

## Capítulo 2. Celda microbiana de biocombustible (CMB)

Una celda microbiana de biocombustible convierte un sustrato biodegradable directamente a electricidad. Ésto se consigue cuando las bacterias, a través de su metabolismo, transfieren electrones desde un donador, tal como la glucosa, a un aceptor de electrones. En una CMB, las bacterias no transfieren directamente los electrones producidos a su aceptor terminal, sino que éstos son desviados hacia el ánodo (Figura 2.1). Esta transferencia puede ocurrir de varias formas, bien sea a través de la membrana celular o a partir de un mediador soluble, y los electrones fluyen a través de un circuito externo (Rabaey y col., 2003).

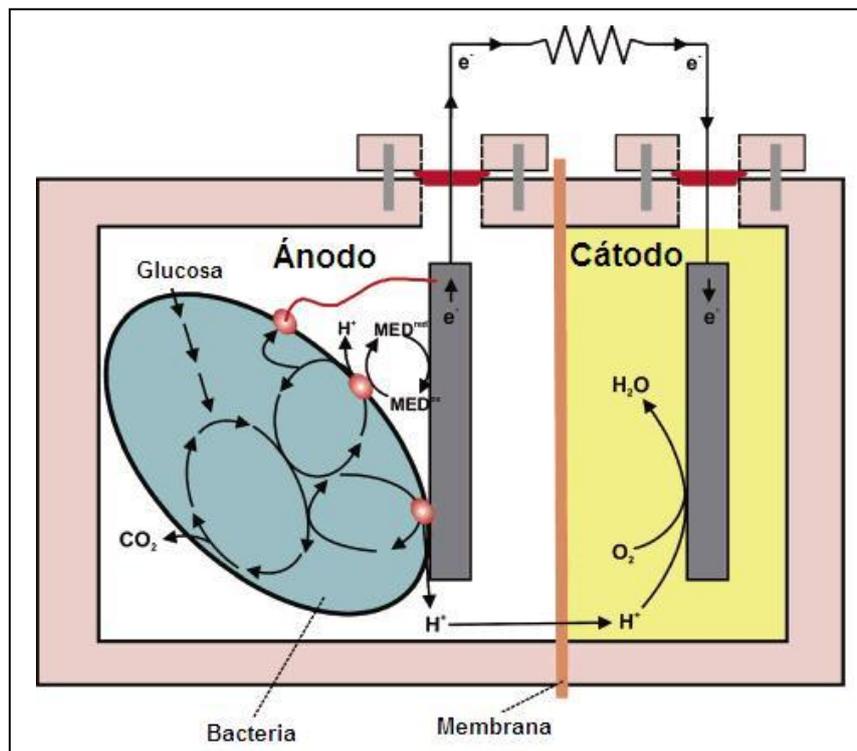


Figura 2.1. Celda microbiana de biocombustible (Rabaey y col., 2003)

El uso de microorganismos ofrece la ventaja en que pueden catalizar la oxidación de numerosos biocombustibles y pueden ser menos susceptibles a la inhibición, haciéndolos una opción popular para su uso en celdas de biocombustible.

Sin embargo, un gran inconveniente, es que puede ser extremadamente difícil utilizar los electrones generados por la reacción que ocurre dentro de la célula. Una de las soluciones es a través del uso de mediadores, sin embargo, los compuestos elegidos para este fin deben cumplir una serie de criterios, de los que destacan: Ser capaces de ser transportados a través de las membranas celulares de los microorganismos y de no ser tóxicos.

## 2.1 Estructura básica de una CMB

La estructura básica de una CMB se observó en la Figura 2.1; consta de dos cámaras, una catódica y una anódica separadas por una membrana de intercambio de protones (MIP) (Min y col., 2005). Los microorganismos en la cámara anódica oxidan los compuestos orgánicos como parte de su metabolismo y durante este proceso generan electrones y protones. Los electrones son transferidos al ánodo y son transportados a hacia el cátodo a través de un circuito externo. Para mantener el balance de cargas, los protones generados en la reacción atraviesan una membrana permeable a protones o un puente salino y una vez en la cámara catódica se unen con el oxígeno, para formar agua (Logan y col., 2006; Cheng y col., 2000a). En la Figura 2.2 se muestra un diseño típico de CMB.

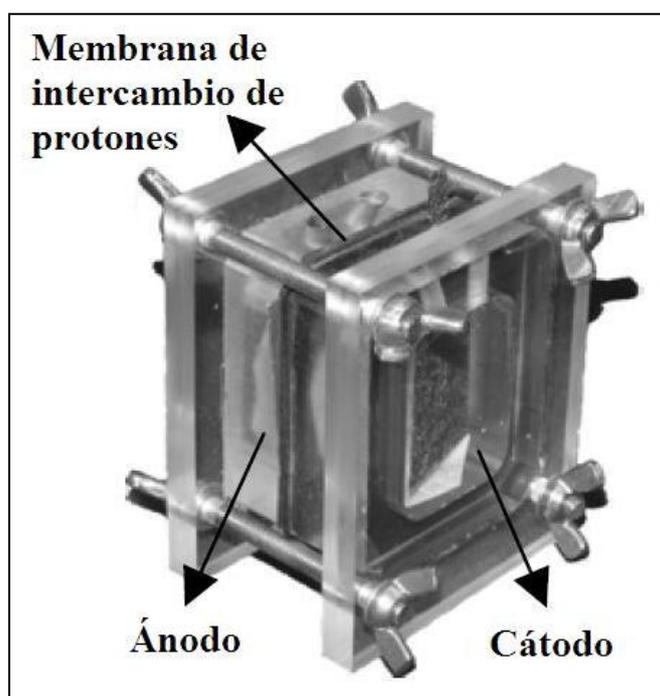


Figura 2.2 Diseño típico de una CMB (Ieropoulos y col., 2004)

El mecanismo por el cual son liberados los electrones al electrodo en las CMB es uno de los principales objetivos de estudio para llegar a entender el funcionamiento de este tipo de dispositivos y mejorar su eficiencia. El factor más importante para que una CMB genere una corriente de electrones que pueda ser utilizada es, sin duda alguna, el microorganismo o microorganismos utilizados para llevar a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica a compuestos como  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y la liberación de electrones al sistema. Otro factor es el tipo de inóculo, ya que se pueden emplear diferentes tipos de inóculos en las CMB. El inóculo puede provenir de un sistema aerobio como lodos activados (Lee y col., 2003), lodos anaerobios (Rabaey y col., 2003), aguas residuales domésticas (Min y Logan, 2004), aguas residuales industriales (Prasad y col., 2006), sedimentos marinos (Bond y col., 2002) o sedimentos acuáticos (Holmes y col., 2004a). Aunque los mejores resultados se han obtenido empleando lodos activados o anaerobios (Rabaey y col., 2003).

### 2.1.1 Ánodo

Los materiales con los que se deben construir los ánodos deben ser conductivos, biocompatibles y químicamente estables en la solución del reactor. Los ánodos metálicos consisten de una malla de acero inoxidable no corrosivo y que pueden ser utilizados para esta aplicación (Tanisho y col., 1989). El material de electrodo más versátil es el carbón, disponible como placas de grafito compacto, barras o gránulos, así como materiales fibrosos (fieltro, tela, papel, fibras, espuma) y carbón vítreo. Existen numerosos proveedores de carbón en el mundo, por ejemplo: E\_TEK and Electrosynthesis Co. Inc. (EUA), GEE Graphite Limited, Dewsbury (Inglaterra), Morgan, Grimbergen (Bélgica) y Alfa-Aesar (Alemania).

