



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

# Diseño de una Celda de Combustible Microbiológica con Uso de Bacterias Oxidantes de Azufre y Hierro

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

**IGOR MARCOS SAAVEDRA SALAS**

PROFESOR GUÍA:  
TOMÁS VARGAS VALERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
BLANCA ESCOBAR MIGUEL  
FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE  
MARZO 2012

RESUMEN DE LA MEMORIA  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: IGOR SAAVEDRA SALAS  
PROF. GUÍA: TOMÁS VARGAS VALERO  
FECHA: 05/02/2012

## DISEÑO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIOLÓGICA CON USO DE BACTERIAS OXIDANTES DE AZUFRE Y HIERRO

La actual problemática energética-medioambiental motiva la búsqueda de nuevas fuentes de energía con menor impacto, así como el diseño de procesos industriales más eficientes en el uso de los recursos. Las celdas de combustible microbiológicas (denominadas biopilas o biobaterías al ser operadas en forma discontinua) son una tecnología capaz de producir electricidad basada en fenómenos bioelectroquímicos, utilizan microorganismos vivos para catalizar reacciones de óxido-reducción logrando la generación de una fuerza electromotriz aprovechable. Mediante este elemento biológico amplían el concepto de combustible a una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo materias residuales del sistema productivo, que pueden llegar a ser usados como fuentes de energía.

Las celdas de combustible microbiológicas diseñadas para producir electricidad oxidando materia orgánica residual son el principal sistema en estudio hasta hoy. No obstante, muchas alternativas restan por explorar, una de ellas y sobre la cual trata este trabajo, consiste en la generación de electricidad a partir de la energía libre de la oxidación de azufre elemental y sulfuros metálicos, con uso de bacterias oxidantes de azufre y hierro. Esta alternativa invita a pensar especialmente en el diseño de nuevos procesos para la minería, capaces de contribuir a la solución de su demanda energética, tales como *biolixiviación anóxica de sulfuros metálicos electrogeneradora*, o *generación de bioelectricidad con material de botaderos o relaves ricos en compuestos inorgánicos reducidos de azufre*.

El diseño propuesto fue estudiado experimentalmente acotándolo a un sistema de azufre elemental como combustible y bacterias de la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* como elemento biocatalizador. Una celda a escala de laboratorio fue construida para dicho propósito, operada en forma discontinua (biopila), de doble cámara anóxica-aeróbica de 135 mL y 35 mL vol. vacío respectivamente, con discos de grafito de 1,6 cm de diámetro como electrodos, y una membrana de intercambio de cationes Nafion como separador, área transversal de 2 cm de diámetro. La celda se operó durante 526 h a 25 °C manteniéndose con una carga (resistencia externa) en circuito cerrado de 1 k $\Omega$  entre mediciones. Una serie de voltametrías cíclicas fueron realizadas para caracterizar la evolución en el tiempo de los procesos redox de los electrodos de cada compartimento. Asimismo, se investigó también por voltametría cíclica, la formación y electroactividad de biofilms de *At. ferrooxidans* en cultivos aeróbicos con azufre elemental sobre electrodos de grafito de 3 mm de diámetro.

Los voltagramas arrojaron una serie característica de ondas redox ligadas a la formación de un biofilm, y sugieren propiedades catalizadores, probablemente de intermediarios de azufre solubles producidos por el metabolismo bacteriano en crecimiento con  $S^0$ . Asimismo, un proceso de aparente adaptación anodofílica (uso de electrodo como aceptor terminal de electrones) se observa en el compartimento anódico. La obtención de las curvas de polarización y potencia de la celda permiten estimar el potencial desempeño de bioelectrogeneración. Así, se halló un valor de máxima potencia de  $\sim 9 \text{ Wm}^{-2}$  a una densidad de corriente de  $12,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , magnitudes más de 3 veces superiores a los valores máximos encontrados en sistemas de sustrato orgánico. Las curvas obtenidas presentan un acentuado fenómeno de histéresis que cuestionan la escalabilidad de este desempeño. La eficiencia energética, respecto del cambio de energía libre de Gibbs de la oxidación de  $S^0$  con  $O_2$ , en la operación continua al punto de máxima potencia se estima  $< 15 \%$  con un rendimiento del combustible  $< 0,64 \text{ kWh/kgS}^0$ , siendo el máximo teórico  $4,31 \text{ kWh/kgS}^0$ . Dado un valor referencial de  $10 \text{ USD/tonS}^0$ , este tipo de energía resulta de relativo bajo costo alcanzando  $15,6 \text{ ¢USD/kWh}$  para el desempeño registrado.

## Agradecimientos

Especial agradecimiento y reconocimiento a Emma Fonseca por toda su ayuda y colaboración en el trabajo experimental realizado, su espíritu de trabajo y esencial curiosidad. Asimismo a los funcionarios y compañeros con quienes pude compartir durante mi cómoda estadía en el Laboratorio de Biohidrometalurgia.

Doy gracias a mis profesores tanto de la Comisión como todos aquellos de los cuales escuché y aprendí a lo largo de mi vida, desde la educación preescolar hasta el día de hoy. La Educación es la tarea más fundamental e interminable del ser humano, que no sea reducida a mera Capacitación, que si bien útil, no alcanza para esclarecer el sentido de nuestro quehacer en este Mundo (o cualquier otro que exista).

Agradezco, y nunca dejaré de agradecer, a la Vida por darme el tiempo para pensar y escribir esta Memoria. A veces parece mezquina, breve y llena de tribulaciones; otras parece rebosante, insondable de misterios y dichosa en las cosas más sencillas.

Qué ojalá las ideas de este trabajo sirvan de algo para quienes arriben y pervivan aquí. Tal vez para innovadores de los procesos mineros, al sugerir el desarrollo de una tecnología capaz de generar electricidad usando minerales sulfurados como combustible, minerales que tan afanosamente se extraen desde el fondo de la Tierra para llegar hoy, en su mayor cuantía, sin valor alguno a tranques de relaves y botaderos.

No puedo dejar de dar las gracias a quienes no han tenido relación directa con este trabajo, pero han estado ahí conmigo, cerca o lejos físicamente, siempre próximos(as) a mi espíritu. Ellos(as) saben, y espero siempre poder hacerles saber, quiénes son.

Por último, mi más sincera gratitud a *Acidithiobacillus ferrooxidans* por su total entrega y disposición para los fines de esta Memoria. Sin ti nada de esto hubiese sido posible... o quizás te habría reemplazado por otra... sí, es cierto, lamento reconocerlo.

# Índice de Contenidos

I	Introducción .....	1
1.1	Energía y Bioelectricidad .....	1
1.2	Descripción del Proyecto .....	2
1.3	Objetivos, Alcances y Justificación .....	3
1.3.1	Objetivo General.....	3
1.3.2	Objetivos Específicos .....	3
1.3.3	Alcances y Justificación.....	4
II	Antecedentes Bibliográficos.....	5
2.1	Celdas de Combustibles Microbiológicas.....	5
2.1.1	Principio de una celda de combustible.....	5
2.1.2	Diseño de una celda de combustible microbiológica.....	6
2.1.3	Microorganismos con capacidad de respiración electródica .....	6
2.1.4	Materiales de construcción y condiciones de operación .....	7
2.1.5	Termodinámica de la generación de voltaje.....	9
2.1.6	Desempeño de una celda de combustible microbiológica.....	11
2.1.7	Modelo básico de una celda de combustible microbiológica .....	13
2.2	Bacterias Oxidantes del Azufre y Hierro .....	14
2.2.1	Diversidad .....	14
2.2.2	Metabolismo bacteriano.....	15
III	Trabajo Experimental.....	16
3.1	Materiales.....	16
3.1.1	Reactivos y cepa microbiana .....	16
3.1.2	Electrodos y celda electroquímica .....	16
3.1.3	Equipos .....	16
3.2	Metodología.....	16
3.2.1	Tratamiento del azufre elemental granular y en polvo.....	16
3.2.2	Cultivos microbiológicos .....	17
3.2.3	Preparación de electrodos de grafito .....	17
3.2.4	Construcción y operación de la celda prototipo.....	18
3.2.5	Mediciones voltamétricas y de pH .....	19
IX	Resultados y Discusión.....	20
4.1	Estudio de Electroactividad de Biofilms de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> sobre Electrodos de Grafito.....	20

4.1.1	Voltametrías serie A .....	21
4.1.2	Voltametrías serie B .....	24
4.1.3	Voltametrías serie C .....	26
4.1.4	Identificación de especies electroactivas .....	29
4.2	Operación de Celda Prototipo usando Azufre Elemental como combustible y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> como biocatalizador .....	30
4.2.1	Voltametrías serie anódica .....	30
4.2.2	Voltametrías serie catódica.....	35
4.2.3	Curvas de polarización y potencia .....	38
4.2.4	Evolución de potenciales y voltaje .....	41
4.2.5	Eficiencia energética y rendimiento .....	42
V	Conclusiones y Perspectiva .....	44
5.1	Conclusiones .....	44
5.2	Proyecciones .....	44
5.3	Recomendaciones .....	45
	Referencias Bibliográficas .....	47
	Apéndice A: Fotografías de la celda y electrodos .....	50

## Nomenclatura algebraica

$R$	constante universal de los gases
$T$	temperatura de la celda
$F$	constante de Faraday
$\Delta H_{comb}$	diferencia de entalpía de la reacción de combustión
$\Delta G_{comb}$	diferencia de energía libre de Gibbs de la reacción de combustión
$\Delta G_{comb}^0$	diferencia de energía libre de Gibbs de la reacción de combustión en condiciones estándar
$f_{em}$	fuerza electromotriz de la celda
$f_{em}^0$	fuerza electromotriz de la celda en condiciones estándar
$n_{fuel}$	número de electrones transferidos en la semireacción redox del combustible
$\Delta m_{fuel}$	cantidad de combustible añadido durante un tiempo de operación de la celda en operación discontinua
$\Delta c_{fuel}$	diferencia de concentración de combustible entre aquella del flujo de alimentación y salida en operación continua
$q$	flujo volumétrico de entrada y salida de la celda en operación continua
$E$	potencial del electrodo versus una referencia
$E^0$	potencial estándar del electrodo asociado a un par redox
$C_O$	concentración de la especie electroactiva en su estado oxidado
$C_R$	concentración de la especie electroactiva en su estado reducido
$E_{an}$	potencial del ánodo versus una referencia
$E_{cat}$	potencial del cátodo versus una referencia
$\eta_{an}$	sobrepotencial del ánodo
$\eta_{cat}$	sobrepotencial del cátodo
$R_{elec}$	resistencia del electrolito
$R_{int}$	resistencia interna de la celda
$R_{ext}$	resistencia externa del circuito (carga)
$I$	intensidad de corriente

$\Delta E_{celda}$	diferencia de potencial (voltaje) de la celda
$V_{MFC}$	volumen de la celda
$A_{electrodo}$	área del electrodo
$P$	potencia eléctrica de la celda
$P_{vol}$	densidad volumétrica de la potencia de la celda
$P_{sup}$	densidad superficial de la potencia de la celda

## Abreviaturas

CV	voltimetría cíclica ( <i>cyclic voltammetry</i> )
DMRB	bacterias reductoras desasimilatorias de metales ( <i>disimilatory metal reducing bacteria</i> )
MFC	celda de combustible microbiológica ( <i>microbial fuel cell</i> )
RISC	compuestos inorgánicos reducidos de azufre ( <i>reduced inorganic sulfur compounds</i> )

# I Introducción

---

## 1.1 Energía y Bioelectricidad

En Chile, el año 2008 se consumió 58,9 TWh de energía eléctrica, de la cual 45,4% fue generado por centrales térmicas de tecnología convencional (sin ciclo combinado) alimentadas con carbón, gas natural y diesel en su mayoría. En el año 2005, de un total de 52,6 TWh de energía eléctrica generada, un 50,6% correspondía a energía hidroeléctrica; al 2008, ésta pasó a representar sólo el 40,9% del total. El crecimiento anual aproximado del consumo desde 2005 al 2008 es de 5%. El principal consumidor de energía del país es el sector minero, adjudicándose 19,3 TWh al año 2008, seguido del sector industrial con 16,4 TWh. Ambos sectores presentan una tasa creciente de consumo significativamente superior al resto de los sectores comercial, residencial y agrícola (INE, 2009).

Las centrales térmicas alimentadas con combustibles fósiles, son uno de los principales responsables de la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Por otro lado, la actividad minera del país, es la principal responsable de la acumulación de sulfato y metales disueltos en la hidrósfera, particularmente en aguas continentales superficiales y subterráneas, ligado aquello a la generación de aguas ácidas de mina. La acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera se señala como causa del calentamiento global; las aguas ricas en sulfato y metales disueltos contaminan los acuíferos, al infiltrarlos desde tranques de relaves, así como las aguas costeras receptoras de aguas continentales. La relación entre estas ramas de la producción da cuenta de una matriz energética en absoluto no sustentable, donde la generación eléctrica y su crecimiento, demandado fuertemente por el sector minero, se produce a costa de intensificar el uso de combustibles fósiles, y donde el uso final de esta energía da lugar a intensificar la emisión de sulfato y metales disueltos.

Frente a la situación descrita, la pregunta por cómo el país desarrolla una matriz energética sustentable llama a explorar nuevas tecnologías de generación eléctrica, capaces idealmente de transformar los desechos del sistema de producción en combustibles con menor impacto para el medioambiente.

Entre una serie de tecnologías de energías renovables una alternativa menos conocida y explorada en nuestro país son las celdas de combustible, ingenios electroquímicos capaces de transformar en un etapa la energía química de los enlaces moleculares en energía eléctrica, pudiendo alcanzar una eficiencia energética mucho mayor que cualquier máquina de generación termoeléctrica. En la Fig. 1 se ilustra comparativamente las etapas de conversión de energía química en eléctrica (Boudghene y Traversa, 2002).

En el contexto actual de la creciente necesidad energética del país y transformación de la matriz de generación existente, la principal motivación de este trabajo es determinar las potencialidades de una tecnología de generación eléctrica alternativa, en el marco de las tecnologías de bioelectricidad con celdas de combustible microbiológicas. Esta alternativa poco conocida entre las más nombradas fuentes de energía renovables no convencionales (ERNC) como energía solar, eólica y biomasa (biodiesel o bioetanol) - y al parecer aún no estudiada

dentro del país-, podría permitir el uso de especies químicas consideradas residuales como fuentes de energía limpia.

Hasta hoy principalmente se han investigado configuraciones de celdas de combustibles microbiológicas que utilizan sustratos orgánicos como fuente de energía (combustible) (Du et al., 2007; Franks y Nevin, 2010; Pant et al., 2010). El presente trabajo propone una configuración novedosa usando sustratos inorgánicos, básicamente compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC en inglés). De esta manera se abre la posibilidad de usar material de botadores o tranques de relaves de la minería como combustible, en la medida que contengan un gran porcentaje de RISCs, además de la propia mena de sulfuro mediante una biolixiviación en celda de combustible microbiológica.

