., J. Cameron, P., 2011. Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *J. Mater. Chem.* 21, 18055–18060. <https://doi.org/10.1039/C1JM13058G>
- Thung, W.-E., Ong, S.-A., Ho, L.-N., Wong, Y.-S., Ridwan, F., Oon, Y.-L., Oon, Y.-S., Lehl, H.K., 2016. Bioelectricity generation in batch-fed up-flow membrane-less microbial fuel cell: effect of surface morphology of carbon materials as aqueous biocathodes. *Water. Air. Soil Pollut.* 227, 254. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2961-5>
- Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A., Rittmann, B.E., 2009. Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9519–9524. <https://doi.org/10.1021/es902165y>
- Uria, N., Abramova, N., Bratov, A., Munoz-Pascual, F.-X., Baldrich, E., 2016. Miniaturized metal oxide pH sensors for bacteria detection. *Talanta* 147, 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.011>
- Valiei, A., Kumar, A., Mukherjee, P.P., Liu, Y., Thundat, T., 2012. A web of streamers: biofilm formation in a porous microfluidic device. *Lab. Chip* 12, 5133–5137. <https://doi.org/10.1039/c2lc40815e>

- Vasudevan, R., Kennedy, A.J., Merritt, M., Crocker, F.H., Baney, R.H., 2014. Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.037>
- Velasquez-Orta, S.B., Head, I.M., Curtis, T.P., Scott, K., 2011. Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. *Bioresour. Technol.* 102, 5105–5112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.059>
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., Srikanth, S., Sarma, P.N., 2008a. Bio-electrochemical evaluation of fermentative hydrogen production process with the function of feeding pH. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4533–4546. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.073>
- Venkata Mohan, S., Mohanakrishna, G., Veer Raghavulu, S., Sarma, P.N., 2007. Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by bioaugmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia. *Int. J. Hydrog. Energy, International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells 2005* 32, 3284–3292. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.04.043>
- Venkata Mohan, S., Veer Raghavulu, S., Sarma, P.N., 2008b. Biochemical evaluation of bioelectricity production process from anaerobic wastewater treatment in a single chambered microbial fuel cell (MFC) employing glass wool membrane. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1326–1332. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.11.016>
- Wakkad, S.E.S.E., Din, A.M.S.E., 1954. The anodic oxidation of metals at very low current density. Part V. *Gold. J. Chem. Soc. Resumed* 0, 3098–3102. <https://doi.org/10.1039/JR9540003098>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Wang, N., Chen, Z., Li, H.-B., Su, J.-Q., Zhao, F., Zhu, Y.-G., 2015. Bacterial community composition at anodes of microbial fuel cells for paddy soils: the effects of soil properties. *J. Soils Sediments* 15, 926–936. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-1056-4>
- Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 9335–9344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>
- Wei, Y., Van Houten, R.T., Borger, A.R., Eikelboom, D.H., Fan, Y., 2003. Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. *Water Res.* 37, 4453–4467. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00441-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00441-X)
- Wen, Z., Ci, S., Mao, S., Cui, S., Lu, G., Yu, K., Luo, S., He, Z., Chen, J., 2013. TiO<sub>2</sub> nanoparticles-decorated carbon nanotubes for significantly improved bioelectricity generation in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 234, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.01.146>
- Whitehead, K.A., Colligon, J., Verran, J., 2005. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 41, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.11.010>

- Wigginton, N.S., Rosso, K.M., Lower, B.H., Shi, L., Hochella, M.F., 2007. Electron tunneling properties of outer-membrane decaheme cytochromes from *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 543–555. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.10.002>
- Winfield, J., Gajda, I., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2016. A review into the use of ceramics in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol., Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy* 215, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.135>
- Wurmser, R., 1930. *Oxydations et réductions, Les problèmes biologiques*. Paris : Presses universitaires de France.
- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 3418–3441. <https://doi.org/10.1039/C5EE01862E>
- Xu, T., Wang, Q., Wu, S., Fu, B., Liang, P., Huang, X., Zhang, X., 2018. A novel filtration composite anode configuration of microbial fuel cell for efficient wastewater treatment and enhanced power generation. *J. Clean. Prod.* 178, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.259>
- Yang, M., Ding, Y., Ge, X., Leng, Y., 2015. Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.010>
- Yates, M.D., Eddie, B.J., Kotloski, N.J., Lebedev, N., Malanoski, A.P., Lin, B., Strycharz-Glaven, S.M., Tender, L.M., 2016. Toward understanding long-distance extracellular electron transport in an electroautotrophic microbial community. *Energy Environ. Sci.* 9, 3544–3558. <https://doi.org/10.1039/C6EE02106A>
- Yazdi, A.A., D'Angelo, L., Omer, N., Windiasti, G., Lu, X., Xu, J., 2016. Carbon nanotube modification of microbial fuel cell electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 85, 536–552. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.033>
- Ye, Z., Ellis, M.W., Nain, A.S., Behkam, B., 2017. Effect of electrode sub-micron surface feature size on current generation of *Shewanella oneidensis* in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 347, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.032>
- Ye, Z., Hou, J., Ellis, M.W., Behkam, B., 2012. Effect of anode surface roughness on power generation in microbial fuel cells 1409–1414. <https://doi.org/10.1115/IMECE2012-88643>
- Yong, X.-Y., Shi, D.-Y., Chen, Y.-L., Jiao, F., Lin, X., Zhou, J., Wang, S.-Y., Yong, Y.-C., Sun, Y.-M., OuYang, P.-K., Zheng, T., 2014. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 152, 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.086>
- You, J., Santoro, C., Greenman, J., Melhuish, C., Cristiani, P., Li, B., Ieropoulos, I., 2014. Micro-porous layer (MPL)-based anode for microbial fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 21811–21818. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.136>
- Yu, C.-P., Liang, Z., Das, A., Hu, Z., 2011. Nitrogen removal from wastewater using membrane aerated microbial fuel cell techniques. *Water Res.* 45, 1157–1164. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.002>
- Yun, H., Kong, D., Liang, B., Cui, M., Li, Z., Wang, A., 2016. Response of anodic bacterial community to the polarity inversion for chloramphenicol reduction. *Bioresour. Technol.* 221, 666–670. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.047>