Los materiales utilizados más simples son las placas y las barras de grafito ya que son relativamente baratos, fáciles de manejar y tienen un área de contacto definida. Diversos tipos de productos de carbón como son papel, fibra, entre otros han sido utilizados extensivamente como electrodos. Mayores áreas superficiales pueden ser alcanzadas usando materiales compactos como el carbón vítreo reticulado (RVC; ERG Materials and Aerospace Corp., Oakland, CA), el cual se encuentra disponible con diferentes tamaños de poro o usando capas de gránulos de carbón o esferas (Le Carbone, Grimbergen, Bélgica). El efecto a largo plazo del crecimiento de la biopelícula o de las partículas en el flujo en cualquiera de las superficies no ha sido debidamente examinado todavía.

Para incrementar el desempeño del ánodo, se han utilizado diferentes estrategias químicas y físicas. Materiales electrocatalíticos como son compuestos de polianilinas han mostrado que mejoran la generación de corriente ayudando a la oxidación directa de metabolitos microbianos. Dirigir el flujo de agua a través del material del ánodo puede utilizarse para incrementar la potencia. El flujo hacia el ánodo también ha sido usado en reactores utilizando mediadores exógenos (Sell y col., 1989).

### 2.1.2 Cátodo

Debido a su buen desempeño, el ferrocianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) es muy popular como un aceptor experimental de electrones en las celdas microbianas de combustibles (Park y Seikus, 2003). La ventaja del ferrocianuro es el bajo sobrepotencial y la desventaja de su empleo es la oxidación insuficiente por oxígeno, lo que requiere que el catolito debe ser reemplazado regularmente. El desempeño a largo plazo del sistema puede verse afectado por difusión del ferrocianuro a través de la MIP y dentro de la cámara anódica.

El oxígeno es el aceptor de electrones más adecuado para una CMB debido a su alto potencial de oxidación, disponibilidad, bajo costo (es gratis), sustentabilidad y la carencia de residuos químicos. La elección del material del cátodo afecta de manera importante el desempeño y su variedad de aplicaciones (Cheng y col., 2006a). Para incrementar la velocidad de reducción del oxígeno, los catalizadores de platino son usados comunmente para oxígeno disuelto (Reimers y col., 2001) o cátodos de difusión de gas (Liu y col., 2004). Para reducir el costo de la CMB, la cantidad de platino puede mantenerse a 0.1 mg/cm (Cheng y col., 2006a). La estabilidad a largo plazo del platino

necesita ser investigada todavía. Recientemente, metales nobles han sido propuestos como cátodos para las CMB (Zhao y col., 2005; Cheng y col., 2006a).

### **2.1.3 Membrana de intercambio de protones (MIP)**

La mayoría de los diseños de CMB requieren la separación de la cámara anódica y la cámara catódica por una membrana de intercambio de protones. La MIP más comúnmente utilizada es el Nafion (DuPont Co., USA), el cual está disponible con números proveedores (Aldrich and Ion Power, Inc.). También existen otras opciones como Ultrex CMI-7000 ( Membranes International Incorp., Glen Rock, NJ) que también son adecuadas para CMB (Rabaey y col., 2004). Cuando se usan las membranas de intercambio de protones, es importante tener en cuenta que pueden ser permeables a químicos, tales como el oxígeno, ferrocianuro, otros iones o materia orgánica usada como sustrato. El mercado de las membranas está en constante crecimiento y se requieren más estudios para evaluar los efectos de la membrana en el desempeño y estabilidad a largo plazo (Rozendal y col., 2006).

## **2.2 Condiciones de operación**

Hasta este momento, el desempeño de las CMB a nivel laboratorio es mucho menor que el desempeño ideal de estos sistemas. Puede haber muchas razones posibles. El desempeño de una CMB es alterado por muchos factores incluyendo el tipo de microorganismos utilizados, el tipo y concentración de la biomasa utilizada como combustible, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la configuración del reactor (Liu y col., 2005b). Los parámetros de operación pueden regularse para bajar la polarización y para aumentar el desempeño de una CMB.

## **2.3 pH y electrolito**

Sin una solución amortiguadora en una CMB, obviamente existirá una diferencia de pH entre la cámara anódica y la cámara catódica, aunque teóricamente no habría cambio de pH cuando la velocidad de reacción de protones, electrones y oxígeno en el cátodo es igual a la velocidad de producción de protones en el ánodo. La membrana de intercambio de protones causa una barrera en el transporte a través de la membrana de difusión de protones, por lo que el transporte de protones a través de la membrana es más lento que su velocidad de producción en el ánodo y su velocidad de consumo en la cámara catódica en la etapa inicial de la operación de la CMB, de este modo hay una diferencia de pH. Sin embargo, la diferencia de pH incrementa la fuerza motriz de la difusión de protones de la cámara anódica a la cámara catódica y finalmente forma un equilibrio dinámico. Algunos de los protones generados con la biodegradación de sustratos orgánicos transferidos a la cámara catódica pueden reaccionar con el oxígeno disuelto mientras algunos protones son acumulados en la cámara anódica cuando ellos no se transfieren a través de la membrana de intercambio de protones. Gil y col. (2003) detectaron una diferencia de pH de 4.1 después de 5 horas de operación con un pH inicial de 7 sin utilizar amortiguadores (buffer). Con la adición de un amortiguador de fosfatos (pH 7), el cambio de pH en el ánodo y cátodo fue de menor de 0.5 unidades y la salida de corriente se incrementó alrededor de 1 a 2 veces.

Sin embargo, el proceso microbiano anódico prefiere un pH neutro y las actividades microbianas disminuyen en un pH más alto o más bajo, por lo que el empleo de amortiguadores es fundamental (He y col., 2008).

## **2.4 Mecanismos de transferencia de electrones**

La transferencia extracelular de electrones se puede definir como el proceso en el cual los electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor terminal de electrones extracelular (Lovley, 2008). Se han planteado diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos liberan los electrones al electrodo: Transferencia directa con la participación de citocromos, transferencia con ayuda de mediadores externos o producidos por el mismo organismo y transferencia por medio de los nanocables bacterianos o *pili*.

### **2.4.1 Transferencia directa de electrones al electrodo**

Los electrógenos son microorganismos que conservan la energía permitiendo el crecimiento por la oxidación de compuestos orgánicos a dióxido de carbono y con la transferencia directa de electrones a los ánodos de las CMB (Lovley y Kevin, 2008). Estos microorganismos son conocidos también como anodofílicos. Entre los microorganismos más estudiados de esta clase se encuentran los *Geobacter* y *Rhodospirillum rubrum*; los cuales poseen mecanismos internos de transporte de electrones y no requieren la ayuda de mediadores para liberar dichos electrones al ánodo. La producción de electricidad utilizando microorganismos electrógenos en la CMB tiene algunas ventajas significativas (Bond y Lovley, 2003). Una de ellas es la completa oxidación de la materia orgánica a dióxido de carbono que estos microorganismos hacen posible y que se traduce en una alta eficiencia coulombica en el proceso (Lovley y Nevin, 2008). Otra ventaja utilizando electrógenos es su sustentabilidad a largo plazo. Se han reportado CMB que han sido operadas por más de 2 años sin bajar la producción de electricidad (Lovley y Nevin, 2008).

La reacción que se lleva a cabo en el ánodo sin mediadores se ha estudiado principalmente en los *Geobacteraceae*, en este proceso el ánodo actúa como aceptor final de electrones de manera similar a como lo hacen con los óxidos minerales sólidos que se encuentran en el subsuelo, su hábitat natural. Los *Geobacteraceae* son un grupo de microorganismos capaces de acoplar la respiración anaerobia a la reducción de metales en el ambiente. Debido a su metabolismo son capaces de biorremediar varios metales pesados incluyendo el Uranio(VI), Vanadio(VI) y Cromo(VI); así como biodegradar varios contaminantes orgánicos como los hidrocarburos monoaromáticos. Recientemente dicha especie se ha usado para generar electricidad a partir de desechos orgánicos, ya que su metabolismo único la hace sobresaliente en este campo (Lovley, 2008).