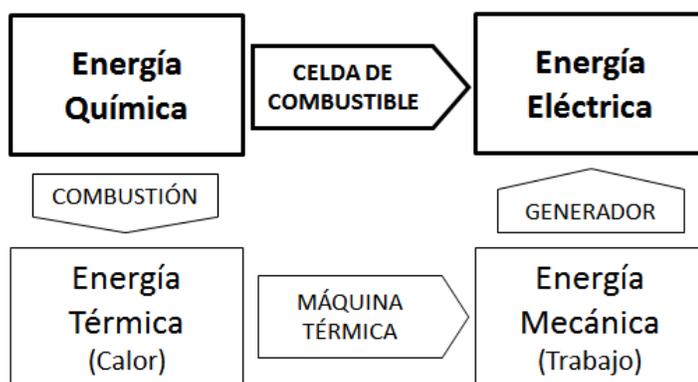


Fig. 1. Transformaciones de la energía química a energía eléctrica mediante una operación termoeléctrica versus electroquímica.

## 1.2 Descripción del Proyecto

El trabajo consiste en el diseño, construcción y estudio de una celda de combustible microbiológica con sustrato inorgánico a escala de laboratorio, que utiliza bacterias oxidantes de azufre y hierro para catalizar la oxidación de un sulfuro metálico y/o azufre elemental, y la reducción de oxígeno disuelto y/o ion férrico, a fin de generar especies electroactivas aprovechables en dicho dispositivo electroquímico capaz de generar electricidad.

Una etapa previa al trabajo de construcción y operación de la celda prototipo se ocupa del estudio de biofilms de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre electrodos de grafito. La razón de ésta es comprender qué tipo de interacción puede desarrollar la bacteria, oxidante de azufre y hierro, con el electrodo de grafito durante su posterior utilización en la celda prototipo.

En la Fig. 2 se representa el funcionamiento de la celda a desarrollar. Se trata de un sistema de doble cámara conectadas por una membrana conductora selectiva de cationes, y electrodos de grafito masivo. El compartimento anódico se mantiene en condición anóxica mediante el burbujeo de  $N_2$ ; el compartimento catódico, en cambio, abierto a la difusión de  $O_2$  desde el aire.

El metabolismo bacteriano en condiciones anóxicas genera  $SO_4^{2-}$  y  $M^+$  (metal disuelto en forma iónica) a partir de un sulfuro metálico, usando como aceptor terminal de electrones el ánodo de la celda, ya sea mediante un posible mecanismo de transferencia directa (anodofilia) o indirecta a través de un mediador. Por ejemplo, si el sulfuro contiene hierro, tal como pirita o calcopirita,

el ion de Fe puede actuar como dicho mediador. En este caso, el ion  $Fe^{3+}$  actúa como aceptor terminal de electrones siendo reducido por la bacteria a  $Fe^{2+}$ , el cual se oxida en el ánodo de la celda, transfiriendo electrones que dan lugar a una corriente eléctrica. Eventualmente compuestos intermediarios de azufre en forma iónica podrían también actuar como mediadores redox.

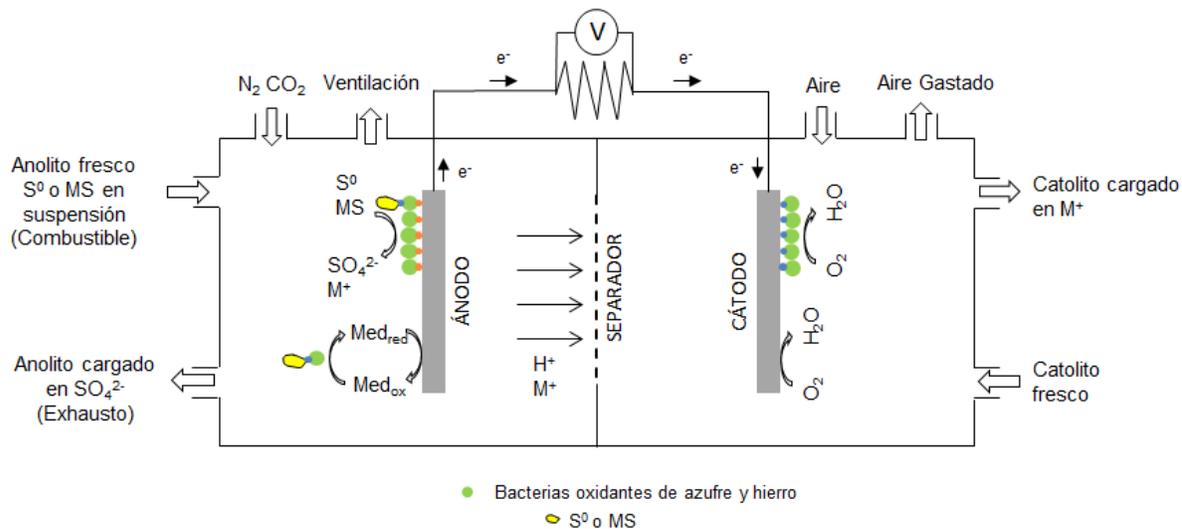


Fig. 2. Esquema del funcionamiento de la celda de combustible propuesta. Azufre elemental o sulfuro metálico son la fuente de electrones; el poder oxidante proviene del oxígeno que difunde desde el aire. Se postula que los electrones del compuesto inorgánico reducido de azufre pueden alcanzar el ánodo gracias a un mediador o desde la bacteria adherida al electrodo mediante un mecanismo de transferencia directa.

Inicialmente se concibieron distintas configuraciones de celdas de combustible microbológicas, hasta decantar las ideas recién descritas considerando la dificultad y tiempo demandado para la implementación de dichas configuraciones.

### 1.3 Objetivos, Alcances y Justificación

#### 1.3.1 Objetivo General

- Diseñar y construir la celda de combustible microbológica descrita a fin de probar la viabilidad de la generación de bioelectricidad con este dispositivo.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Estudiar los procesos bioelectroquímicos que posibiliten la generación de electricidad en la celda de combustible microbológica, especialmente la formación de biofilms electroactivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bacteria oxidante de azufre y hierro, sobre los electrodos de grafito.
- Caracterizar el desempeño de la celda, por método electroquímicos, en términos de densidad de corriente, voltaje y potencia eléctrica generada variando la composición de los electrolitos, temperatura de operación y/u otros parámetros.
- Evaluar la generación de bioelectricidad con la celda descrita utilizando azufre elemental o un sulfuro metálico como combustible, en términos de la eficiencia energética, rendimiento del combustible y potencial costo de la energía.

- Discutir la aplicabilidad tecnológica de la operación en su proyección a procesos industriales, especialmente de la minería de sulfuros.

### 1.3.3 Alcances y Justificación

La principal limitación del trabajo tiene relación con la escala definitiva de la celda a construir, en el sentido que es sabido que la potencia de estos sistemas puede ser muy pequeña, y así se dificulta la medición de las variables eléctricas, y por ende la correcta evaluación de su desempeño. (Logan et al., 2006)

En cuanto a la construcción misma del dispositivo, no se espera limitaciones en la disponibilidad de materiales, considerando que se describen en la literatura modelos básicos que no requieren más elementos de lo común en un laboratorio químico (p.ej. uso de vasos de precipitados como compartimentos electroquímicos). Igualmente, el Laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad dispone de cultivos puros y mixtos de bacterias oxidantes del azufre y hierro (p. ej. *Acidithiobacillus ferrooxidans*) que pueden ser utilizados en la experiencia. Este laboratorio también dispone de una cantidad suficiente - para los requerimientos del trabajo - de *Nafion*, membrana polimérica conductora.

En la literatura revisada, relacionada con celdas de combustible microbiológicas, no se encuentran sistemas que presenten este tipo de configuración. Sí hay experiencias que utilizan bacterias oxidantes del hierro para regenerar iones  $Fe^{3+}$  que actúan como mediadores de la reducción de oxígeno disuelto en el compartimento aeróbico, lo cual mejora la cinética de la reacción catódica (ter Heijne et al. 2006; 2007).

En un ámbito más general, se halló algunas publicaciones que proponen una operación de (bio)lixiviación electrogeneradora (BEGE) que se basan también en la idea de aprovechar la energía libre de la oxidación de sulfuros para generar electricidad (Xiao et al. 2007; 2008). No obstante, tal sistema difiere significativamente de la configuración propuesta en este trabajo, pues no se usan electrodos de grafito ni se intenta adaptar la bacteria a una condición anodofílica (uso de ánodo como aceptor de electrones) que permita generar corriente no sólo de la oxidación del sulfuro, en aquel caso usado como ánodo, sino también de la oxidación del azufre elemental, que para el sistema mencionado sólo actúa como un barrera aislante que detiene la oxidación del ánodo de sulfuro metálico.

## II Antecedentes Bibliográficos

---

### 2.1 Celdas de Combustibles Microbiológicas

#### 2.1.1 Principio de una celda de combustible

El principio de la tecnología de celdas de combustible es tan antiguo como el desarrollo de la electroquímica misma, desde las primeras observaciones de Alessandro Volta (1745 – 1827) en el fenómeno, hasta el desarrollo más moderno de transbordadores espaciales de la NASA, cuyos sistemas eléctricos a bordo consumen electricidad generada con celdas de combustible de hidrógeno.

Por convención, se denomina celda de combustible a una celda electroquímica cuya finalidad es la generación de electricidad a razón de la alimentación de combustible. En otros casos, cuando no hay alimentación continua, sino que el consumo de una especie electroactiva acumulada, se habla de pilas (baterías, para un arreglo en serio o paralelo) primarias o secundarias (recargables). La celda de combustible consiste básicamente en un sistema de dos electrodos que entran en contacto mediante conducción iónica, en un electrolito, y eléctrica. El combustible de la celda es alimentando al compartimento anódico, oxidándose (catalíticamente) sobre la superficie anódica y transfiriendo electrones al ánodo. Los electrones se mueven hacia el cátodo debido a una diferencia de potencial. Sobre la superficie catódica son transferidos al comburente reduciéndolo (catalíticamente). El desplazamiento de los electrones por el circuito externo genera una corriente eléctrica que puede ser aprovechada.

De acuerdo al tipo de combustible (dador de electrones), comburente (aceptor de electrones) y electrolito se clasifican las celdas de combustible en distintos tipos. Entre estos, la tecnología PEM (Polymer Electrolyte Membrane) Hydrogen Fuel Cell es probablemente la más avanzada en su desarrollo. Esta celda consume  $H_2$  y  $O_2$  gaseoso como combustible y comburente respectivamente. El  $H_2$  es la fuente de electrones que al oxidarse sobre la superficie anódica libera protones, los cuales migran a través de una membrana selectiva hasta alcanzar la superficie catódica, donde reaccionan con el oxígeno y los electrones provenientes del ánodo, dando lugar a la generación de electricidad y vapor de agua como productos finales. Al día de hoy, existen ya automóviles, buses e inclusive un prototipo de aeroplano cuyos motores eléctricos se alimenta con electricidad de una celda de este tipo (US DoE, 2009).

El uso de microorganismos o enzimas para catalizar alguna de las reacciones en una celda de combustible da origen, según sea el caso, a la denominación de celda de combustible microbiológica o enzimática. La introducción de estos elementos permite utilizar nuevos tipos de combustibles y/o comburentes, lo cual abre la posibilidad de explorar diseños de celdas que aprovechen especies consideradas residuales para generar electricidad.

Dentro de esta última línea de investigación, el uso de materia orgánica residual es una alternativa tecnológica que presenta mayor grado de avance, siendo una celda piloto de  $1\text{ m}^3$  de volumen de reacción, construido en la Universidad de Queensland, Australia, el exponente de mayor capacidad (Keller y Rabaey, 2008). La idea básica es usar microorganismos en condiciones anaeróbicas capaces de oxidar la materia orgánica y transferir, directa o indirectamente, los electrones de la oxidación al ánodo. En la mayoría de los casos, los electrones que llegan al cátodo se combinan con protones que difunden del compartimento

anódico, a través de una membrana conductora selectiva (PEM), y oxígeno disuelto, resultando agua como producto final (Logan et al., 2006).

Desarrollos de celdas de combustibles microbiológicas (MFC por sus siglas en inglés) alimentadas con materia inorgánica no han sido hallados con la misma ocurrencia que la alternativa orgánica. Algunos diseños hacen uso de bacterias sulfato reductoras alimentadas con sulfato, para producir ácido sulfhídrico como combustible de la celda (Dutta et al., 2008) (Rabaey et al., 2006); otros utilizan iones metálicos para mejorar la cinética de la reacción catódica, al actuar como mediadores de la reducción del oxígeno disuelto. (Oh et al., 2004). Una revisión más detallada de este tipo de celdas se realiza más adelante.

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en todo el mundo sobre la producción de bioelectricidad con una gama de productos de fermentación y residuo orgánicos (Logan y Regan, 2006b). Los estudios de MFC se han centrado en la adherencia y crecimiento del biofilm de bacterias con respiración anódica y los medios de transferir electrones a la superficie del ánodo.

### **2.1.2 Diseño de una celda de combustible microbiológica**

Se ha propuesto una variedad de diseños escalables para la construcción de una MFC. En la mayoría de los estudios, la configuración comúnmente adoptada fue la tradicional doble cámara (en forma de H), en la que dos vasos (cámaras o compartimentos) están conectadas por medio de un tubo que contiene una membrana selectiva (Logan et al., 2006). Inicialmente, los reactores utilizaban un puente salino (Min et al., 2005) como el canal de intercambio de iones entre el ánodo y el cátodo de la cámara, pero este fue remplazado posteriormente por membranas de intercambio de protones. Muchas de las modificaciones de los modelos existentes se han llevado a cabo recientemente para aumentar las densidades de potencia, y para mantener una producción de corriente constante. Algunos de los mejores diseños conocidos incluyen un flujo ascendente de tipo tubular (Rabaey et al., 2005), un diseño de placa plana (Min y Logan, 2004), un apilado de MFCs (Aelterman et al., 2006) y un tubo en U (Zuo et al., 2008). Un tipo de MFC de sedimentos, que utiliza el sedimento y el agua sobrenadante como el anolito y el catolito, respectivamente, ha registrado densidades de potencia de 55 mW/m<sup>2</sup> en sedimentos marinos (Scott et al., 2008).

### **2.1.3 Microorganismos con capacidad de respiración electródica**

Se ha intentado identificar y aislar las bacterias que tienen la capacidad de transferir los electrones a un electrodo. Varios estudios indican que la actividad metabólica más similar a la transferencia de electrones en una MFC es la reducción desasimilatoria de metales (Bond et al., 2002; Chaudhuri y Lovley, 2003; Bretschger et al., 2007) En ausencia de oxígeno, las bacterias reductoras desasimilatorias de metal (DMRB por sus siglas en inglés) transfieren sus electrones a un metal como el hierro o el manganeso, que actúa como receptor terminal de electrones (Lovley, 1993). En una MFC, el hierro o el manganeso es sustituido por el ánodo, al cual las bacterias entregan electrones generados debido a la oxidación de compuestos orgánicos. Sin embargo, no todas las DMRBs son capaces de transferir electrones hacia el ánodo de un MFC (Miller y Oremland, 2008). Entre los tipos de reducción de metales posibles, la reducción de hierro es el proceso más cercano a lo que ocurre en una MFC, por lo tanto la investigación ha tratado de enriquecer los cultivos con actividad reductora desasimilatoria de hierro (Chaudhuri y Lovley, 2003; Holmes et al., 2004; Lovley, 2008).