- Zhang, T.C., Bishop, P.L., 1994a. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Res.* 28, 2267–2277. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90042-6)
- Zhang, T.C., Bishop, P.L., 1994b. Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms. *Water Res.* 28, 2279–2287. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90043-4)
- Zhang, Y., Angelidaki, I., 2014. Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges. *Water Res.* 56, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.031>
- Zhang, Y., Angelidaki, I., 2011. Submersible Microbial Fuel Cell sensor for monitoring microbial activity and BOD in groundwater: focusing on impact of anodic biofilm on sensor applicability. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2339–2347. <https://doi.org/10.1002/bit.23204>
- Zhao, C., Wang, Y., Shi, F., Zhang, J., Zhu, J.-J., 2013. High biocurrent generation in *Shewanella*-inoculated microbial fuel cells using ionic liquid functionalized graphene nanosheets as an anode. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 49, 6668–6670. <https://doi.org/10.1039/c3cc42068j>
- Zhao, F., T. Slade, R.C., R. Varcoe, J., 2009. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1926–1939. <https://doi.org/10.1039/B819866G>
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., Jin, T., 2011. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 196, 4427–4435. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>
- Zhou, M., Wang, H., Hassett, D.J., Gu, T., 2013. Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 508–518. <https://doi.org/10.1002/jctb.4004>

## Comprendre et optimiser les anodes microbiennes grâce aux technologies microsystèmes

### Résumé

De multiples micro-organismes ont la capacité de catalyser l'oxydation électrochimique de matières organiques en s'organisant en biofilm à la surface d'anodes. Ce processus est à la base de procédés électro-microbiens très innovants tels que les piles à combustible microbiennes ou les électrolyseurs microbiens. L'interface biofilm/électrode a été l'objet de nombreuses études dont les conclusions restent difficiles à démêler en partie du fait de la diversité des paramètres interfaciaux mis en jeu.

L'objet de ce travail de thèse est d'exploiter les technologies microsystèmes pour focaliser l'impact de la topographie de surface des électrodes sur le développement du biofilm et sur ses performances électro-catalytiques. La formation de biofilms électroactifs de *Geobacter sulfurreducens* a été étudiée sur des électrodes d'or présentant des topographies bien contrôlées, sous la forme de rugosité, porosité, réseau de piliers, à des échelles allant du nanomètre à quelques centaines de micromètres. La présence de microrugosité a permis d'accroître les densités de courant d'un facteur 8 par rapport à une surface lisse et son effet a été quantifié à l'aide du paramètre  $S_a$ . Nous avons tenté de distinguer les effets des différentes échelles de rugosité sur le développement du biofilm et la vitesse des transferts électroniques. L'intérêt de la microporosité a été discuté. L'accroissement de surface active par la présence de micro-piliers s'est avéré très efficace et une approche théorique a donné des clés de compréhension et d'optimisation. Les connaissances acquises dans les conditions de culture pure ont finalement été confrontées avec la mise en œuvre de biofilms multi-espèces issus d'un inoculum complexe provenant de sédiments marins.

Mots-clés : Bioanode ; Rugosité ; Biofilm électroactif ; Adhésion bactérienne ; *Geobacter sulfurreducens* ; Systèmes bioélectrochimique

## Understanding and optimizing microbial anodes using microsystems technologies

### Abstract

Many microorganisms have the ability to catalyze the electrochemical oxidation of organic matter by self-organizing into biofilm on the surface of anodes. This process is the basis of highly innovative electro-microbial processes such as microbial fuel cells or microbial electrolysis cells. The biofilm/electrode interface has been the subject of numerous studies whose conclusions remain difficult to disentangle partly because of the diversity of the interfacial parameters involved.

The purpose of this thesis work is to exploit microsystem technologies to focus the impact of electrode surface topography on biofilm development and electro-catalytic performance. The formation of electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* was studied on gold electrodes presenting well-controlled topographies, in the form of roughness, porosity, pillar networks, at scales ranging from nanometer to a few hundred micrometers. The presence of micro-roughness increased the current densities by a factor of 8 compared to a smooth surface and its effect was quantified using the  $S_a$  parameter. We have tried to distinguish the effects of different roughness scales on biofilm development and electron transfer rates. The suitability of micro-porosity was discussed. The increase of active surface area by the presence of micro-pillars has proved very effective and a theoretical approach has given keys to understanding and optimization. The knowledge acquired under pure culture conditions was finally confronted with the use of multi-species biofilms formed from a complex inoculum coming from marine sediments.

Keywords : Bioanode; Roughness; Electroactive biofilm ; Bacterial adhesion ; *Geobacter sulfurreducens*; Bioelectrochemical system