*Geobacter* pertenece a los microorganismos reductores de metales, los cuales producen energía útil biológicamente en forma de ATP durante la reducción de óxidos de metales bajo condiciones anaerobias en suelos y sedimentos. Su característica principal es la habilidad para oxidar compuestos orgánicos como ácidos grasos, alcoholes, compuestos monoaromáticos por la vía de los ácidos

tricarboxílicos, mediante la transferencia de electrones a óxidos de Fe(III) insolubles, sustancias húmicas u óxidos de Mn(IV) (Lovley, 2008).

La mayoría de los estudios relacionados con la transferencia de electrones se han hecho utilizando *Geobacter sulfurreducens*, ya que su genoma se conoce completamente y se sabe que es un gran generador de potencia. La manera en que esta bacteria transfiere electrones al electrodo, es a través de una serie de citocromos tipo *c* (más de 100 codificados en su genoma), asociados a la membrana interna, periplasma y membrana externa (Methé y col., 2003; Lovley, 2008).

*Rhodoferrax ferrireducens*, es también una bacteria de especial importancia en la producción de bioelectricidad, fue aislada de sedimentos del subsuelo como un reductor de Fe(III), oxida azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y xilosa a CO<sub>2</sub> con el 80% de la recuperación de los electrones en forma de electricidad. La gran producción de energía se le atribuye a la cantidad de células adheridas a la superficie del electrodo durante largos periodos de tiempo y a su habilidad para mantenerse activa. Por lo que, debido a la conversión de varios tipos de azúcares a electricidad y a su capacidad de mantenimiento sin disminuir su desempeño, *Rhodoferrax* es un candidato ideal para ser utilizado en las CMB (Chaudhuri y Lovley, 2003; Du y col., 2007; Risso y col., 2009).

## **2.4.2 Transferencia con ayuda de mediadores**

Un mediador es un compuesto que puede entrar en la célula, aceptar electrones de varios acarreadores intracelulares de electrones, salir de la célula en estado reducido y entonces donar los electrones al ánodo. Estos mediadores juegan un papel fundamental en la transferencia de electrones, en aquellos microorganismos que son incapaces de transferir electrones al ánodo directamente.

### **2.4.2.1 Mediadores producidos por el mismo microorganismo**

Los microorganismos que tienen la capacidad de reducir Fe(III) enfrentan el problema de cómo tener acceso efectivo a un aceptor de electrones que no puede difundirse en la célula. Las bacterias del género *Shewanella* han resuelto este problema liberando quinonas solubles que pueden acarrear electrones de la superficie celular a óxido de Fe(III) aunque éste se encuentre a una distancia considerable de la célula. Se ha reportado que *Shewanella* tiene la capacidad de transferir electrones a metales localizados a más de 50 µm de la superficie de la célula (Lovley, 2008).

Las bacterias del género *Shewanella* son miembros de las Proteobacterias, son microorganismos acuáticos con una amplia distribución alrededor del mundo: Forman un grupo diverso de bacterias anaerobias facultativas que se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce (Hau y Gralnick, 2007). Son fisiológicamente diversos, por lo que pueden tener varias aplicaciones biotecnológicas, como son, la bioremediación de compuestos clorados, radioactivos y otros contaminantes ambientales, así como la generación de energía.

Las bacterias *Shewanellae* pueden respirar empleando un diverso grupo de aceptores de electrones, lo que les ha permitido adaptarse a ambientes extremos y variados. Estos organismos son fáciles de

crecer y manejar en un laboratorio, por lo que muestran un gran potencial para la biorremediación de varios contaminantes ambientales y para producir electricidad.

Diversos estudios han sugerido que las células de *Shewanella* tienen la capacidad para producir y secretar acarreadores endógenos de electrones para promover la reducción de óxidos de Fe(III), aunque dichos compuestos no han sido totalmente identificados, han surgido reportes que intentan identificarlos. Recientemente se demostró que este microorganismo produce flavinas que emplean como mediadores para la transferencia de electrones fuera de la célula (Von Canstein y col., 2007; Marsili y col., 2008).

El mecanismo de transferencia de electrones hacia la superficie del electrodo, por esta bacteria, no ha sido elucidado, pero son de vital importancia los citocromos localizados en la membrana. Sin embargo, se cree que los nanocables o *pili* de *Shawenella*, puede facilitar la transferencia de electrones en distancias muy largas. Las aplicaciones de esta bacteria en los aparatos generadores de corriente incluyen el tratamiento de aguas residuales, la conversión de biomasa de desecho y el uso como proveedor de electricidad a sensores ambientales en cuerpos acuáticos como lagos, ríos y océanos, donde los sedimentos ricos en materia orgánica proveen de una fuente de electrones (Hau y Gralnick, 2007).

#### **2.4.2.2 Mediadores adicionados exógenamente**

En el caso de microorganismos que no son capaces de producir sus propios mediadores y que son incapaces de transferir eficientemente los electrones derivados del metabolismo central afuera de la célula, requieren de la adición de mediadores exógenos que transporten los electrones al ánodo.

Las propiedades que se buscan en un compuesto para ser utilizado como un buen mediador son (Bullen y col., 2006):

- a) Un potencial bastante diferente del potencial del organismo para facilitar la transferencia de electrones mientras se mantiene un alto potencial electroquímico en la celda
- b) Un alto coeficiente de difusión en el electrolito y en la membrana celular
- c) Rápida transferencia de electrones de el organismo al electrodo
- d) Capacidad para repetidos ciclos redox
- e) No citotoxicidad
- f) Buenos perfiles de absorción-adsorción-resorción al organismo, electrodo y otras superficies de la CMB, de forma que permanezca en la solución y permanezca disponible para el proceso

Ejemplos de compuestos de este tipo son; rojo neutro, fenazinas, fenotiazinas, entre otros (Lovley, 2006).

Existen varios problemas y desventajas en el uso de mediadores para facilitar el transporte de electrones, entre ellos se encuentra el hecho de que los compuestos utilizados suelen ser tóxicos para los seres humanos, por lo que se debe evitar la utilización de estos compuestos en los procesos de

producción de electricidad en lugares que se exponga el medio ambiente a ellos, como puede ser en plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos acuáticos, entre otros.

Otra desventaja es el corto tiempo que se mantienen estables estos compuestos, lo cual, limita el tiempo de vida de la CMB. Además, incluso en presencia de mediadores, los microorganismos fermentativos producen ácidos por fermentación, lo que eventualmente desestabiliza el sistema, ya que la mayoría de los electrones presentes inicialmente en el combustible se recuperan en la fermentación de estos ácidos, en mayor cantidad que como electricidad, y, por lo tanto, la eficiencia es baja en estos sistemas sin importar el uso de los mediadores.

### **2.4.3 Transferencia por medio de los nanocables bacterianos (pili)**

En estudios recientes se ha descubierto la presencia de *nanocables* en algunos microorganismos *electrigenos*. Estos *pili* se han identificado en bacterias como *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, una cianobacteria fototrófica *Synechocystis* y un microorganismo fermentador termofílico *Pelotomaculum thermopropionicum* (Gorby y col., 2006).

Existen opiniones encontradas con respecto a la presencia de estas estructuras en las bacterias que pueden reducir óxidos de Fe(III) o Mn(IV). El crecimiento en Fe (III) requiere de la presencia de *pili* especializados, los cuales son conductores de electrones y se encuentran localizados a un costado de la célula. Estos *pili* son los encargados de realizar la conexión eléctrica entre la célula y los óxidos de Fe(III) y deben estar en contacto directo con el ánodo de la CMB o formando una red entre las células para facilitar la transferencia de electrones a través de la biopelícula lo mejor posible, pues se sabe que *Geobacter* crece en monocapas y los *pili* proveen soporte estructural en la formación de dicha biopelícula y son esenciales en la generación de corriente (Lovley, 2006).