Entre las especies de microorganismos por primera vez reportados con actividad reductiva del electrodo se encuentran *Clostridium*, *Geobacter*, *Aeromonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Desulfobulbus* y *Shewanella*, todos son capaces de reducción desasimilatoria de metales (especialmente del hierro) (Bretschger et al., 2007). Los electrones pueden ser transferidos al ánodo en cualquiera de las siguientes maneras: (i) transferencia directa por medio de estructuras bacterianas llamadas nanocables, (ii) transferencia indirecta, utilizando lanzaderas intermedias de electrones, la conducción a través de la matriz de exopolisacáridos (EPS) del biofilm, o una combinación de estos mecanismos (Logan y Regan, 2006a; Lovley, 2008; Rittmann, 2008). Un importante trabajo de investigación sobre *Shewanella putrefaciens* indicó que citocromos específicos en la membrana celular vuelven a la bacteria electroquímicamente activa cuando se cultiva en condiciones anaerobias (Kim et al., 2002). Estudios recientes han encontrado un predominio de *Gamma proteobacteria*, *Beta proteobacteria*, *Rhizobial*, y *Clostridia* en la superficie del ánodo de MFC con sustrato orgánico (Lovley, 2008). MFC de cultivos mixtos generan mayores densidades de potencia que cultivos puros, tal vez debido a las interacciones sinérgicas dentro de las comunidades en torno al ánodo, ligado a la participación de cepas actualmente desconocidas y sus respectivos mecanismos de transferencia de electrones (Jung y Regan, 2007).

#### **2.1.4 Materiales de construcción y condiciones de operación**

Los materiales del ánodo y el cátodo son seleccionados en base a varias propiedades, tales como: gran área superficial, estabilidad química, biocompatibilidad (ánodo), y buena conductividad. Como material del ánodo, el carbono es preferible a los metales como el cobre ya que este último es tóxico para las bacterias. Así, el carbón de fieltro, espuma de carbón y grafito granulado han demostrado ser muy eficaces. El cátodo es generalmente del mismo material que el ánodo, aunque se ha experimentado con varias combinaciones. En algunos ensayos se utilizan catalizadores de platino para aumentar la tasa de reducción de oxígeno disuelto en el compartimento catódico (Reimers et al., 2000). La membrana de intercambio iónico juega un papel importante no sólo por el propósito de transferir protones del compartimento anódico al catódico, sino también por la prevención de la introducción de oxígeno en la dirección inversa. Membranas utilizadas para este fin incluyen materiales como Nafion (Bond et al., 2002) o Ultrex (Rabaey et al., 2003).

La composición del catolito es importante porque los resultados experimentales han mostrado que algunos tienen ventajas sobre los demás. Por ejemplo, MFC con ferricianuro ha demostrado que producen 1,5 a 1,8 veces más densidad de potencia que los que utilizan aire con platino (Oh y Logan, 2005). A su vez, el permanganato de potasio ha producido 4,5 y 11,3 veces más densidad de energía que el ferricianuro y oxígeno respectivamente (You et al., 2006). Si bien de esta manera es posible aumentar la densidad de corriente significativamente, el uso de estos agentes oxidantes no es una alternativa viable para un desarrollo económico de la tecnología, puesto que su uso es mucho más costoso que  $O_2$ . Además, ni siquiera es posible su regeneración (reoxidación) usando  $O_2$  una vez agotado el poder oxidante.

Varios otros factores contribuyen a la extracción eficiente de la potencia máxima de un sistema de MFC. Estos incluyen la distancia entre los electrodos, la fuerza iónica y la temperatura (Liu et al., 2005). Un aumento de potencia de hasta un 85% se ha observado cuando la fuerza iónica (concentración de NaCl) es variada. Dado que las MFC son aplicables sobre todo en el

tratamiento de aguas residuales, el aumento de la concentración de sal de las aguas residuales es una estrategia inviable.

En la Tabla 1 se presenta una lista de los sustratos utilizados en celdas de combustible microbiológicas, así como las características de la celda en términos de volumen y/o área de electrodos y la intensidad de corriente en el punto de máxima potencia.

**Tabla 1. Diferentes sustratos usados en celdas de combustible microbiológicas (MFCs) y la máxima densidad de corriente producida. Fuente: Pant et al. (2010)**

Tipo de sustrato	Concentración	Fuente del inóculo	Tipo de MFC	Densidad de corriente (mA/cm <sup>2</sup> )
Acetato	1 g/L	Bacteria preaclimatada desde una MFC	Forma cúbica de una cámara con ánodo de cepillo de fibra de grafito (7170 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> volumen del cepillo)	0,8
Arabitol	1220 mg/L	Bacteria preaclimatada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,68
Azo colorante con glucosa	300 mg/L	Mezcla de lodo aeróbico y anaeróbico	Una cámara, cátodo al aire, ánodo de papel de carbono (36 cm <sup>2</sup> )	0,09
Carboximetil celulosa (CMC)	1 g/L	Cocultivo de <i>Clostridium cellulolyticum</i> y <i>G. sulfurreducens</i>	Doble cámara con discos de grafito como electrodos (16 cm <sup>2</sup> ) y catolito de ferricianuro	0,05
Partículas de celulosa	4 g/L	Cultivo puro de <i>Enterobacter cloacae</i>	Tubular en forma de U con ánodo de tela de carbón (1,13 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de fibras de carbón.	0,02
Rastrojos de maíz	1 g/L COD	Aguas residuales domésticas	Una cámara, sin membrana separadora, cátodo al aire, ánodo de papel carbón (7,1 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de tejido de carbón.	0,15
Cisteína	385 mg/L	Muestra de sedimento de 30 cm de profundidad	Doble cámara con electrodos de papel carbón (11,25 cm <sup>2</sup> )	0,0186
1,2-Dicloroetano	99 mg/L	Consorcio microbiano de una MFC enriquecida en acetato	Doble cámara con ánodo de disco de grafito (20 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de grafito granular	0,008
Etanol	10 mM	Lodo anaeróbico de una planta de aguas residuales	Doble cámara con electrodos de papel carbón (22,5 cm <sup>2</sup> )	0,025
Estiércol de granja	3 kg en agua (20% w/v)	Autocolonización en ambiente anaeróbico	Un reactor de estiércol con ánodo en el fondo, y cátodo sobre el sólido; electrodos de tela de carbón (256 cm <sup>2</sup> )	0,004
Furfural	6,8 mM	Bacteria preaclimatada desde un ánodo de una MFC con cátodo de ferricianuro	Una cámara con cátodo al aire, electrodos de papel carbón (7 cm <sup>2</sup> )	0,17
Galactitol	1220 mg/L	Bacteria preaclimatada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,78
Glucosa	6,7 mM	Cultivo bacteriano mixto mantenido en acetato de sodio por 1 año ( <i>Rhodococcus</i> y <i>Paracoccus</i> )	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,70
Ácido glucorónico	6,7 mM	Cultivo bacteriano mixto	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	1,18

Lactato	18 mM	Cultivo puro de <i>S. oneidensis</i> MR-1	Doble cámara con electrodos de fieltro de grafito (20 cm <sup>2</sup> )	0,005
Lixiviados de vertedero	6000 mg/L	Lixiviado y lodo	Doble cámara con electrodos de tela de velo de carbón (30 cm <sup>2</sup> )	0,0004
Macroalga, <i>Ulva lactuca</i>	2500 mg/L DQO	Overflow del clarificador primario de una planta de aguas residuales	Una cámara con cátodo al aire (25 mL), ánodo de cepillo de grafito y cátodo platinizado	0,25
Extracto de malta, levadura y glucosa	1%	Cultivo puro de <i>E. cloacae</i>	Doble cámara de puente salino, con mediadores añadidos y discos de grafito como electrodos (15 cm <sup>2</sup> )	0,067
Manitol	1220 mg/L	Bacteria preaclimatada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,58
Microalga, <i>Chlorella vulgaris</i>	2500 mg/L DQO	Overflow del clarificador primario de una planta de aguas residuales	Una cámara con cátodo al aire (25 mL), ánodo de cepillo de grafito y cátodo platinizado	0,20
Celulosa microcristalina	7,5 g/L	Microorganismos desde el rumen de una vaca	Doble cámara con discos de grafito como electrodos (84 cm <sup>2</sup> )	0,02
Ácido nitrilotriacético (NTA)	48,5 mg/L	Consortio oligotrófico enriquecido con agua de río	Doble cámara con electrodos de fieltro de grafito (24 cm <sup>2</sup> )	0,0005
Fenol	400 mg/L	Mezcla de lodo activado aeróbico y anaeróbico (1:1, v/v)	Doble cámara con electrodos de papel de carbón (25 cm <sup>2</sup> )	0,1
Propionato	0,53 mM	Lodo anaeróbico	Doble cámara con electrodos de papel carbón (22,5 cm <sup>2</sup> )	0,035
Ribitol	1220 mg/L	Bacteria preaclimatada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,73
Formiato sódico	20 mM	Fluido anaeróbico desde una planta de aguas residuales	Doble cámara con electrodos de fieltro de grafito (4,5 cm <sup>2</sup> )	0,22

### 2.1.5 Termodinámica de la generación de voltaje

La teoría electroquímica permite calcular la transformación de la energía libre de Gibbs de la oxidación de un sulfuro o azufre elemental con oxígeno, reacción de combustión, en energía eléctrica. A continuación se plantean las ecuaciones que dan cuenta de esta transformación de energía libre  $\Delta G_{comb}$  en una diferencia de potencial aprovechable  $\Delta E_{celda}$  (ver *Nomenclatura algebraica*).

$$\Delta G_{comb} = \Delta G_{comb}^0 + RT \ln(\Pi) \quad \text{Ec. 1}$$

$$fem = - \frac{\Delta G_{comb}}{n_{fuel} F} \quad \text{Ec. 2}$$

$$fem^0 = - \frac{\Delta G_{comb}^0}{n_{fuel} F} \quad \text{Ec. 3}$$

$$fem = fem^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{1}{\Pi} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{C_O}{C_R} \right) \quad \text{Ec. 5}$$

$$fem = E_{an} - E_{cat} \quad \text{Ec. 6}$$

$$\Delta E_{celda} = fem - (\Sigma \eta_a + |\Sigma \eta_c| + IR_{elec}) \quad \text{Ec. 7}$$

En la Tabla 2 se listan algunas semireacciones que podrían ocurrir en el ánodo de la celda propuesta en este trabajo, considerando que el metabolismo bacteriano produce distintos intermediarios de azufre solubles a partir del azufre elemental insoluble (Suzuki, 1999; Hansford y Vargas, 2001).

**Tabla 2. Potenciales redox estándar de azufre en solución acuosa. Fuente: Zhdanov (1975)**

Semireacción	E° V vs NHE
$SO_4^{2-} + 8H^+ + 10e^- = H_2S_{(aq)} + 4H_2O$	0,304
$SO_4^{2-} + 8H^+ + 6e^- = S^0 + 4H_2O$	0,357
$SO_3^{2-} + 6H^+ + 4e^- = S^0 + 3H_2O$	0,449
$SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- = SO_3^{2-} + H_2O$	0,17
$S_2O_3^{2-} + 6H^+ + 4e^- = 2S^0 + 3H_2O$	0,465
$S_4O_6^{2-} + 12H^+ + 10e^- = 4S^0 + 6H_2O$	0,416
$S_4O_6^{2-} + 2e^- = 2S_2O_3^{2-}$	0,219; 0,08; -0,10

En la Tabla 3 se comparan semireacciones y potenciales teóricos de electrodo para condiciones típicas de MFCs de sustrato orgánico, versus la celda propuesta con sustrato inorgánico de azufre elemental.

**Tabla 3. Potencial redox estándar y teórico para reacciones y condiciones típicas de celdas de combustible microbiológicas a 25 °C de temperatura. Fuente: Logan (2008)**

Electrodo	Semireacción	E° V vs NHE	Condiciones	E V vs NHE
ánodo	$SO_4^{2-} + 8H^+ + 6e^- = S^0 + 4H_2O$	0,357	$[SO_4^{2-}] = 10\text{mM}$ pH=1,6	0,211
	$2HCO_3^- + 9H^+ + 8e^- = CH_3COO^- + 4H_2O$	0,187	$[HCO_3^-] = 5\text{mM}$ $[CH_3COO^-] = 5\text{mM}$ pH=7	-0,300
	$6CO_2 + 24H^+ + 24e^- = C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$	0,014	pH=7	-0,428
cátodo	$O_2 + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$	1,229	$pO_2 = 0,2$ pH=7	0,805
	$O_2 + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$	1,229	$pO_2 = 0,2$ pH=2,3	1,083
	$O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2$	0,695	$pO_2 = 0,2$ pH=7 $[H_2O_2] = 5\text{mM}$	0,370
	$Fe(CN)_6^{3-} + e^- = Fe(CN)_6^{4-}$	0,361	$[Fe(CN)_6^{3-}] = [Fe(CN)_6^{4-}]$	0,361
	$MnO_{2(s)} + 4H^+ + 2e^- = Mn^{2+} + 2H_2O$	1,229	$[Mn^{2+}] = 5\text{mM}$ pH=7	0,470
	$Fe^{3+} + e^- = Fe^{2+}$	0,77	$[Fe^{3+}] = [Fe^{2+}]$ pH ácido	0,77

### 2.1.6 Desempeño de una celda de combustible microbiológica

A continuación se presentan las principales variables de desempeño de la operación de una celda de combustible microbiológica y su expresión matemática, ya se trate de un sistema continuo, celda de combustible por definición, o discontinuo, pila (batería) *batch* o *fed-batch* (ver *Nomenclatura algebraica*).

#### **Potencia**

$$P = \Delta E_{celda} I \quad \text{Ec. 8}$$

$$P = \frac{\Delta E_{celda}^2}{R_{ext}} \quad \text{Ec. 9}$$

#### **Densidad de potencia**

$$P_{sup} = \frac{\Delta E_{celda}^2}{A_{electrodo} R_{ext}} \quad \text{Ec. 10}$$

$$P_{vol} = \frac{\Delta E_{celda}^2}{V_{MFC} R_{ext}} \quad \text{Ec. 11}$$

#### **Eficiencia coulombica**

En sistemas discontinuos

$$\epsilon_{Cb} = \frac{\int_0^{t_b} I dt}{n_{fuel} F \frac{\Delta m_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 12}$$

En sistemas continuos

$$\epsilon_{Cb} = \frac{I}{n_{fuel} F \frac{q \Delta c_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 13}$$

#### **Rendimiento de la biomasa**

En sistemas discontinuos

$$Y_{X/fuel} = \frac{X}{\Delta m_{fuel}} \quad \text{Ec. 14}$$

### **Rendimiento del combustible**

En sistemas discontinuos

$$Y_{W/fuel} = \frac{\int_0^{t_b} \Delta E_{celda} I dt}{\Delta m_{fuel}} \quad \text{Ec. 15}$$

En sistemas continuos

$$Y_{W/fuel} = \frac{\Delta E_{celda} I}{q \Delta c_{fuel}} = \epsilon_{Cb} \frac{n_{fuel} F}{PM_{fuel}} \Delta E_{celda} \quad \text{Ec. 16}$$

### **Eficiencia energética**

En sistemas discontinuos

$$\epsilon_H = \frac{\int_0^{t_b} \Delta E_{celda} I dt}{\Delta H_{comb} \frac{\Delta m_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 17}$$

$$\epsilon_G = \frac{\int_0^{t_b} \Delta E_{celda} I dt}{fem \cdot n_{fuel} F \frac{\Delta m_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 18}$$

En sistemas continuos

$$\epsilon_H = \frac{\Delta E_{celda} I}{\Delta H_{comb} \frac{q \Delta c_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 19}$$

$$\epsilon_G = \frac{\Delta E_{celda} I}{fem \cdot n_{fuel} F \frac{q \Delta c_{fuel}}{PM_{fuel}}} \quad \text{Ec. 20}$$

### **Relación de eficiencias**

En sistemas continuos

$$\epsilon_G = \frac{\Delta E_{celda}}{fem} \epsilon_{Cb} \quad \text{Ec. 21}$$

$$\epsilon_H = \frac{\Delta E_{celda}}{\Delta H_{comb}} n_{fuel} F \epsilon_{Cb} = \frac{-\Delta G_{comb}}{\Delta H_{comb}} \frac{\Delta E_{celda}}{fem} \epsilon_{Cb} = \left( \frac{-\Delta G}{\Delta H} \right)_{comb} \epsilon_G \quad \text{Ec. 22}$$

### 2.1.7 Modelo básico de una celda de combustible microbiológica

Experimentalmente se ha visto que la variación del voltaje en una celda de combustible microbiológica es relativamente lineal respecto de la intensidad de corriente, pudiéndose describir la relación de esta variable mediante una sencilla expresión matemática dada por la Ec. 23. Esta ecuación, respecto de la Ec. 7, implica que el valor de la fem y los sobrepotenciales débilmente dependientes de la intensidad de corriente, como aquellos ligados a la energía de activación de la reacción, son capturados por el término  $OCV_{exp}$ . En tanto, aquellos sobrepotenciales fuertemente dependientes de la intensidad de corriente y la resistencia óhmica de los electrolitos, membrana de intercambio de iones y conexiones eléctricas, quedan capturados por el término  $IR_{int}$ .

$$\Delta E_{celda} = OCV_{exp} - IR_{int} \quad \text{Ec. 23}$$

Por otro lado, imaginando que la celda en circuito cerrado funciona como una fem en serie con dos resistencias, una interna y otra externa, se plantea que:

$$OCV_{exp} = I(R_{int} + R_{ext}) \quad \text{Ec. 24}$$

Y dado que para efectos prácticos el voltaje aprovechable es aquel de la diferencia de potencial de los electrodos en circuito cerrado, vale decir, con una carga externa  $R_{ext}$  se tiene que:

$$\Delta E_{celda} = IR_{ext} \quad \text{Ec. 25}$$

entonces la potencia de la celda queda dada por:

$$P = \frac{OCV_{exp}^2 R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})^2} \quad \text{Ec. 26}$$

Al analizar la Ec. 26 se visualiza claramente que a menor resistencia interna del sistema y/o mayor voltaje de circuito abierto es posible obtener mayor potencia; y que dada una resistencia interna, si se opera con una carga (resistencia externa) de idéntico valor se obtendrá un desempeño en el punto de máxima potencia.

## 2.2 Bacterias Oxidantes del Azufre y Hierro

### 2.2.1 Diversidad

Los depósitos de minerales sulfurados con sus diferentes composiciones mineralógicas y diferentes ambientes climáticos representan hábitats microbiológicos extremadamente complejos. Probablemente sólo un pequeño número de bacterias oxidantes de azufre y hierro (Tabla 2) han sido aisladas y caracterizadas fisiológica y filogenéticamente. Estos acidófilos extremos crecen de manera óptima a pH < 3 y presentan distintas capacidades de adaptación a sustratos de azufre y temperatura.

El número limitado de bacterias que se han descubierto es consecuencia de los métodos selectivos por el cual las bacterias son enriquecidas y aisladas (Watling, 2006).

Tabla 4. Microorganismos acidófilos oxidantes de azufre y hierro. Fuente: Watling (2006).

Organismo	Sustrato de crecimiento reportado	Características
<i>Acidianus ambivalens</i>	S oxidación y reducción	Hipertermófilos
<i>Acidianus brierleyi</i>	Sulfidos	pH opt 1,5 – 2,5
<i>Acidianus infernus</i>	Pobre, si hay alguna, Fe oxidación	
" <i>Acidianus tengchongensis</i> "		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mixotrofia Fe oxidación y reducción, Sulfuros (pobre)	Termófilo moderado pH opt 2
<i>Acidiphilium spp</i>	Heterótrofos obligados	Mesófilos
<i>Acidiphilium SJH</i>	S oxidación Fe(III) reducción	pH opt ~ 2 – 3
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	Autótrofo facultativo S oxidación Fe(III) reducción	Mesófilo pH opt ~ 2 – 3
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Autótrofos	Mesófilos
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	S oxidación, sulfuros (Af, Fe(II) oxidación; Fe(III) reducción como anaerobio facultativo)	pH range 2 – 4
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Mixótrofo S oxidación, sulfuros	Termófilo moderado pH opt 2 – 2,5
<i>Acidolobus aceticus</i>	Heterótrofo	Hipertermófilo
<i>Alicyclobacillus spp</i>	S reducción to H <sub>2</sub> S S oxidación, sulfuros	pH opt 3,8 Mesófilos — termófilos moderados
" <i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i> "	(Ad, facultative autotroph.; At, mixótrofo, Fe(III) reducción)	pH 1,5 – 2,5
" <i>Alicyclobacillus tolerans</i> "		
" <i>Ferrimicrobium acidiphilium</i> "	Heterótrofo Fe(II) oxidación, sulfuros Fe(III) reducción	Mesófilo pH opt 1,7 – 1,8
<i>Ferroglobus placidus</i>	Fe oxidación	Termófilo pH neutral
" <i>Ferroplasma acidarmanus</i> "	Posible autótrofo	Termófilos moderados
" <i>Ferroplasma cypreacervatum</i> "	Fe oxidación	pH rango 1 – 2
<i>Ferroplasma acidophilum</i>	Pirita oxidación pobre	
<i>Ferroplasma MT17</i>		
<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i>	S, H oxidación para producir ácido sulfúrico	Termófilo pH opt 3 – 4
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Fe oxidación	Mesófilos, algunas cepas termotolerantes
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Pirita	pH rango 1,6 – 1,9
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe oxidación, pirita	Mesófilo, pH opt 1,5–1,7
<i>Metallosphaera sedula</i>	S oxidación	Termófilos
<i>Metallosphaera prunae</i>	Sulfuros	pH 1 – 4
" <i>Metallosphaera hakonensis</i> "		
<i>Sulfobacillus acidophilum</i>	Fe(II) y S oxidación; Fe(III) reducción, Sulfuros	Termófilos moderados
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	S y Fe(II) oxidación	pH 1 – 2,5

<i>Sulfolobus metallicus</i>	Quimiolitotótrofo estricto	Hipertermófilo
" <i>Sulfolobus rivotincti</i> "	S oxidación, sulfuros	Varios pHs en rango 1 – 4,5
<i>Sulfolobus shibatae</i>		
" <i>Sulfolobus tokodaii</i> "		
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>		
" <i>Sulfolobus</i> " JP2 y JP3		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Heterótrofos	Hipertermófilos
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	No S oxidación	pH 2 – 4,5
<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i>	S y Fe oxidación	Hypertermófilo
<i>Thiobacillus prosperus</i>	S y Fe oxidación, sulfuros	Mesófilo, halófilo, pH opt. 2
<i>Thiomonas cuprina</i>	S oxidación, sulfuros	Mesophile, pH opt. 3 – 4

## 2.2.2 Metabolismo bacteriano

### ***Acidithiobacillus ferrooxidans***

Se trata de una bacteria Gram negativa de la especie *Acidithiobacillus*, con forma de bastón. Cuenta con un flagelo polar que le da motilidad en medios líquidos. Se reproduce por fisión binaria y no forma esporas.

Esta bacteria es acidófila, (capaz de vivir en medio ácidos,  $1.4 \leq \text{pH} \leq 6.0$ ); mesófila (vive a temperaturas moderadas,  $20 \text{ }^\circ\text{C} \leq T^\circ \leq 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ); aerobia y anaerobia facultativa, en ambiente aerobio utiliza oxígeno como aceptor de electrones y en condiciones anaerobias utiliza ión férrico como aceptor; quimiolitótrofa, esta bacteria es capaz de oxidar ión ferroso y compuestos reducidos de azufre en soluciones de ácido sulfúrico en presencia de oxígeno. La energía que obtiene de la oxidación la usa para fijación de dióxido de carbono, crecimiento y mantenimiento celular. (Diaz, 2007)

## III Trabajo Experimental

---

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Reactivos y cepa microbiana

- Cepa bacteriana *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 (Lab. de Biohidrometalurgia, FCFM – U. de Chile)
- Medio basal estéril y no estéril ajustado a distintos valores de pH, composición: 0,4 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,056 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y 0,4 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) granular y pulverizado tratado
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado para ajustes de pH
- Agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

#### 3.1.2 Electroodos y celda electroquímica

- Grafito en barras de 3 mm de diámetro, composición 100% grafito (CAS# 7782-42-5) (Alfa Aesar, UK)
- Grafito cilíndrico masivo (Lab. de Biohidrometalurgia, FCFM – U. de Chile)
- Grafito granular (Aldrich)
- Resina epóxica de endurecimiento lento (Epoxy Sytem Epoxicure™, Buehler)
- Adhesivo epóxico de endurecimiento rápido (Araldite®, Huntsman International)
- Silicona acética
- Membrana de intercambio de cationes Nafion®
- Solución de KCl 3 M y Gel-Rite (Merck and Co., Inc.)
- Agua desionizada ( $\text{diH}_2\text{O}$ )
- Balones de gas licuado de  $\text{O}_2$  y  $\text{N}_2$  (Indura S.A.)

#### 3.1.3 Equipos

- Electroanalizador BAS100B (BASinc)
- Medidor de pH
- Multímetro
- Termostato

### 3.2 Metodología

#### 3.2.1 Tratamiento del azufre elemental granular y en polvo

El azufre elemental granular se obtiene a partir de azufre en polvo calentado ligeramente sobre 120 °C, punto de fusión del alótropo amorfo, al verterlo en fase líquida en un tanque con agua agitado. Según la velocidad de giro y tipo de hélice del rotor se puede lograr distintos tamaños de gránulos relativamente esféricos. En este trabajo se utilizó un tamaño de granulo (diámetro) de ~ 2 mm.

Al azufre granular y en polvo se aplica un tratamiento de calor para purificar el material y evitar que porten agentes bióticos que contaminen los cultivos. Este tratamiento consiste en 30 min de ebullición en medio basal pH 2,3 estéril a presión atmosférica, en matraces de 250 mL con 1 g de azufre cada uno, posterior enfriamiento a temperatura ambiente y reposo por una noche. Se

repite el tratamiento, luego se deja enfriar, y finalmente se descarta el medio, antes de utilizar inmediatamente el sustrato en el cultivo microbiológico, renovando con medio estéril y trabajando bajo llama de mechero.

### **3.2.2 Cultivos microbiológicos**

Los cultivos de *At. ferrooxidans* se efectuaron utilizando medio basal pH 2,3 estéril, en condiciones aeróbicas, con matraces de 250 mL que contienen 1 g de azufre elemental granular o en polvo, matraces preparados en la etapa de tratamiento del azufre. Inicialmente se vierten 97,5 mL de medio en el matraz. Se toma una alícuota de 2,5 mL de inóculo concentrado, obtenido por filtración estéril del medio de cultivo aeróbico de mantención de *At. ferrooxidans* con  $S^0$  como fuente de energía, y se vierte en el matraz ya con el medio, completándose así un volumen de 100 mL de cultivo total.

### **3.2.3 Preparación de electrodos de grafito**

#### ***Para estudio de electroactividad de biofilms***

Las barras de grafito de 3 mm de diámetro se cortan en trozos de ~1 cm de longitud, se enrollan en cable de cobre en varias vueltas, y se pintan con pintura a base de plata que permite asegurar el contacto eléctrico entre el grafito y el cable de cobre. La parte del cable que no está enrollada en el grafito permanece envuelta en un forro plástico aislante, excepto en la punta, donde se quita el aislante unos centímetros para permitir el contacto eléctrico con las conexiones del electroanalizador. El cable se protege con un capilar de vidrio, y la parte de grafito con cobre enrollado y pintado con plata se aísla usando la resina epóxica de endurecimiento lento, para ello, esta parte se deposita en un molde con resina líquida la cual endurece pasadas 24 h. La base de la cabeza de resina se pule para exponer una cara de grafito cuya área es conocida.

Los electrodos de grafito descritos se introducen en los matraces de cultivo, previo pulido, para permitir la formación de un biofilm de *At. ferrooxidans* durante un tiempo determinado.

Cuando se requiere depositar una capa de azufre elemental sobre el grafito, previa formación del biofilm, se utiliza un matraz con un tapón de goma hermético como ambiente cerrado. El electrodo se sostiene por su parte de vidrio al atravesarlo por el tapón de goma. Cierta cantidad de azufre elemental en el fondo del matraz se calienta, con una plancha calefactora, hasta lograr su ebullición y/o sublimación. Luego se permite enfriar durante unos minutos y el electrodo se extrae para ser analizado y/o introducido en los matraces de cultivo. Para evitar la combustión del azufre con  $O_2$  y formación de  $SO_2$ , se desplaza el aire del ambiente cerrado insuflando nitrógeno, a cierta presión que no produzca la expulsión del tapón, mediante una jeringa que atraviesa el tapón de goma. La salida de los gases se permite a través de una jeringa adicional que atraviesa el tapón.

#### ***Para construcción y operación de celda prototipo***

El cilindro de grafito masivo se corta en discos de ~ 2 mm de espesor. A partir de estos discos grandes de grafito se obtienen unos más pequeños de aproximadamente 1,6 cm de diámetro que presentan una pequeña aleta sobresaliente, donde se perfora un orificio de 1 mm de diámetro para enrollar un cable de cobre alrededor de la aleta. Ésta se pinta posteriormente con una pintura a base de plata para asegurar el contacto eléctrico. La parte del cable que no está enrollada en el grafito permanece envuelta en un forro plástico aislante, excepto en la punta,

donde se quita el aislante unos centímetros para permitir el contacto eléctrico con las conexiones del electroanalizador. El cable se protege con un capilar de vidrio formando un ángulo de 90° con el plano del disco, y la aleta de grafito con cobre enrollado y pintado con plata se aísla usando el adhesivo epóxico de endurecimiento rápido, para esto, se prepara una cantidad de adhesivo que se aplica alrededor del cobre enrollado para evitar el contacto del metal con el electrolito.