Utilizando *G. sulfurreducens* se realizó un estudio en el que se evalúa la transferencia de electrones en presencia de Fe(III) soluble e insoluble y el papel que juega la presencia o ausencia de *pili* en este proceso. *G. sulfurreducens* produce *pili* durante su crecimiento en óxido de Fe(III) pero no en Fe(III) soluble, lo que hace suponer que la producción de *pili* es una manera de alcanzar el Fe(III) no soluble en los sedimentos. Reguera y col. (2005), evaluaron la conductividad eléctrica a través de los *pili* mediante microscopía de fuerza atómica. (AFM por sus siglas en inglés). Los resultados en esos estudios muestran que los *pili* de *G. sulfurreducens* son altamente conductivos e indican que *Geobacter* requiere de estas estructuras para poder reducir óxidos de Fe(III) en el ambiente. Estos resultados nos llevan a pensar que la producción de apéndices conductores en bacterias que reducen óxidos metálicos es un mecanismo de transferencia de electrones de la célula hacia el aceptor externo de electrones (Reguera y col., 2005).

## **2.5 Microorganismos en una CMB**

Como ya se mencionó anteriormente, una CMB es un dispositivo que utiliza microorganismos para generar una corriente eléctrica a través de la oxidación de materia orgánica. Los microorganismos en la CMB metabolizan sustratos orgánicos y extracelularmente transfieren electrones a la superficie del electrodo. La oxidación de la materia orgánica libera electrones y protones del sustrato oxidado. Los

electrones son transferidos al ánodo y después al cátodo a través de una red eléctrica. Los protones migran hacia el cátodo y se combinan con los electrones y una sustancia química, como el oxígeno, que se reduce en la superficie del cátodo. Por lo tanto, una corriente eléctrica se genera de forma similar a una celda de combustible químico, pero con microorganismos actuando como catalizadores en la superficie del ánodo. Los catalizadores, en general, aumentan la velocidad de una reacción sin cambiar o recibir energía de la reacción que catalizan. Los microorganismos en una CMB no son verdaderos catalizadores, puesto que obtienen energía de la oxidación del sustrato para apoyar su propio crecimiento y crear una pérdida de energía, la que posteriormente se aprovecha. Los microorganismos en una CMB pueden obtener toda la energía y el carbono que se necesitan para su crecimiento de la oxidación de la materia orgánica compleja y, como tal, la tecnología CMB se ha considerado autosuficiente (Minteer y col., 2007). Siempre que las condiciones se mantengan favorables para la producción corriente en el ánodo con microorganismos asociados, las CMB tienen el potencial para producir electricidad de forma indefinida.

Se ha encontrado que una gran diversidad de microorganismos se puede asociar con los electrodos en los sistemas de CMB, sobre todo cuando un inóculo del medio ambiente se utiliza para alimentar a la CMB (Bond y col., 2002; Kim y col., 2004; Phung y col., 2004; Rabaey y col., 2004; Aelterman y col., 2006a). Una biopelícula se define como un conjunto de bacterias asociadas a una superficie. Es probable que no todos los organismos asociados a una biopelícula en el ánodo puedan interactuar directamente con él, pero pueden interactuar indirectamente a través de otros miembros en la comunidad de la biopelícula. Por ejemplo, *Brevibacillus* sp. PTH1 resultó ser un miembro abundante en sistemas de CMB. La producción de energía por *Brevibacillus* sp. PTH1 es baja a menos que se cultive con *Pseudomonas* sp. (Pham y col., 2008). Los cultivos puros capaces de producir corriente en una CMB están representados por: *Firmicutes* (Park y col., 2001), *Acidobacteria* (Bond y Lovley, 2005), cuatro de las cinco clases de *Proteobacteria* (Chaudhuri y Lovley, 2003; Rabaey y col., 2004; Zhang y col., 2004; Zuo y col., 2007; Borole y col., 2008; Zhang y col., 2008; Zhao y col., 2008), así como cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Walker y Walker, 2006) y *Hansenula anomala* (Prasad y col., 2007). Estos organismos interactúan con un ánodo a través de una variedad de procesos directos e indirectos produciendo corriente en diversos grados.

Una medida común de la eficiencia de cualquier CMB es la eficiencia coulombica, es una medida del número de coulombs recuperados como corriente eléctrica en comparación con el número máximo teórico de coulombs recuperables del sustrato orgánico añadido al sistema. La eficiencia coulombica de la CMB depende, en parte, de los microorganismos que están llevando a cabo la oxidación y del sustrato, del cual los electrones se derivan (Torres y col., 2007; Freguia y col., 2008; Lee y col., 2008). Ésto se debe a las diferentes vías metabólicas utilizadas por los diferentes microorganismos y los mecanismos por los cuales los microorganismos realizan la transferencia de electrones hacia el ánodo. Para ganar la mayor cantidad teórica de energía a partir de un sustrato orgánico, el sustrato debe ser completamente oxidado a dióxido de carbono con una transferencia eficiente de los electrones hacia el electrodo. Sin la oxidación completa del sustrato, la energía se pierde en el sistema en forma de sustrato sin oxidar. Por ejemplo, estudios con *Shewanella oneidensis* demostraron que no oxidaron por completo el lactato como sustrato en la CMB, dejando escapar electrones en forma de productos de desecho, tal como el acetato; este sistema tuvo una eficiencia coulombica de aproximadamente 56.2% (Lanthier y col., 2008). Cuando los microorganismos en una

CMB son capaces de oxidar completamente el sustrato orgánico a CO<sub>2</sub> se han reportado mayores eficiencias coulombicas. Las bacterias capaces de oxidar por completo un sustrato orgánico en una CMB son: *Geothrix fermentans* (94% de eficiencia coulombica oxidando acetato) (Bond y Lovley, 2005), las especies *Geobacter* (aproximaciones al 100% de eficiencia coulombica oxidando acetato o el 84% oxidando benzoato) (Bond y col., 2002; Bond y Lovley, 2003; Nevin y col., 2008), y *Rhodoferax ferrireducens* (83% de eficiencia coulombica oxidando glucosa) (Chaudhuri y Lovley, 2003). Las eficiencias coulombicas pueden variar en gran medida cuando se utilizan inóculos del medio ambiente, tales como aguas residuales, con un máximo de 65-89% después del enriquecimiento microbiano (Rabaey y col., 2003).

Una serie de otros indicadores se han propuesto para medir la eficiencia de las CMB y para la comparación de la tecnología CMB con otras tecnologías de conversión de materia orgánica en energía. Estos incluyen la eficiencia de captura energética, la eficiencia de voltaje, la eficiencia de transferencia de masa y la eficiencia energética del proceso (Rittmann y col., 2008a).

Dependiendo de la pérdida de energía debido a la reacción en el cátodo y el metabolismo bacteriano, se puede obtener un voltaje de 0.3 a 0.5 V a partir de sustratos orgánicos como la glucosa o el ácido acético (Logan, 2009). Los estudios están demostrando que cualquier compuesto degradable por las bacterias se puede convertir en electricidad (Pant y col., 2009). La gama de compuestos incluyen, pero no se limitan a: Acetato (Bond y Lovley, 2003; Nevin y col., 2008), glucosa (Kim y col., 2000), almidón (Lu y col., 2009), celulosa (Ren y col., 2008), paja de trigo (Zhang y col., 2009a), piridina (Zhang y col., 2009b), fenol (Luo y col., 2009), p-nitrofenol (Zhu y Ni, 2009) y soluciones complejas, como las aguas residuales urbanas (Liu y Logan, 2004; You y col., 2006), residuos de fábrica de cerveza (Feng y col., 2008), lixiviados (Gálvez y col., 2009), residuos de la industria del chocolate (Patil y col., 2009), ácidos grasos mezclados (Freguia y col., 2009) y compuestos de petróleo (Morris y Jin, 2009).