### 3.2.4 Construcción y operación de la celda prototipo

Usando una celda electroquímica para electrodo de disco rotatorio, de vidrio y enchaquetada, más un tubo plástico y una tapa de teflón se armó un sistema de celda de dos compartimentos, uno anódico y otro aeróbico de aprox. 135 mL y 35 mL respectivamente. En la Fig. 3 se aprecia un esquema del montaje (sección transversal), igualmente en el *Apéndice B* se hallan fotografías del dispositivo. La tapa de teflón fue perforada en una serie de orificios *ad-hoc* para permitir la entrada y salida de gases, a través de varas de vidrio conectadas a mangueras plásticas en el exterior, y el posicionamiento del ánodo y del electrodo de referencia cerca de éste. La posición del cátodo en el compartimento aeróbico se fijó usando adhesivo epóxico de rápido endurecimiento, este compartimento se mantuvo completamente expuesto a la atmosfera.

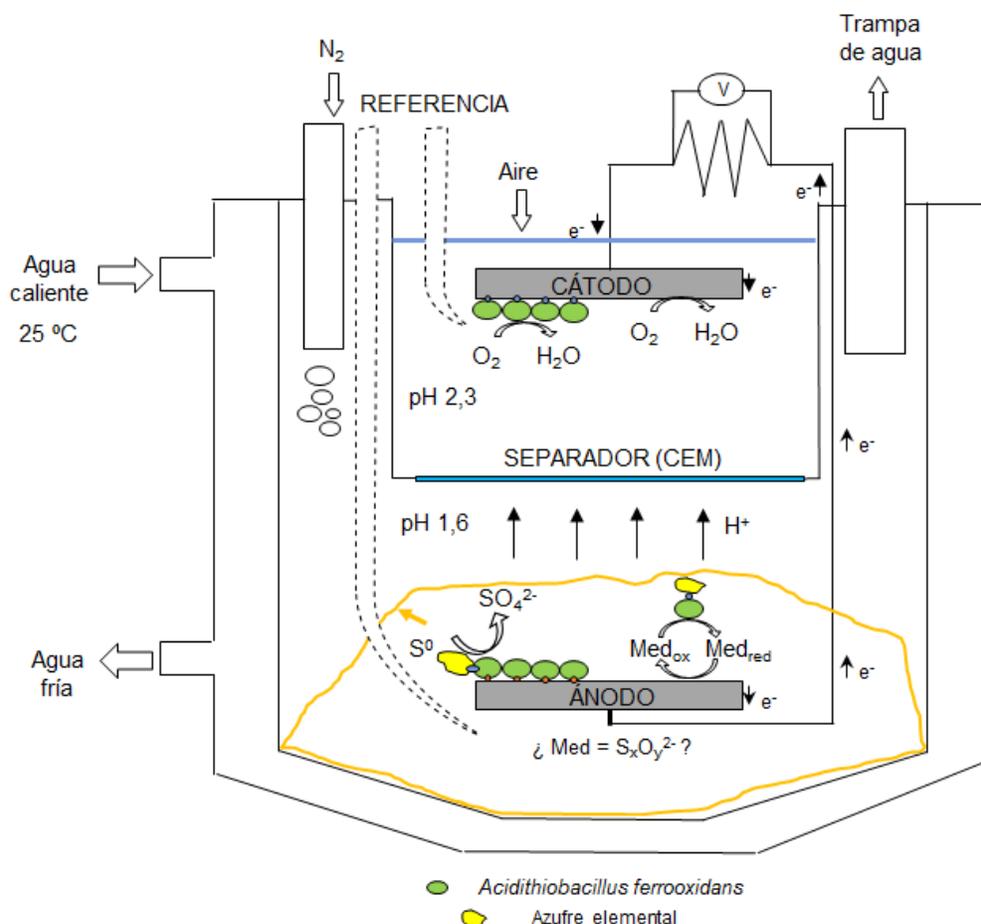


Fig. 3. Montaje de la celda prototipo operada con azufre elemental como combustible y *Acidithiobacillus ferrooxidans* como biocatalizador. El electrodo de referencia se ubica cerca del electrodo de trabajo según sea el caso.

Una vez armada la celda, la junta de la tapa y el vidrio se selló con silicona acética. Cabe señalar, que la membrana de intercambio de cationes que conecta ambos compartimentos fue emplazada en la tapa del tubo de plástico, recortada para dicho efecto, la cual actúa como base del compartimento aeróbico, y corresponde a un círculo de 2 cm de diámetro. Para evitar filtraciones de un compartimento a otro se selló la junta de la membrana al tubo plástico con adhesivo epóxico de rápido endurecimiento.

Al inicio de la operación se añadió ~1 g de azufre elemental en polvo proveniente de un cultivo aeróbico de *At. ferrooxidans*. Para lograrlo se suspendió el polvo en el medio de cultivo, y con una pipeta y propipeta se extrajo el polvo suspendido que se vierte junto con el medio en el compartimento anóxico. En el transcurso de la operación se añade más azufre elemental en polvo de la misma manera, hasta alcanzar un máximo de ~4 g de S<sup>0</sup> alimentado. Para evitar el rebalse del anolito se requirió en algunas ocasiones un cambio del mismo, descartando el sobrenadante y añadiendo nuevo medio proveniente de los cultivos aeróbicos. El detalle de la marcha experimental y los cambios realizados en los electrolitos se describe en la Sec. 4.2.

El compartimento aeróbico se mantuvo con MC estéril pH 2,3 como catolito, sin inocular bacterias hasta 220 h de operación. Como inóculo se utilizó una suspensión concentrada de bacterias obtenidas por centrifugación, durante 10 min a 10000 rpm, del sobrenadante de un medio de cultivo aeróbico de *At. ferrooxidans* creciendo con S<sup>0</sup>. De esta manera, se intenta evitar la contaminación del catolito con especies electroactivas solubles generados por el metabolismo bacteriano.

Entre mediciones voltamétricas la celda se mantuvo en circuito cerrado con una carga fija (resistencia externa) de 1 kΩ, y de manera regular se burbujeó N<sub>2</sub> en el compartimento anóxico, especialmente tras cada adición de azufre elemental.

### **3.2.5 Mediciones voltamétricas y de pH**

El pH de los electrolitos se mide tomando un alícuota de 1,5 mL que se deposita en un tubo de ensayo, donde se introduce el electrodo de pH y se lee un valor de estado cuasiestacionario.

#### ***Procedimiento en celda convencional***

Los biofilms de crecimiento controlado, usando los electrodos de grafito de área transversal de 3 mm de diámetro, se analizan en una celda convencional de 3 electrodos sin compartimentalización, utilizando como contraelectrodo un resorte de platino. El electrolito usado es medio basal estéril o de cultivo según el tipo de condición a estudiar.

#### ***Procedimiento en celda prototipo***

Al realizar voltametrías cíclicas de uno de los electrodos de la celda, el otro se utiliza como contraelectrodo y el electrodo de referencia se ubica cerca del electrodo de trabajo, de esta manera se configura un sistema de celda de 3 electrodos.

Las curvas de polarización de la celda se obtienen mediante voltametría cíclica a 1 mVs<sup>-1</sup>, conectando el ánodo a la conexión del electroanalizador correspondiente al contraelectrodo y electrodo de referencia a la vez, y el cátodo a la conexión del electrodo de trabajo. La configuración anterior recrea un sistema de celda de 2 electrodos.

## IX Resultados y Discusión

### 4.1 Estudio de Electroactividad de Biofilms de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre Electroodos de Grafito

Se realizaron tres series de mediciones voltamétricas con tres electrodos de grafito denominados A, B y C respectivamente, de una cara circular de 3 mm de diámetro construidos idénticamente (ver Sec. 3.2). De este modo se probó la reproducibilidad de los resultados, y se ensayó distintas condiciones para caracterizar la eventual formación de un biofilm electroactivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre la superficie de grafito.

Las condiciones evaluadas se definen principalmente en función de tres variables: (i) la exposición o no del grafito a bacterias del género en estudio, (ii) la presencia o ausencia de azufre elemental sobre la superficie de grafito, y (iii) la presencia o ausencia de bacterias en suspensión y sus productos metabólicos, en crecimiento aeróbico con azufre elemental como fuente de energía, en el electrolito. La simbología<sup>1</sup> usada en los gráficos para dar cuenta de estas y otras condiciones es la siguiente:

Simbología de los gráficos	
A o B	si el electrodo fue o no expuesto a bacterias capaces de formar un biofilm
G o S	si el electrodo se encuentra o no en contacto directo con azufre elemental, ya sea inmerso en polvo o que el azufre haya sido depositado mediante previa sublimación/ebullición
E o C	si el electrolito corresponde a medio basal estéril o de cultivo (contiene bacterias y sus productos)
-, -	pH del electrolito
-- h	tiempo de crecimiento del biofilm
-- h'	tiempo de cultivo del medio
-- min	tiempo de aplicación de ultrasonido al electrodo como medio de remoción del biofilm
-- g	gramos de azufre elemental sublimado/ebullido para lograr su posterior deposición sobre el electrodo de grafito
N	se mide burbujeando N <sub>2</sub>
O	se mide burbujeando O <sub>2</sub>
P	el electrodo ha sido pulido para eliminar el biofilm

Las mediciones efectuadas corresponden a voltametrías cíclicas dentro de los límites de estabilidad del agua, tomando los valores de 1 y -0,3 V vs Ag/AgCl para el límite superior de evolución de O<sub>2</sub> e inferior de evolución de H<sub>2</sub> respectivamente.

<sup>1</sup> A modo de aclaración, si en el gráfico se denota una serie de datos por BGF pH 2,3 100h 10h', esto

A medida que aumenta el tiempo de cultivo, el medio tiende a concentrar ciertas especies electroactivas. La presencia de especies electroactivas es un resultado esperado, habiéndose encontrado ya compuestos de azufre parcialmente oxidados tales como tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), sulfito ( $SO_3^{2-}$ ), piro-sulfito ( $S_2O_5^{2-}$ ), tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) y politionatos ( $S_nO_6^{2-}$ ). (Bhavaraju et al., 1993; Allegretti et al., 2006). Bhavaraju et al. (1993) encontraron que el medio de cultivo de *A. ferrooxidans* en crecimiento con  $S^0$  concentra  $S_2O_3^{2-}$  y trazas de  $SO_3^{2-}$ . Por otro lado, el mecanismo metabólico de la oxidación de  $S^0$  postulado por Quatrini et al. (2006) supone dos vías metabólicas paralelas, en donde a partir de  $S^0$  se genera  $SO_3^{2-}$  y  $S_2O_3^{2-}$ , y luego  $SO_4^{2-}$  y  $S_4O_6^{2-}$  respectivamente.

#### 4.1.1 Voltametrías serie A

Los resultados de la Fig. 4 indican, al contrario de lo anterior, la ausencia de especies electroactivas en el medio de cultivo, cuestión que se infiere al no encontrar diferencias entre las condiciones de electrodo abiótico en medio estéril y de cultivo. Si bien estos resultados contradicen lo esperado, es probable que dado un corto tiempo de cultivo (120 h') la concentración alcanzada de las especies electroactivas sea insuficiente para apreciar efectos medibles. Al observar las condiciones bióticas de electrodo, vale decir, con presumible formación de biofilm, se aprecia al menos tres picos de corriente alrededor de 0,48; 0,43 y 0,08 V vs Ag/AgCl cuyas densidades de corriente varían al cambiar el medio estéril por medio de cultivo. Aparece además un pico de corriente anódica único de la condición de electrodo biótico en medio estéril alrededor de 0,25 V vs Ag/AgCl.

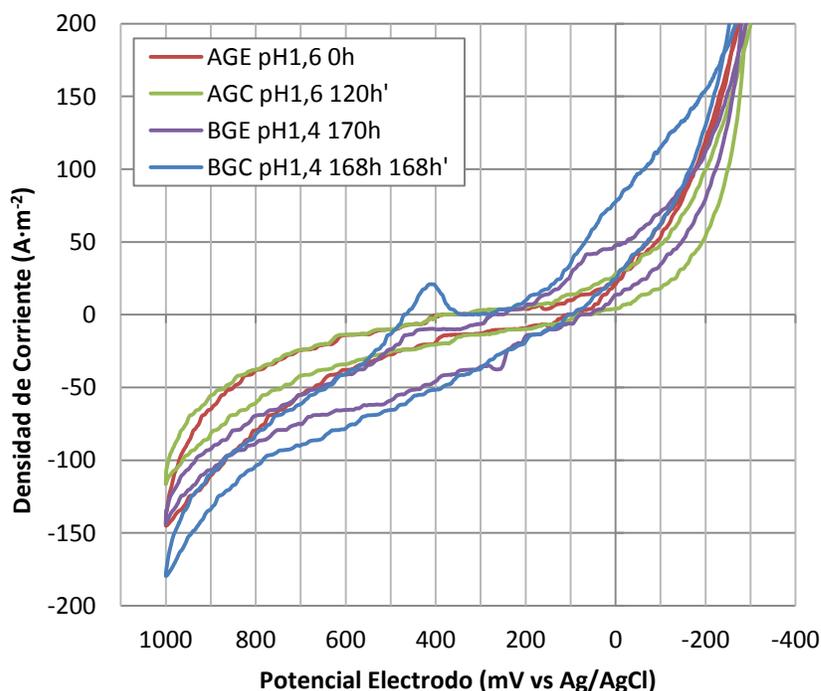


Fig. 4. CV de electrodo A en condiciones abiótica y biótica, en medio basal estéril o de cultivo a una velocidad de barrido de  $1 \text{ mVs}^{-1}$

La aparición de los picos en la condición de electrodo biótico en medio estéril se explicaría por algún tipo de modificación e interacción de la superficie del electrodo con la bacteria, ligado al crecimiento de microorganismos adheridos. A su vez, la variación de la densidad de corriente

de estos picos entre medio estéril y medio de cultivo, podría interpretarse de diversas maneras, ya sea que: (i) las bacterias en suspensión del medio de cultivo se adhieran rápidamente al electrodo incrementando el efecto de idéntica naturaleza apreciado ya en medio estéril; (ii) las bacterias adheridas actúen catalizando reacciones de especies electroactivas presentes en el medio de cultivo; (iii) las ondas redox en la condición de medio estéril se deban sólo a la presencia de especies electroactivas solubles en el líquido retenido por el biofilm, y cuando éste entra en contacto con el medio de cultivo la concentración de estas especies electroactivas aumenta en el líquido retenido, incrementando por ende la corriente de los picos. La primera hipótesis eventualmente pierde fuerza si al repetir la medición en medio estéril, tras haber sumergido el electrodo en medio de cultivo, se encuentra nuevamente una disminución de densidad de corriente en los picos. De todas formas, es posible que una combinación de los tres mecanismos hipotéticos esté ocurriendo. Igualmente las ondas redox pueden no deberse sólo a especies electroactivas solubles, sino que a complejos proteicos electroactivos de la membrana externa de la bacteria. Esto ya se ha constatado para otros microorganismos de las especies *Geobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas* y *Clostridium*, donde citocromos c de la membrana externa juegan un rol en la denominada transferencia directa de electrones al electrodo (Kim et al., 2007; Logan, 2008; Watanabe, 2008).

Acerca de *A. ferrooxidans* se conoce tan sólo un trabajo de Carbajosa et al. (2010) que afirma la ocurrencia de un biofilm electroactivo, catalizador de la reducción de  $O_2$ , el cual podría tratarse de transferencia directa de electrones desde el cátodo hacia la bacteria. No obstante, la presencia de iones Fe en el biofilm sugiere la actuación de especies de Fe como mediadores de la interacción con el cátodo. Es interesante notar que algunos de los picos de densidad de corriente registrados por Carbajosa et al. (2010) se reproducen parcialmente en los voltogramas obtenidos. Se trata de los pares redox con potencial redox formal ( $E'$ ) igual a 0,4 y 0,045 V vs SCE, que se relacionan con los picos de corriente de las condiciones bióticas en la Fig. 4 a 0,435; 0,385 y 0,035 V vs SCE<sup>2</sup> faltando la onda oxidativa del proceso redox a 0,045 V vs SCE. En estricto rigor, no es adecuado afirmar la ausencia de dicha reacción oxidativa, sino más bien la dificultad de reconocer este proceso en el voltograma, cuestión que a su vez puede estar ligada, entre otras variables, a: (i) la intrínseca irreversibilidad del proceso catódico a 0,045 V vs SCE, (ii) el enmascaramiento de esta onda oxidativa debido a otro proceso anódico, o (iii) la cinética desfavorable de dicha reacción sobre el electrodo de grafito modificado por la acción bacteriana.

En el trabajo de Carbajosa et al. (2010) la onda reductiva del proceso a 0,045 V vs SCE resulta ser fuertemente dependiente de la concentración de oxígeno disuelto, razón por la cual postula que el biofilm de *A. ferrooxidans* podría ser utilizado como biocatalizador de la reducción de  $O_2$ . Por otro lado, la onda oxidativa del mismo presenta un pico de corriente mucho menor indicando que efectivamente habría un grado de irreversibilidad del proceso catódico. No obstante, dicho proceso en condición anaeróbica presenta picos de corriente de similar magnitud para la onda oxidativa y reductiva. En cuanto al proceso a 0,4 V vs SCE éste no parece depender de la concentración de oxígeno disuelto.

Cabe notar que el biofilm analizado en esta serie experimental se ha formado bajo condiciones sustancialmente distintas de aquel estudiado por Carbajosa et al. (2010). En resumen, se trata

---

<sup>2</sup> De acuerdo a la conversión V vs Ag/AgCl = -0,045 V vs SCE

de un biofilm de ~ 170 h de formación, en cultivo aeróbico con  $S^0$  como fuente de energía y sin control del potencial del electrodo, es decir, del potencial de la superficie de grafito donde se adhieren las bacterias. En cambio, aquel otro presenta 528 h de formación, en cultivo aeróbico con electrodo de grafito como fuente de energía a potencial fijo de 0 V vs SCE, y el inóculo provenía de cultivo aeróbico con  $Fe^{+2}$  como fuente de energía. A pesar de las importantes diferencias, la aparición de los picos de corriente en las condiciones bióticas de la Fig. 4, que se relacionan con los procesos redox reportados, es un hecho que llama la atención y requiere mayor investigación para su comprensión, es decir, del fenómeno de transferencia de electrones entre la bacteria y el electrodo de grafito.

La influencia del oxígeno disuelto sobre los procesos redox encontrados se investiga realizando mediciones bajo burbujeo de  $O_2$  o  $N_2$  alternadamente en el electrolito. En la Fig. 5 se aprecia una onda reductiva, y dos ondas oxidativas en las condiciones bióticas fermentadas alrededor de 0,37 ; 0,47 y 0,30 V vs Ag/AgCl respectivamente. Ninguna de ellas cambia significativamente la densidad de corriente de sus picos al variar la concentración de oxígeno disuelto mediante el burbujeo de gases. Sí ocurre un cambio significativo de densidad de corriente en la onda reductiva alrededor de 0,05 V vs Ag/AgCl. No obstante, la falta de blancos de comparación, de condiciones abióticas fermentadas con burbujeo de  $O_2$  y  $N_2$ , no permite concluir si esta variación se debe, en algún grado, a una acción bacteriana o no. A dicho potencial probablemente el principal proceso catódico en juego es la reducción de  $O_2$ , por ende, la densidad de corriente crece con el aumento de oxígeno disuelto.

Asimismo, al comparar en la Fig. 5 la condición de electrodo abiótico en medio estéril vs biótico en medio de cultivo, ambas sin burbujeo, se encuentra una densidad de corriente similar en el rango de 0,04 a -0,2 V vs Ag/AgCl. Por otro lado, al considerar la condición de electrodo abiótico vs biótico en medios estériles sí aparecen diferencias importantes de densidad de corriente en dicho rango de potencial. En hipótesis, el biofilm podría actuar como una barrera a la difusión de  $O_2$  hacia el electrodo, razón por la cual al eliminarlo parcialmente mediante ultrasonido, a 1 y 10 min de tiempo de aplicación, o totalmente mediante pulido, la corriente de reducción de  $O_2$  aumentaría. La razón de por qué la condición de electrodo biótico en medio de cultivo alcanza una densidad de corriente similar a aquella abiótica en medio estéril en dicho rango, podría encontrarse, en cambio, en la ocurrencia de una reducción adicional de algún intermediario de azufre presente en el medio de cultivo.

En la Fig. 5 se observa una diferencia significativa en el pico de densidad de corriente del proceso catódico a 0,37 V vs Ag/AgCl entre las condiciones bióticas estériles y fermentadas, comportamiento que sigue la tendencia de lo observado con el proceso análogo de la Fig. 4. Además, se logra reconocer el proceso anódico, antes único de la condición en medio estéril, con un pico de densidad de corriente a 0,25 y 0,29 V vs Ag/AgCl en la condición de electrodo biótico en medio estéril y de cultivo respectivamente.

La disminución de la densidad de corriente de los picos en las condiciones bióticas estériles de la Fig. 5, en el rango de potencial de 0,6 a 0,2 V vs Ag/AgCl, sugiere fuertemente que estos procesos redox están asociadas a la presencia de bacterias vivas adheridas al electrodo. Es decir, al aplicar ultrasonido las bacterias se rompen y/o desprenden del biofilm, habiendo menor cantidad de bacterias vivas adheridas sobre el electrodo, y por ende, menor cantidad de electrones transferidos por unidad de tiempo, o equivalente, de densidad de corriente de los

procesos redox del biofilm. En el caso extremo, cuando el electrodo es pulido para eliminar el biofilm los procesos redox antes vistos en dicho rango de potencial desaparecen.

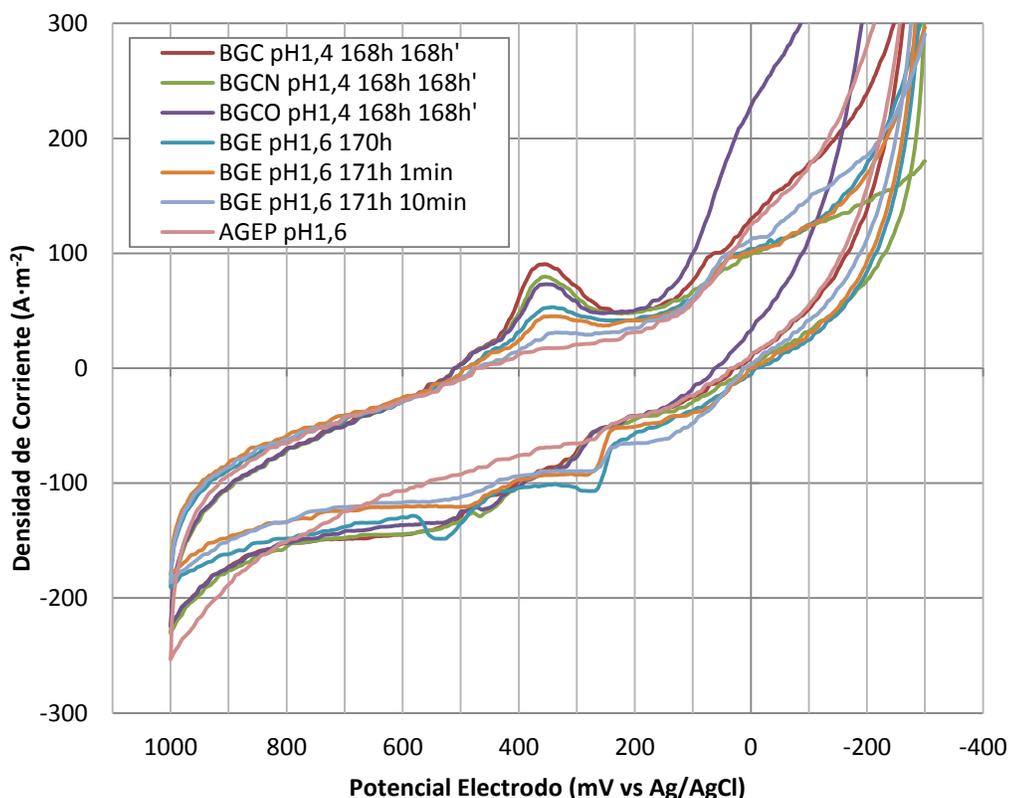


Fig. 5. CV de electrodo A en condición biótica en medio basal estéril o de cultivo a  $5 \text{ mVs}^{-1}$ . En los dos penúltimos barridos se aplicó ultrasonido para destruir el biofilm formado; en el último, se pulió completamente el electrodo

Al comparar las ondas redox en las condiciones bióticas registrada a distintas velocidades de barrido, se observa un corrimiento de la onda reductiva alrededor de  $0,43 \text{ V vs Ag/AgCl}$  en la CV a  $1 \text{ mV/s}$  hacia un potencial más negativo de  $0,37$  y  $0,32 \text{ V vs Ag/AgCl}$  para  $5$  y  $10 \text{ mV/s}$  respectivamente. Dicho comportamiento es característico de los procesos irreversibles (Bard, 2001). Las ondas oxidativas, por el contrario, no muestran un corrimiento tan marcado, sugiriendo que son proceso de menor irreversibilidad (quasireversibles). El aumento general de la densidad de corriente al aumentar la velocidad de barrido es un efecto normal, asociado a (i) la generación de una *corriente de carga*, proceso no faradaico, al variar sostenidamente el potencial durante el ciclado, y (ii) los efectos de corrientes transientes que se ven aumentados al aumentar la velocidad de barrido (Bard, 2001).

#### 4.1.2 Voltametrías serie B

El biofilm analizado en esta serie presenta un tiempo de crecimiento menor al anterior,  $144 \text{ h vs } 170 \text{ h}$  en la serie A, por esta razón, probablemente, la magnitud relativa de los picos de densidad de corriente es menor, y las ondas redox en el rango de potencial de  $0,6$  a  $0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$  resultan menos definidas.

La comparación de la magnitud absoluta de los picos de densidad de corriente de la Fig. 6, electrodo B, vs Fig. 5, electrodo A, no es adecuada, ya que la determinación de la densidad de corriente es relativamente inexacta. Esto se debe a la dificultad de medir el área efectiva del electrodo, la cual puede diferir en gran cantidad del área proyectada debido a la rugosidad de la superficie. Si bien los electrodos A y B han sido construido y pulidos de la misma forma, el grafito es un material blando cuya superficie conserva una alta rugosidad. Si se comparasen dichas figuras sin normalizar los voltagramas, se observaría una diferencia, independiente del valor del potencial, de al menos  $200 \text{ Am}^{-2}$  entre condiciones análogas del electrodo A vs B.

Los resultados en la Fig. 6 reproducen casi todas las observaciones hechas en la serie A, vale decir, (i) se registran ondas redox en el rango de potencial 0,6 a 0,2 V vs Ag/AgCl ligados únicamente a la presencia de bacterias vivas adheridas al electrodo, formando entonces presumiblemente un biofilm electroactivo; (ii) si el electrolito es medio de cultivo la densidad de corriente de dichas ondas aumenta significativamente; (iii) aunque aparentemente el medio de cultivo no contiene especies electroactivas, al comparar entre si las condiciones abióticas estéril y fermentada; (iv) en el rango de potencial de 0,2 a -0,2 V vs Ag/AgCl se observa una onda reductiva fuertemente dependiente de la concentración de oxígeno disuelto, no obstante, no se puede concluir algún grado de acción bacteriana.

A diferencia de la serie A, los procesos redox del biofilm en el rango de potencial 0,6 a 0,2 V vs Ag/AgCl se pueden reconocer como pares redox con potencial formal de electrodo ( $E'$ ) de 0,47 y 0,36 V vs Ag/AgCl, cuestión que se representa en con las líneas entrecortadas de la Fig. 6. Eventualmente, a mayor tiempo de formación del biofilm las ondas reductivas de estos procesos se solapan, resultando una única onda reductiva adición de las corrientes de dichos procesos catódicos, razón por la cual en el biofilm de la serie A sólo se distingue una única onda reductiva en este rango de potencial. Cierto es que para el caso de las ondas oxidativas podría ocurrir el mismo fenómeno, no obstante, en la serie A se distingue claramente dos procesos anódicos diferentes. La apreciación anterior se refiere al hecho que el biofilm B es aprox. 26 h más joven que A.

Al comparar la condición en medio estéril de electrodo abiótico y biótico de la Fig. 6 se aprecia una diferencia significativa, generándose una onda reductiva en la condición de electrodo biótico alrededor de 0,02 V vs Ag/AgCl. Este resultado contradice lo observado en la serie anterior (Fig. 5), donde es la condición de electrodo abiótico la cual presenta una onda reductiva de mayor densidad de corriente.

Cabe notar que la resolución de las curvas voltamétricas de la Fig. 6 es superior a la obtenida en los voltagramas de las series anteriores. Esto se explica simplemente por la curva de aprendizaje del trabajo experimental, en el sentido de haber logrado una operación del equipo electroanalizador a un valor de *sensitivity* más adecuado para la magnitud de la corriente a medir.