## **2.6 Los protones en la biopelícula**

La oxidación de la materia orgánica produce tanto protones y electrones. Los electrones son removidos casi instantáneamente a través de la biopelícula y el circuito eléctrico de la CMB. Los protones (más grandes) tienen que migrar fuera de la biopelícula y después hacia el cátodo. Ésto ocurre a un ritmo mucho más lento y puede causar una baja en la producción de energía. Por cada electrón producido en forma de corriente, también se produce un protón dentro de la biopelícula. Se ha observado un gradiente de protones a través de la biopelícula, entre la superficie del ánodo y el líquido del medio (Franks y col., 2009). La producción de corriente por los microorganismos en la CMB causa un aumento de diez veces la concentración de protones, equivalente a 1 unidad de pH. También se ha observado que la disminución del pH en el volumen del líquido disminuye la producción de energía (Torres y col., 2008; Nevin y col., 2009). Modelos predicen que una acumulación de protones podría dar lugar a zonas de inactividad metabólica dentro de la biopelícula (Torres y col., 2008). Sin embargo, la actividad metabólica ha sido observada a lo largo de toda la biopelícula (Lee y col., 2009; Franks y col., 2010).

## 2.7 Consorcios microbianos y sintrofia

La sintrofia se puede definir como la asociación o dependencia de 2 o más tipos diferentes de organismos que combinan sus capacidades metabólicas para catabolizar un sustrato que no puede ser catabolizado por alguno de estos organismos de manera independiente (Torres y col., 2007; Rittmann y col., 2008b, Torres y col., 2008a). Este concepto es aplicable para las CMB ya que para dar el siguiente paso y diseñarlas para la producción a escala industrial, se debe pensar en utilizar sustratos complejos, los cuales poseen diversos nutrientes, y los microorganismos utilizados deben ser capaces de procesarlos o por lo menos no verse afectados por su presencia. Un buen ejemplo de esto es la producción de metano e hidrógeno o electricidad por sintrofia en sistemas de bioenergía microbianos.

La materia orgánica compleja debe ser hidrolizada y fermentada a productos simples que pueden ser convertidos directamente a los productos finales deseados. Para producir  $\text{CH}_4$ , los metanogénicos usan solo acetato o  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  y todos los electrones deben ser transportados hacia  $\text{H}_2$  y acetato. Para la generación de biohidrógeno, el producto final de la fermentación debe ser  $\text{H}_2$ , lo cual significa que otros productos de la fermentación como acetato, propionato, etanol y butirato, son consumidores indeseables de electrones. La síntesis de estos productos reduce la producción global de  $\text{H}_2$ . Así mismo, la oxidación de  $\text{H}_2$  para formar  $\text{CH}_4$  debe ser suprimida cuando el objetivo principal es la producción de hidrógeno. En un proceso de este tipo, la acumulación excesiva de hidrógeno puede detener termodinámicamente el proceso de fermentación que lo produce, y por lo tanto una sintrofia balanceada entre bacterias que producen por fermentación hidrógeno y microorganismos metanogénicos que oxidan el hidrógeno, es la clave para llevar a cabo la metanogénesis de manera efectiva. En procesos de producción de biohidrógeno, los metanogénicos deben ser suprimidos, lo cual significa que el  $\text{H}_2$  debe ser recolectado rápidamente para evitar su acumulación. En una CMB, la acumulación de hidrógeno puede llevar a dos resultados indeseables: Disminución de la velocidad de fermentación o desviación del flujo de electrones hacia  $\text{CH}_4$  (Freguia y col., 2008).

## 2.8 Diseños de CMB

En la actualidad existen diferentes configuraciones de CMB (Figuras 2.3 y 2.4). Un diseño ampliamente utilizado y de bajo costo es la CMB de dos cámaras construida en forma de “H”, que consiste por lo general de dos contenedores conectados por un tubo que contiene en su interior un separador que suele ser una membrana de intercambio de protones (MIP) como Nafion (Park y Zeikus, 1999; Bond y col., 2002; Logan y col., 2005a; Min y col., 2005) o Ultrex (Rabaey y col., 2003) o un puente salino (Min y col., 2005) (Figuras 2.3a y 2.3f). La clave de este diseño, es elegir una membrana que permita a los protones a pasar entre las cámaras (La MIP también se conoce como membrana de intercambio de protones) y que no acepte el paso del sustrato o del aceptor de electrones a la cámara catódica. En la configuración “H”, la membrana se fija en el centro del tubo que conecta a los frascos (Figura 2.3f). Sin embargo, el tubo por sí mismo no es necesario mientras las dos cámaras se mantengan separadas. Las cámaras pueden estar presionadas sobre ambos lados de la membrana y sujetarse entre sí para formar una gran superficie (Figura 2.3b). Una forma económica de unir las botellas es utilizar un puente salino. Esto es, un tubo en U invertido que contiene una disolución de KCl y proporciona un medio conductor eléctrico entre dos disoluciones.

Los orificios del tubo en U se taponan con bolas de algodón para evitar que la disolución de KCl fluya hacia los recipientes, al tiempo que se permite el paso de aniones y cationes. El puente salino en una CMB produce poca energía debido a la alta resistencia interna observada.

Los sistemas “H” son aceptables para la investigación de parámetros básicos tales como la producción de energía utilizando nuevos materiales o la observación de comunidades microbianas que se presentan durante la degradación de compuestos específicos, pero en general, estos sistemas suelen producir bajas densidades de potencia. La cantidad de energía que se genera en estos sistemas se ve afectada por la superficie del cátodo con respecto a la del ánodo (Oh y col., 2004) y por la superficie de la membrana (Oh y Logan, 2006). La densidad de potencia producida por estos sistemas suele estar limitada por la alta resistencia interna y pérdidas en los electrodos. Al comparar la energía producida por estos sistemas, tiene más sentido compararlos sobre la base de ánodos, cátodos y membranas del mismo tamaño (Oh y Logan, 2006).

El uso de ferrocianuro como aceptor de electrones en la cámara del cátodo incrementa la densidad de potencia debido a la disponibilidad de un buen aceptor de electrones a altas concentraciones. El ferrocianuro incrementa la potencia entre 1.5 y 1.8 veces en comparación con un cátodo de platino y oxígeno disuelto (diseño H con una MIP de Nafion) (Oh y Logan, 2006). Las densidades de potencia más altas registradas para sistemas CMB han sido sistemas de baja resistencia interna con ferrocianuro en el cátodo (Rabaey y col., 2004; Rabaey y col., 2003). Aunque el ferrocianuro es un excelente catalizador en términos de rendimiento del sistema, éste debe ser regenerado químicamente y su uso no es sostenible en la práctica. Por lo tanto, el uso de ferrocianuro se limita a estudios de laboratorio.

No es indispensable poner el cátodo en agua o en una cámara separada cuando se utiliza oxígeno en el cátodo. El cátodo se puede poner en contacto directo con el aire (Figuras 2.3e, 2.3c, 2.3d), ya sea en presencia o ausencia de una membrana (Liu y Logan, 2004). También se han registrado grandes densidades de potencia utilizando oxígeno como aceptor de electrones cuando cátodos acuosos se sustituyen con cátodos de aire. En la configuración más simple, el ánodo y el cátodo se colocan a ambos lados de un tubo, con el ánodo sellado contra una placa plana y el cátodo expuesto al aire por un lado y al agua por el otro (Figura 2.3e). La utilización de oxígeno por las bacterias en la cámara del ánodo puede resultar en una menor eficiencia coulombica (definida como la fracción de electrones recuperados como corriente versus la recuperación máxima posible, véase más adelante) (Liu y Logan, 2004).