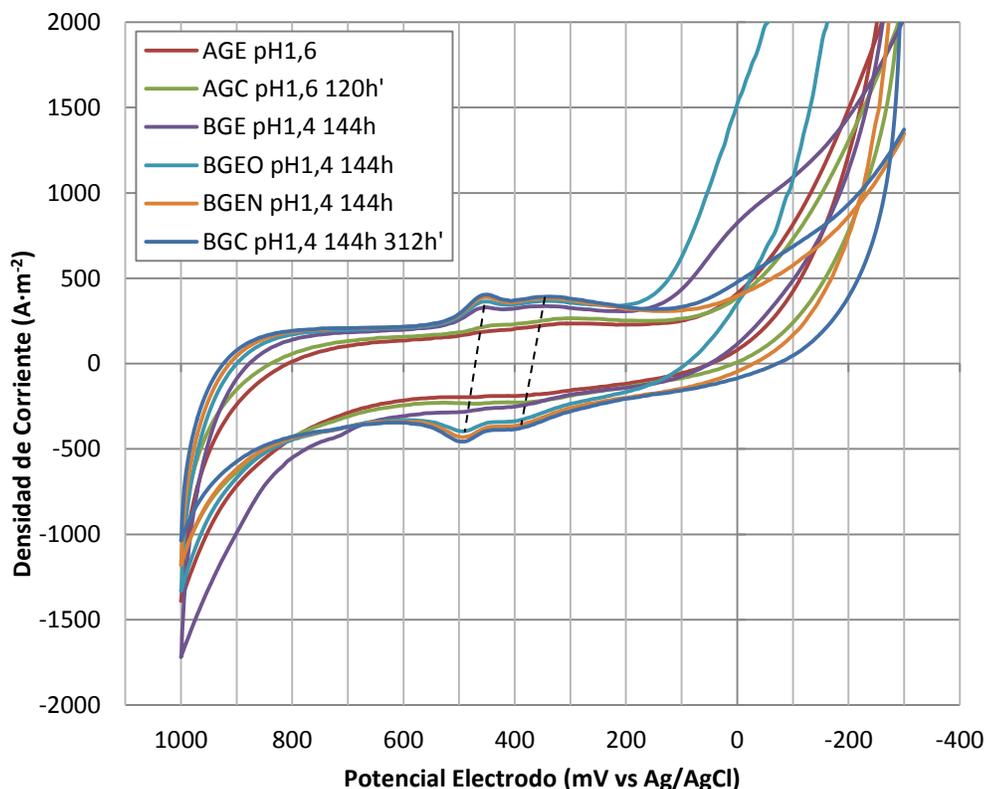


Fig. 6. CV de electrodo B en condiciones abiótica y biótica en medio basal estéril o de cultivo a  $5 \text{ mVs}^{-1}$

#### 4.1.3 Voltametrías serie C

En esta serie se investiga principalmente la influencia de la deposición de azufre elemental sobre la superficie del electrodo, y la posterior formación de un biofilm de *A. ferrooxidans* sobre el azufre depositado (ver Sec. 3.2.3).

La deposición de azufre sobre el electrodo abiótico provoca una disminución sustancial de la densidad de corriente en todo el rango de potencial, y a mayor cantidad de azufre depositado menor es la densidad de corriente (Fig. 7). La cantidad, la forma y el grosor de la capa de azufre depositado son desconocidos. La variable manipulada ha sido la cantidad de azufre evaporado/sublimado en un ambiente anóxico (cerrado) donde el electrodo es expuesto al vapor de azufre, y se asume que a mayor cantidad evaporada, mayor cantidad depositada sobre el electrodo. Inicialmente se evapora/sublima 0,1 g, y luego 0,5 g adicionales de  $\text{S}^0$ , de esta manera, la resistencia del electrodo (medida entre la superficie de grafito y la punta conectora de cobre) aumenta desde  $\sim 1,5 \Omega$  sin  $\text{S}^0$  depositado a  $\sim 10 \Omega$  y  $\sim 1 \text{ M}\Omega$  respectivamente para 0,1 y 0,6 totales de  $\text{S}^0$  evaporado/sublimado. En este sentido, el azufre elemental actúa como una capa dieléctrica sobre el electrodo, y la curva de polarización de la condición de 0,6 g  $\text{S}^0$  se asemeja a aquella de un *electrodo polarizable ideal*. Si efectivamente este tipo de electrodo permitiera aún la transferencia de carga con otras especies electroactivas, este efecto sería de interés justamente para la obtención de un electrodo polarizable ideal alternativo, por ejemplo, a la gota de mercurio.

Al observar la Fig. 7 se podría pensar también que la capa de azufre elemental genera un aumento del sobrepotencial de activación ( $\eta_{\text{act}}$ ) de las reacciones redox del agua, ya que a mayor

cantidad de azufre depositado, más grande es el corrimiento del levantamiento de la curvas. No obstante, al analizar los voltagramas con la corriente normalizada ( $i/i_{max}$ ) dicho efecto se puede descartar pues no se aprecia un corrimiento significativo (Fig. 8).

Tras haber evaporado/sublimado 0,6 g totales de  $S^0$  el electrodo es incubado en un cultivo aeróbico de *A. ferrooxidans* que presenta ya 7 días de cultivo, y se esperan otros 12 días para asegurar la formación de un biofilm capaz de reducir y/u horadar la capa de azufre depositado, de forma tal que sea posible una interacción bacteria-electrodo. En la Fig. 9 se observa que efectivamente la capa de azufre ha sufrido modificaciones al comparar las condiciones abióticas con azufre vs bióticas. Esto también se pudo observar de manera visual, puesto que tras haber depositado azufre la superficie de grafito adquiere una coloración levemente blanquecina, la cual tendió a desaparecer tras ser incubado. Además la mojabilidad de la superficie de grafito también evidencia cambios, ya que sin azufre ésta efectivamente se moja, en cambio, con una capa de azufre se vuelve hidrofóbica, y tras la incubación nuevamente vuelve a mojarse.

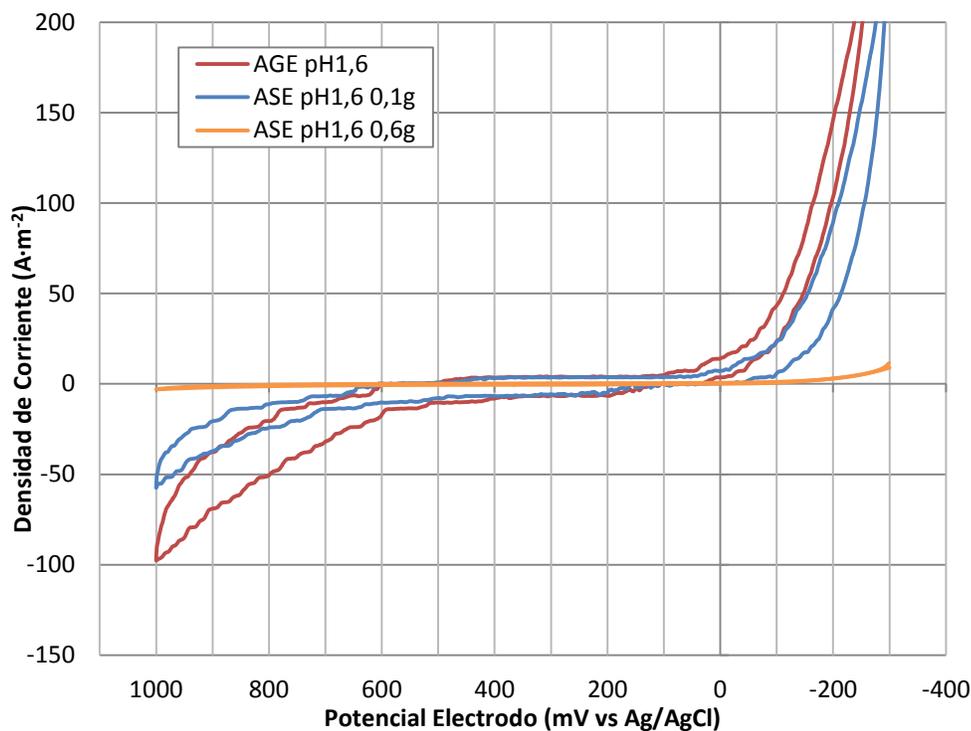


Fig. 7. CV de electrodo C en condición abiótica con y sin deposición de azufre elemental sobre el grafito a  $2 \text{ mVs}^{-1}$

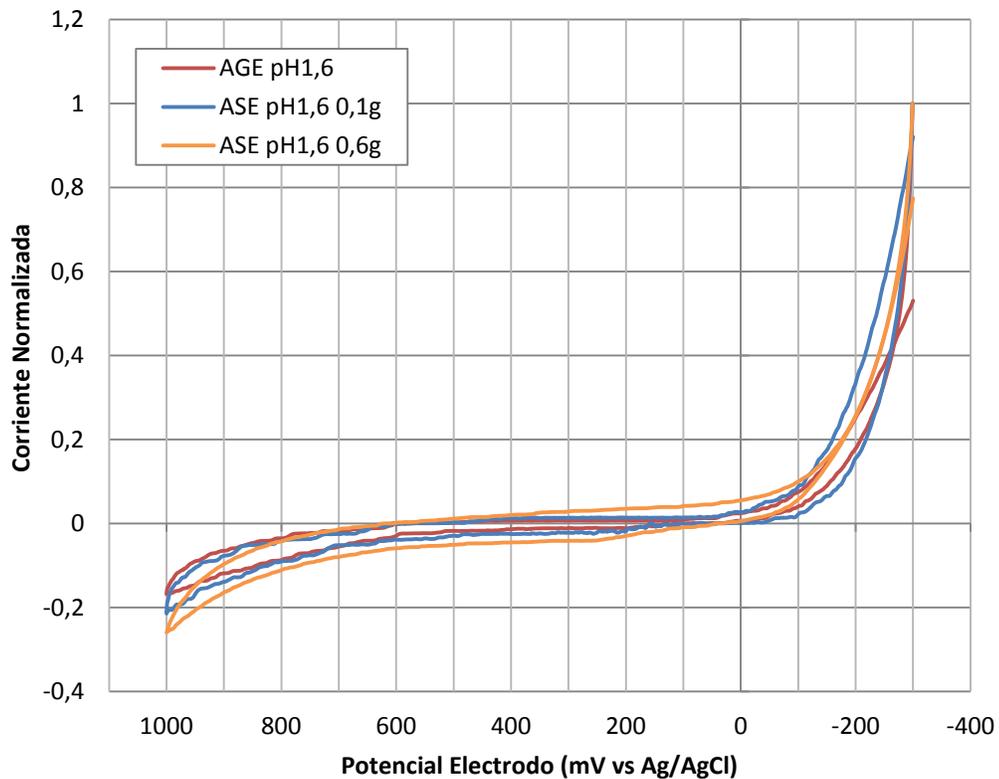


Fig. 8. CV de la figura anterior normalizados por la densidad de corriente máxima a  $2 \text{ mVs}^{-1}$

Los procesos del biofilm encontrados en las series anteriores (A y B) en el rango de potencial de 0,6 a 0,2 V vs Ag/AgCl parecen no ocurrir (Fig. 9). Se aprecia, de todas formas, en las condiciones bióticas una onda reductiva fuertemente dependiente de oxígeno disuelto alrededor de  $-0,06 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , la cual no ocurre en la condición de electrodo abiótico en medio estéril. El hecho que dicha onda sea mayor en la condición de electrodo biótico en medio estéril vs de cultivo reproduce la tendencia registrada en la serie B (Fig. 6) pero contradice lo observado en la serie A (Fig. 5). En hipótesis, un dador de electrones, eventualmente un intermediario reducido de azufre, compite con el electrodo por la reducción de  $\text{O}_2$  ya sea mediada o no por la acción bacteriana. Dicha razón, aplicable a la tendencia de la serie B y C, explicaría la disminución de corriente del proceso catódico en juego cuando el electrolito es medio de cultivo. Además, si se trata de un dador de electrones que se acumula en el medio de cultivo, se explica también la diferencia significativamente mayor registrada en la serie C vs B, ya que el tiempo de cultivo de la primera es sustancialmente mayor, 456 h' vs 312 h' respectivamente.

Dado el largo tiempo de formación del biofilm, el pH alcanzado por el medio de cultivo (pH 1,0) es significativamente más ácido que en las series anteriores. Si bien se trata de una bacteria acidófila, un medio tan ácido puede haber inhibido su metabolismo y/o producir el decaimiento (muerte) bacteriano, razón por la cual los procesos vistos en condiciones bióticas asociadas a la presencia de bacterias vivas pueden no haber ocurrido.

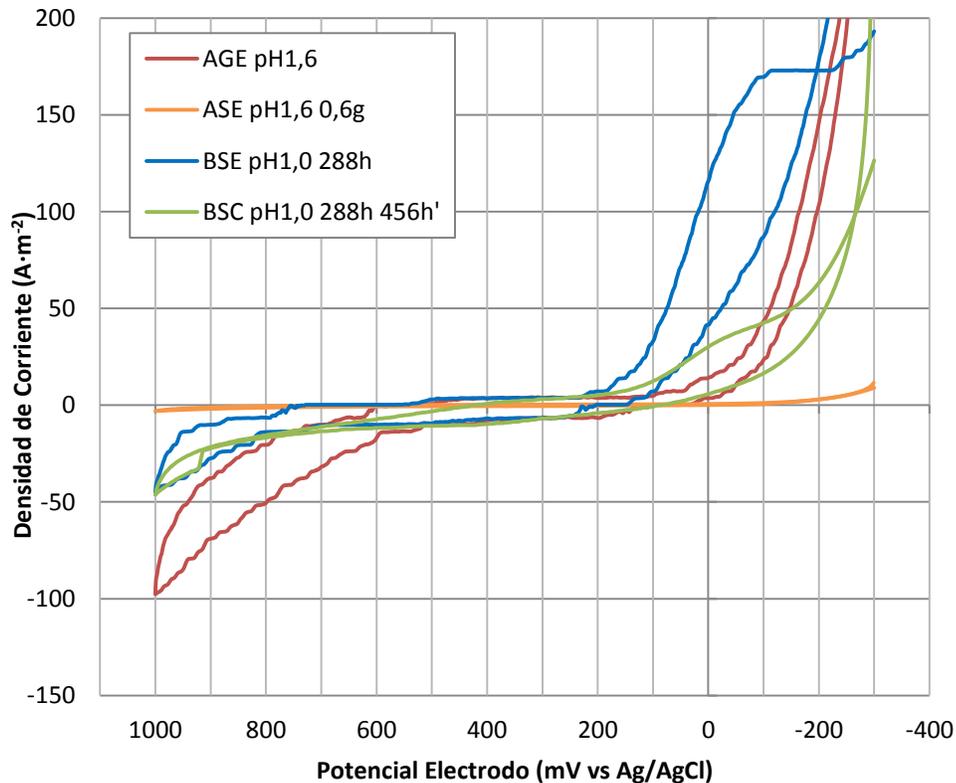


Fig. 9. CV de electrodo C en condiciones abiótica y biótica con azufre elemental depositado sobre el grafito en medio basal estéril o de cultivo a  $2 \text{ mVs}^{-1}$

#### 4.1.4 Identificación de especies electroactivas

A fin de determinar qué especies electroactivas se encuentran en los medios de cultivo, se ensayó la comparación de voltagramas usando el electrodo A en medios basales con  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  disueltos separadamente a una concentración de 10 mM. Los voltagramas obtenidos presentan curvas en escalas de magnitud muy disímiles, razón por la cual se normalizan por la intensidad de corriente máxima para poder comparar sus formas, entre ellos y versus los voltagramas de electrodos abióticos y bióticos.