Otras variaciones de estos diseños básicos han surgido en un esfuerzo por aumentar la generación de energía o para establecer un flujo continuo a través de la cámara del ánodo, en contraste con los sistemas anteriores, los cuales fueron operados en modo batch (tandas de alimentación al ánodo). Estos sistemas se han diseñado con un reactor cilíndrico exterior con un tubo concéntrico interior que funciona como cátodo (Habermann y Pommer, 1991; Liu y col., 2004) (Figura 2.4d) y con un reactor cilíndrico interno (ánodo que consta de medios granulares) con el cátodo en el exterior (Rabaey y col., 2005a) (Figura 2.4a). Otra variación, es el diseño del sistema de un reactor de biopelícula de flujo ascendente de lecho fijo, con el líquido fluyendo continuamente a través de ánodos porosos

hacia una membrana que separa el ánodo de la cámara catódica (He y col., 2005) (Figura 2.4b). Otros sistemas se han diseñado para parecerse a las celdas de combustible de hidrógeno, en donde una MIP se intercala entre el ánodo y el cátodo (Figura 2.4c). Para aumentar el voltaje del sistema, las CMB se pueden apilar para formar una serie de placas planas o unir las celdas en serie (Aelterman y col., 2006a) (Figura 2.4e).

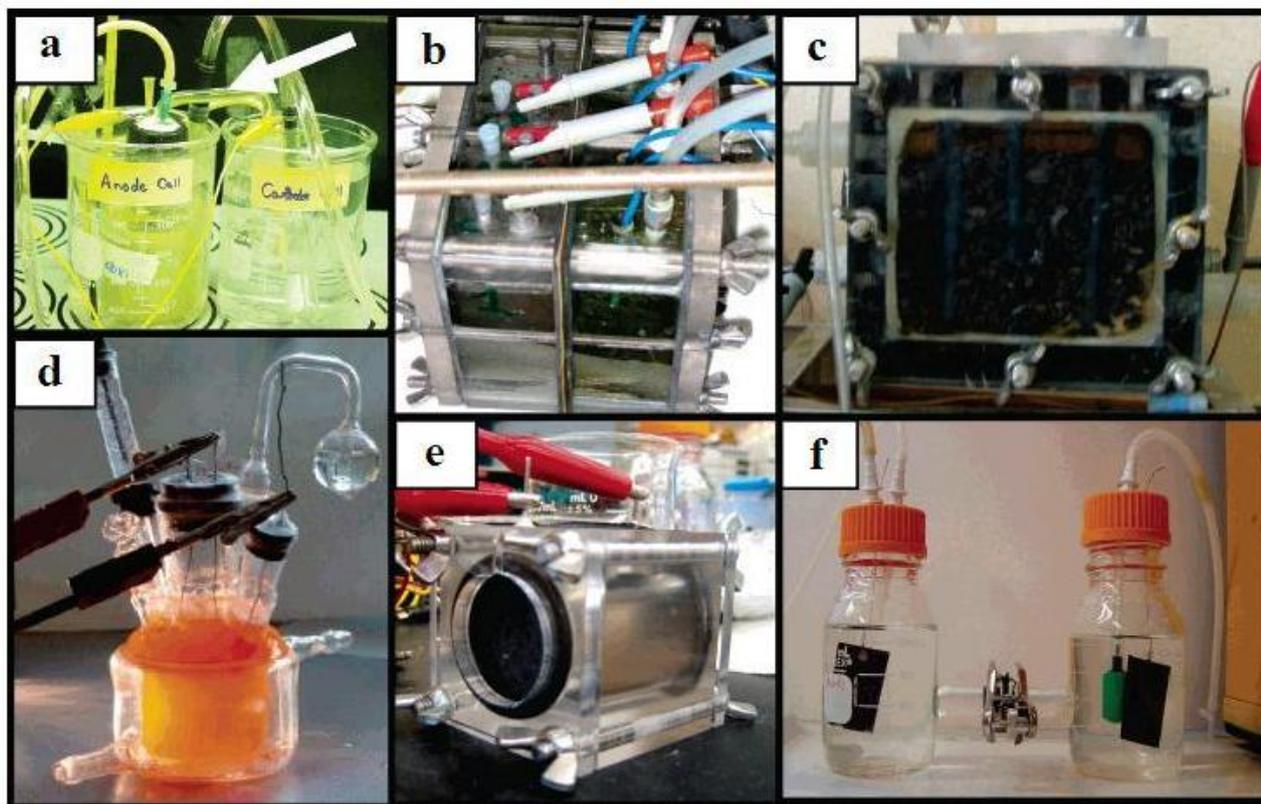


Figura 2.3 Diferentes diseños de CMB: (a) Sistema de fácil construcción que contiene un puente de sal (mostrado por la flecha) (Min y col., 2005); (b) Cuatro CMB alimentadas en tandas (batch-mode), las cámaras están separadas por una membrana (sin tubo) y están unidas por medio de tornillos (Rabaey y col., 2005b); (c) igual que b, pero con un flujo continuo a través del ánodo (Rabaey y col., 2005c); (d) CMB de tipo fotoheterotrófico (Rosenbaum y col., 2005); (e) CMB de una sola cámara con cátodo de aire (Liu y Logan, 2004); (f) sistema de dos cámaras tipo H que muestra las cámaras del ánodo y el cátodo equipadas con burbujeo de gas (Logan y col., 2005a).

Las CMB de sedimentos se construyen al colocar un electrodo dentro un sedimento marino rico en materia orgánica y sulfuros, y el otro al colocarlo en el agua por encima del sedimento, la electricidad puede ser generada a niveles suficientes como para alimentar algunos dispositivos marinos (Reimers y col., 2001; Tender y col., 2002). Los protones dirigidos por el agua de mar pueden producir una densidad de potencia de hasta  $28 \text{ mW/m}^2$ . Discos de grafito pueden ser utilizados como electrodos (Reimers y col., 2001; Bond y col., 2002), aunque también se han utilizado electrodos en forma de malla de platino (Tender y col., 2002). Los sedimentos también se han colocado en sistemas H de dos cámaras para permitir la investigación de las comunidades bacterianas (Bond y col., 2002).

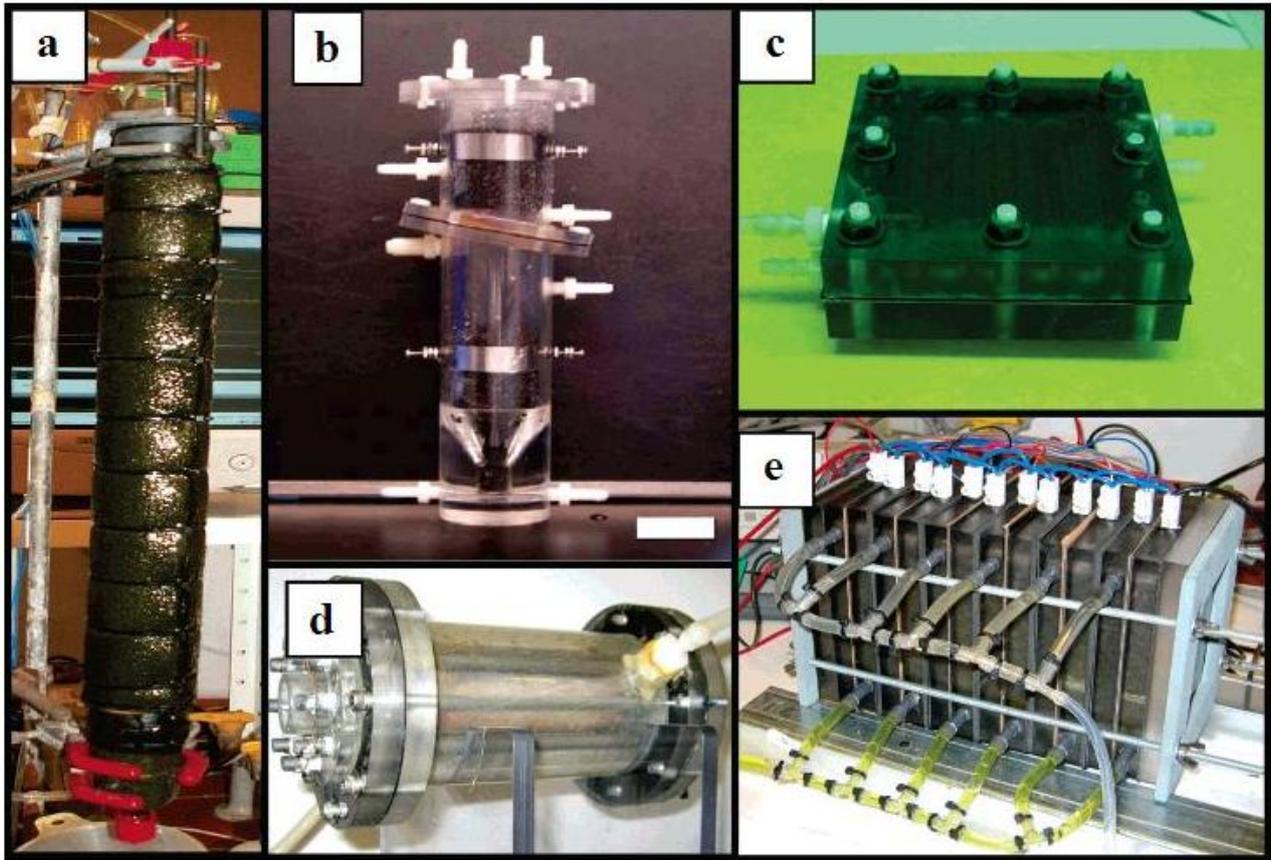


Figura 2.4 CMB utilizadas en operación continua: (a) CMB de tipo tubular de flujo ascendente con ánodo interior de grafito y cátodo exterior (Rabaey y col., 2005a); (b) CMB de tipo tubular de flujo ascendente con el ánodo debajo y el cátodo arriba, la membrana está inclinada (He y col., 2005); (c) Diseño de placa plana, un canal se divide en bloques de modo que el líquido puede fluir en una serpentina a través del electrodo (Min y Logan, 2004); (d) sistema de una sola cámara con un cátodo de aire interior concéntrico rodeado por una cámara que contiene barras de grafito como ánodo (Liu y col., 2004); (e) CMB apiladas, seis CMB separadas se unen en un solo bloque (Aelterman y col., 2006a).

### 2.8.1 Celda microbiana de combustible de producto

Este tipo de dispositivos no son “verdaderas” celdas de biocombustible. En general consisten en la producción de hidrógeno por medio de procesos de fermentación realizados en un recipiente totalmente independiente del que contiene la celda. El hidrógeno generado es usado para alimentar una celda de combustible  $H_2/O_2$  como se muestra en la Figura 2.5. Para que un sistema de producto se considere como una verdadera celda de biocombustible, implica la combinación de las dos unidades de operación, de manera que el proceso microbiano y el de reacción de electrodo tengan lugar en el mismo compartimento (Figura 2.6).

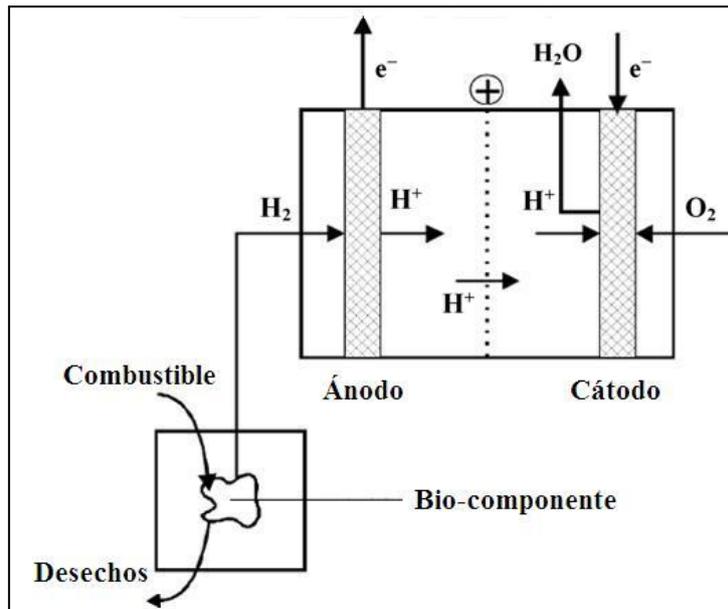


Figura 2.5. Sistema de tipo de producto: Fermentador externo que alimenta a la celda de combustible  $H_2/O_2$  (Bullen y col., 2006)

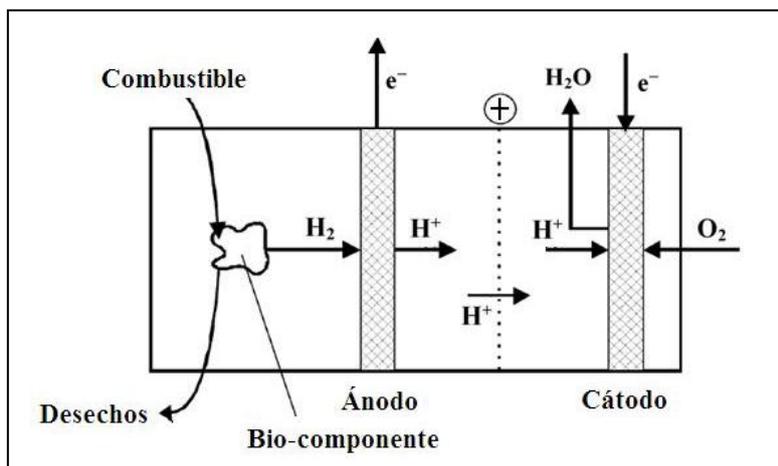
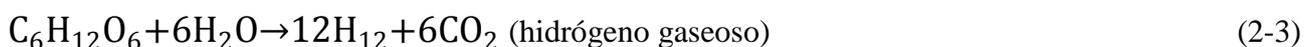


Figura 2.6 Sistema de tipo de producto: Compartimento fermentador/ánodo en la celda de biocombustible (Bullen y col., 2006)

Otros combustibles también se producen por procesos de producto; por definición los biocombustibles se obtienen de la manipulación de los procesos orgánicos. Entre las reacciones estequiométricas principales del metabolismo fermentativo microbológico están:



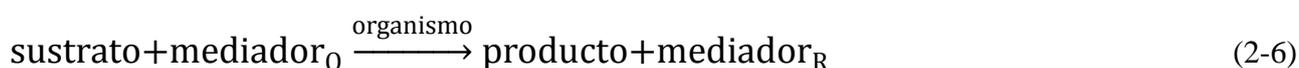
En la actualidad, también se han desarrollado procesos de productos microbianos para generar combustible a partir de los residuos, como la producción masiva de metano generada por los desechos de alimentos (Kim y col., 2002b).

Otro ejemplo es el de Maness y Weaver, que lograron la reacción de desplazamiento agua-gas produciendo  $H_2$  y  $CO_2$  a partir de  $CO$  y  $H_2O_2$  usando bacterias fotosintéticas *Rhodocyclus gelatinosus* y *Rhodospirillum rubrum*.



### 2.8.2 Celda microbiana de combustible TEM difusa

Los organismos vivos utilizan las membranas internas y externas como un control eficaz de sus procesos redox del metabolismo, que sirve tanto para apoyar y proporcionar un ambiente adecuado para la realización de las reacciones de las enzimas como para regular el movimiento de electrones y químicos alrededor de las células. Sin una cuidadosa regulación de la transferencia de electrones y reacciones dentro de la célula daría lugar a un potencial intracelular uniforme, con lo cual el metabolismo se detendría. Desafortunadamente para los propósitos de los investigadores que tratan de producir una celda de biocombustible, estas regulaciones muy a menudo hacen difícil “fugar” electrones de la célula al electrodo. Las celdas TEM utilizando células completas que se basan en la reducción (oxidación) de mediadores dentro de la célula o en la superficie celular (reacción química 2-6) seguida de su oxidación (reducción) en el ánodo (cátodo) (reacción química 2-7).



Las propiedades deseables para un mediador son: Un potencial lo suficientemente diferente del potencial del organismo para facilitar la transferencia de electrones mientras mantiene un alto potencial electroquímico en la celda, un alto coeficiente de difusión en el electrolito y (posiblemente) a través de la membrana celular, rápida transferencia de electrones entre el organismo y el electrodo, capacidad para repetidos ciclos redox, no citotoxicidad y buenos perfiles de absorción-adsorción-resorción al organismo, electrodo y otras superficies de la celda, de forma que permanezca en la solución y se mantenga disponible para el proceso (Bullen y col., 2006).

### 2.8.3 Celda microbiana de combustible TEM no difusa

La transferencia directa de electrones en un sistema de celda microbiano de combustible es ejecutada por un cultivo de microorganismos en la superficie del electrodo, combinado ya sea una superficie modificada para aceptar electrones desde la célula a través de la incorporación de un mediador o un sistema de iones metálicos (TEM no difuso), o un organismo con transferencia de electrones natural

(o a través de la modificación genética) incorporada dentro de la membrana celular (TDE). En la Figura 2.7 se muestra un sistema de transferencia mediada de electrones (TEM), en este caso entre *E. coli* y rojo neutro (mediador) con un electrodo de carbón modificado (Park y col., 2000). La Figura 2.8 muestra la forma natural en que los citocromos en la membrana externa de algunos organismos pueden permitir la transferencia directa de electrones (TDE) a un electrodo no modificado, en este caso con *S. putrefaciens* (Kim y col., 1999).

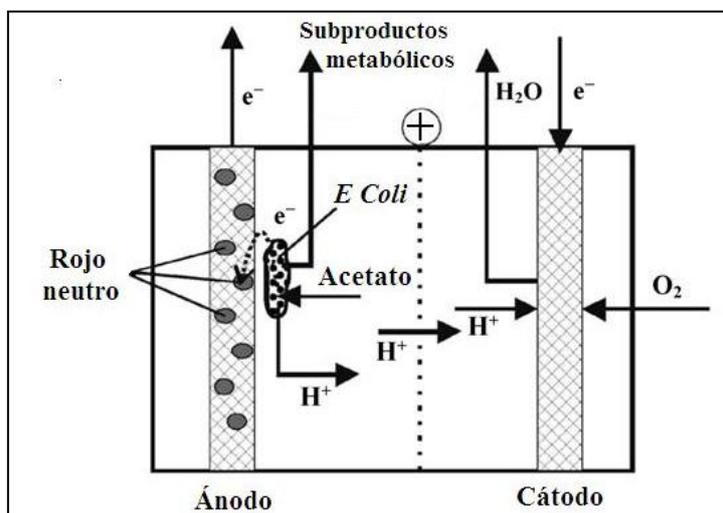


Figura 2.7 Sistema TDE (Bullen y col., 2006)

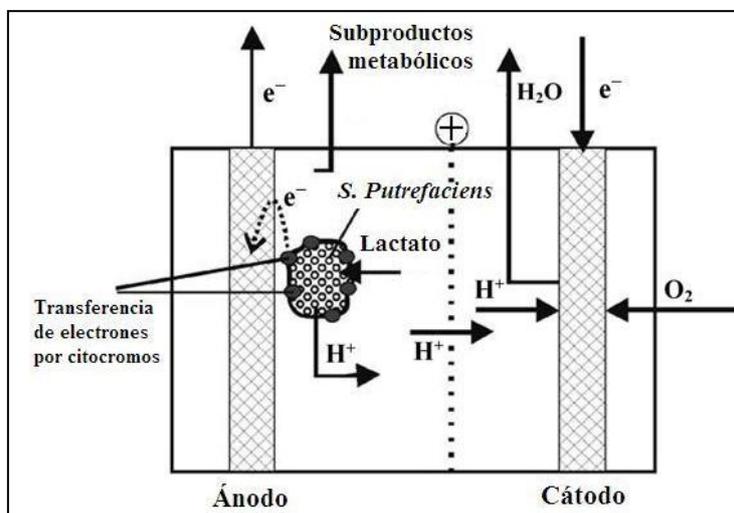


Figura 2.8 Sistema TEM (Bullen y col., 2006)

#### 2.8.4 Celda fotoquímica de combustible

Este tipo de celdas tienen mucho en común con otras celdas microbianas de combustible, difiriendo sólo en que la energía convertida en electricidad proviene originalmente de una fuente de luz en

lugar de un sustrato, y con el requisito adicional de que cualquier mediador usado en este sistema debe ser estable en presencia de luz. Se pueden considerar dos modos de operación:

- a) En primer lugar, la energía puede ser producida y almacenada por las células durante la iluminación y posteriormente liberarla y procesarla como con una celda de biocombustible no fotosintética
- b) En segundo lugar, la energía puede ser extraída por un mediador que transporta los electrones durante la iluminación

Existe poco avance en el desarrollo de estos sistemas, los trabajos más importantes pertenecen a: Seon y col. (1993), Yagishita y col. (1999) y Tsujimura y col. (2001).

Tsujimura y col. (2001) produjeron una celda fotoquímica de combustible sin usar combustible especial, en el que la reacción fotosintética anódica es la oxidación del agua para producir oxígeno diatómico y protones. Ésto se logró usando *Synechococcus* y 2,6-dimetil-1,4-benzoquinona (DMBQ) o diaminodurena (DAD) como mediador en el compartimiento del ánodo. En el compartimiento del cátodo se utilizó BOx (bilirrubina oxidasa) como biocatalizador con ABTS<sup>-2</sup> (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como mediador. La potencia máxima obtenida de la celda fue de 0.13 mW (29  $\mu\text{W cm}^{-2}$ , área proyectada de superficie) a un potencial de 0.26 V con una resistencia externa de 500  $\Omega$ . La eficiencia en la conversión de energía de la luz se calculó en un 1.9%. En la Figura 2.9 se muestra una celda fotoquímica de combustible (Tsujimura y col., 2001b) que emplea una cianobacteria fotosintética en el compartimiento del ánodo, usando la luz incidente para oxidar el agua a O<sub>2</sub> y los iones H<sup>+</sup>, y para reducir DMBQ (molécula mediador). El DMBQ es oxidado nuevamente en el ánodo como una reacción directa de electrodo. En el compartimiento catódico, el O<sub>2</sub> se reduce de nuevo a agua por la bilirrubina oxidasa mediada por ABTS, completando una reacción cíclica.

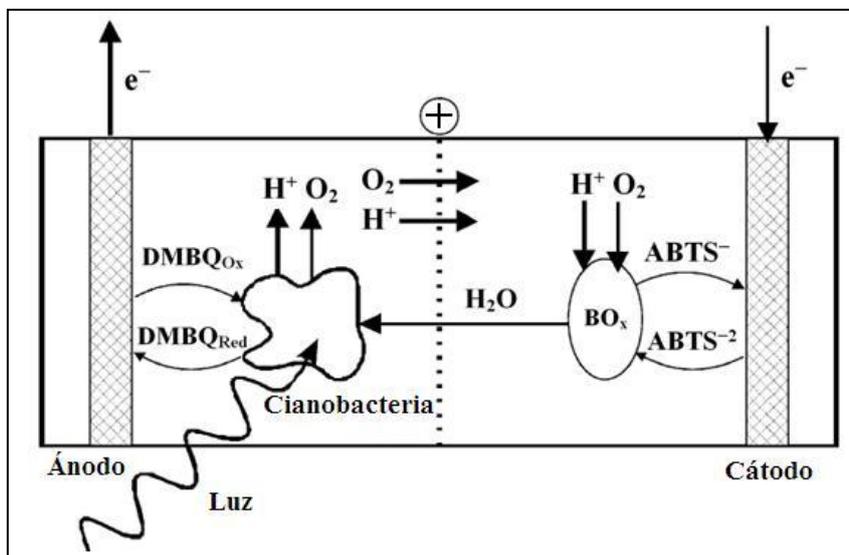


Figura 2.9 Celda fotoquímica de combustible (Bullen y col., 2006)