Este método no arroja resultados coherentes. Probablemente la concentración de las especies a ensayar es demasiado alta respecto de aquella que pueda existir en los medios de cultivo, razón que ubica a las curvas en escalas de magnitud disímiles, impidiendo una comparación adecuada de sus formas, excepto en el caso de la solución de  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ . En este sentido, la diferencia en la escalas se puede interpretar como diferencias en la cinética de oxidación de estos compuestos, estando la escala más grande asociada a una cinética más rápida.

Eventualmente esta experiencia se podría realizar de otra forma, añadiendo una pequeña cantidad de cada especie en un electrolito de medio basal con electrodos abióticos y bióticos, de tal forma de identificar un proceso de biocatálisis de la oxidación de estas especies ligado a la presencia de un biofilm de *At. ferrooxidans*. Es decir, una experiencia análoga al burbujeo de  $\text{O}_2$  para encontrar procesos redox del biofilm dependientes de éste.

## 4.2 Operación de Celda Prototipo usando Azufre Elemental como combustible y *Acidithiobacillus ferrooxidans* como biocatalizador

A fin de probar el diseño conceptual de la celda de combustible microbiológica planteada usando  $S^0$  como combustible primario, y el rol del biofilm electroactivo de *At. ferrooxidans* en su desempeño, se operó durante 552 h (23 d) una celda prototipo a escala de laboratorio, de doble cámara anóxica-aeróbica separada por una membrana de intercambio catiónico tipo Nafion® (ver Sec. 3.2.3). Durante este periodo se estudió la evolución del sistema en operación *fed-batch* (biopila), y sus respuestas frente a cambios de composición de los electrolitos (anolito y catolito). Experimentalmente se registró la variación del voltaje en circuito abierto (OCV) y pH de los electrolitos, y se llevaron a cabo voltametrías cíclicas en serie temporal para caracterizar la evolución de los procesos redox en los electrodos (ver Sec. 3.2.4).

El diseño de la celda comprende dos electrodos que actúan idealmente como ánodo y cátodo en el compartimento anóxico y aeróbico respectivamente. Los voltagramas obtenidos en serie temporal para cada uno de los electrodos se presentan a continuación.

### 4.2.1 Voltametrías serie anódica

El compartimento anóxico es rellenado inicialmente con 135 mL de medio de cultivo aeróbico de *At. ferrooxidans* con  $S^0$  polvo como fuente de energía; el compartimento aeróbico, sólo con medio estéril pH 2,3. Inicialmente se añade ~1 g de  $S^0$  al compartimento anóxico, el cual correspondía al sustrato del cultivo usado. Progresivamente se añadirá más  $S^0$  proveniente también de cultivos similares hasta alcanzar un máximo de ~4 g.

La Fig. 10 muestra una serie temporal de voltagramas del ánodo desde el tiempo cero hasta 264 h de operación, equivalente en este caso al tiempo de formación del biofilm.

La capacidad de estimular el crecimiento de *At. ferrooxidans* gracias a la acción de un electrodo y  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  como mediadores de la transferencia de electrones es una cuestión ya conocida (Meruane, 2002). Sin embargo, en las condiciones estudiadas en este trabajo no hay adición de iones Fe, excepto aquellos presentes en el medio basal en concentración traza. Si el crecimiento en el tiempo apreciado en las ondas redox de los voltagramas en la Fig. 10 es efectivamente de origen biótico, asumiendo que la condición anóxica es suficientemente adecuada para evitar contaminación de  $O_2$ , se especula que *At. ferrooxidans* sea una bacteria anodofílica, es decir, capaz de utilizar un electrodo como aceptor terminal de electrones. De qué manera la bacteria utilizaría el ánodo como aceptor de electrones es un asunto por investigar. A conocimiento del autor, el hecho que dicha bacteria sea anodofílica es una novedad, y solamente Carbajosa et al. (2010) ha postulado la propiedad análoga de catodofilia, es decir, utilización de un electrodo como dador de electrones.

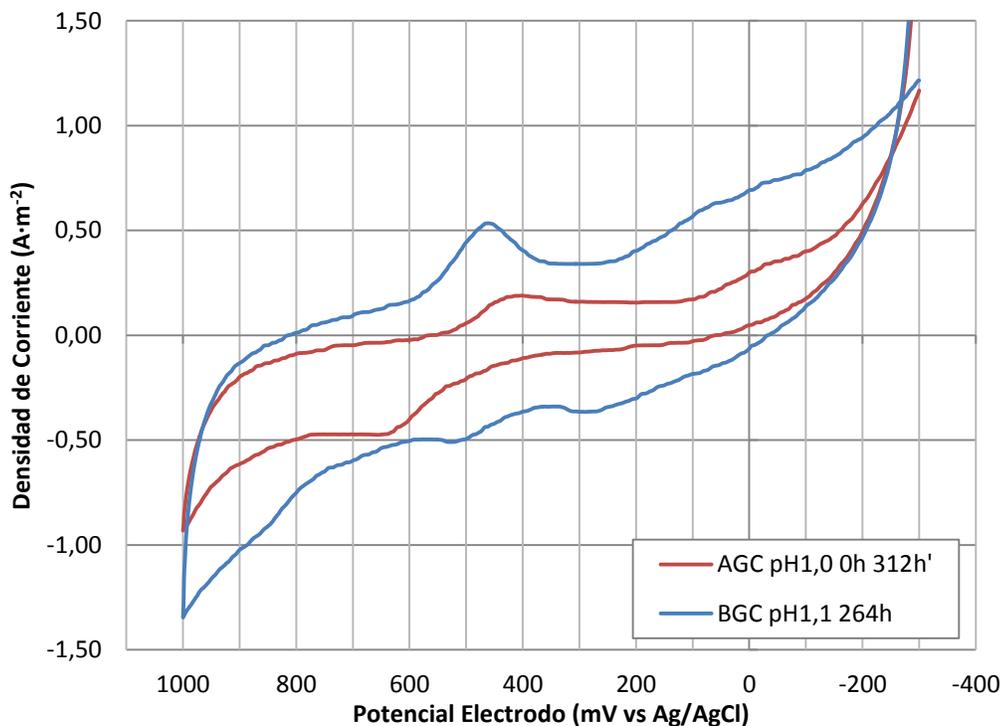


Fig. 10. CV del ánodo a distintos tiempos de operación de 0 h a 264 h a  $5 \text{ mVs}^{-1}$

De acuerdo a la literatura establecida  $\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{+3}$  son los aceptores terminales que *At. ferrooxidans* es capaz de usar en su cadena respiratoria para sostener un crecimiento bacteriano. (Pronk et al., 1992; Rawlings, 2005) En los últimos años se ha encontrado también evidencia y/o indicios del uso de  $\text{Mo}^{+6}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{U}^{+6}$  y  $\text{V}^{+5}$  como aceptores terminales de electrones, y en algunos casos también ha sido probado el crecimiento bacteriano (Sugio et al. 1988; Rawlings 2005; Sugio et al. 1990; Gargarello et al. 2010; Bredberg et al. 2004). Esto señala una increíble adaptabilidad del microorganismo a diferentes condiciones y ambientes.

La forma de los voltagramas de la Fig. 10 recuerda aquellos de la Fig. 5 (ver Sec. 4.1.1), vale decir, se observa la aparición en la condición de electrodo biótico de dos ondas oxidativas, alrededor de 0,49 y 0,23 V vs Ag/AgCl, y una onda reductiva, alrededor de 0,47 V vs Ag/AgCl, que en este caso se ha desplazado hacia un potencial más positivo respecto de dicha onda en la serie mencionada. Asimismo, en el rango de potencial de 0,2 a -0,2 aparece una onda reductiva dependiente de la concentración de  $\text{O}_2$  aparentemente asociada al biofilm en formación.

Especial atención demanda el voltagrama a las 48 h de formación del biofilm, pues aparecen dos ondas oxidativas adicionales a las propias del biofilm, con picos de corriente en 0,66 y 0,85 V vs Ag/AgCl. Eventualmente dichas ondas se asociarían a compuestos intermedarios de azufre que se han acumulado.

La Fig. 11 muestra un importante efecto del pH sobre la electroactividad del biofilm. En el voltagrama correspondiente a 312 h de formación del biofilm, se observa que las ondas redox registradas anteriormente en todas las condiciones de electrodo biótico desaparecen. Eventualmente el aumento del pH a 4,6 podría estar inhibiendo el metabolismo bacteriano. Este

aumento se ha debido a la adición de 1 g de  $\text{CaCO}_3$  como fuente de carbono, alimentación efectuada a 300 h de operación de la celda. Tras haber constatado dicho efecto se ajustó el pH con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a un valor de 2,3 , y luego de 24 h se recuperaron levemente las ondas redox en el voltagrama siguiente, razón por la cual se postula la ocurrencia de inhibición. Por otro lado, el decaimiento bacteriano (muerte) podría ser la causa de no recuperar la misma intensidad de corriente inmediatamente anterior a la adición del carbonato.

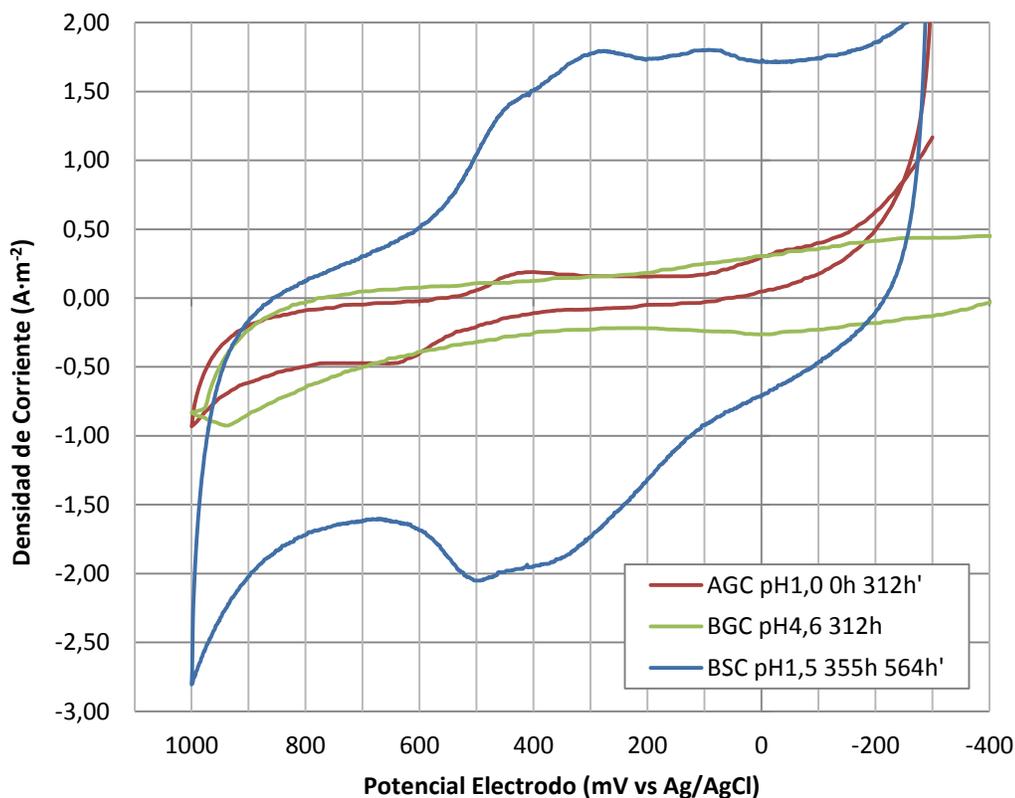


Fig. 11. CV del ánodo a distintos tiempos de operación desde 0 h a 355 h a  $5 \text{ mVs}^{-1}$

A 343 h de operación se reemplazó el ánodo por medio de cultivo aeróbico de *A. ferrooxidans* con  $\text{S}^0$  como fuente de energía, con una edad de aprox. 552 h de cultivo, al realizar una voltametría cíclica se registró un fuerte incremento de la densidad de corriente y el crecimiento de las ondas redox asociadas al biofilm. Tras 24 h del cambio en el ánodo, se registra en el voltagrama siguiente una disminución significativa de la onda oxidativa, lo cual genera un pico de densidad de corriente a  $0,48 \text{ V vs Ag/AgCl}$  en vez de un punto de inflexión como en el voltagrama anterior. La razón de esta diferencia podría deberse a la acumulación de al menos dos especies electroactivas distintas, una oxidándose a una cinética mucho más rápida que la otra. Qué especies o qué otro tipo de fenómeno causa el incremento de corriente al reemplazar el ánodo no es del todo claro.

Inicialmente la cantidad de  $S^0$  acumulado en el fondo del compartimento anóxico no alcanza a entrar en contacto directo con el electrodo, al añadir más azufre elemental llegó un momento en que el electrodo se sumerge parcialmente en polvo de azufre. Esto ocurrió a 343 h de operación, cuando se reemplaza el anolito por el medio de cultivo y se añade ~2 g de  $S^0$  correspondiente a sustrato de cultivos aeróbicos de *At. ferrooxidans*. Anteriormente ya se había añadido ~1g de  $S^0$  a 240 h de operación, por lo tanto, a 343 h se alcanzó el máximo de azufre elemental añadido de ~4 g.

Eventualmente, el hecho que el electrodo se sumerja en polvo de azufre, permitiría que dicho polvo reaccione directamente sobre el electrodo mediante algún mecanismo de catálisis bacteriana. En estricto rigor, el sentido de cuán directo o indirecto es la oxidación del azufre elemental y la transferencia de electrones al ánodo, se refiere al mecanismo de reacción que define una interacción entre el azufre elemental y el electrodo. Si dicho mecanismo queda dado por una vía metabólica bacteriana, donde el aceptor terminal de electrones es el ánodo, y el último metabolito algún tipo de proteína de membrana, como citocromos-c, que pasa de un estado reducido a oxidado al transferir el electrón al ánodo, entonces se habla de transferencia directa de electrones al electrodo. Se espera que dicha transferencia directa ocurra a una cinética más rápida que el caso indirecto, donde el último metabolito correspondería a un aceptor de electrones molecular que debiese migrar y/o difundir, en estado reducido, hacia el ánodo actuando como mediador redox entre la bacteria y el electrodo.

En las Fig. 11, Fig. 12 y Fig. 13 se nota que la condición de electrodo biótico en medio de cultivo con azufre elemental en contacto directo, presenta densidades de corriente significativamente superiores a dicha condición sin azufre elemental en contacto directo. Si efectivamente existe un mecanismo de transferencia directa de electrones del azufre elemental al ánodo mediada por una interfase bacteriana (biofilm electroactivo), entonces se puede postular que el aumento de corriente se liga justamente a dicho fenómeno, el cual no podía ocurrir si la bacteria no establecía un contacto con el azufre elemental y el ánodo a la vez. Ciertamente una explicación menos especulativa se puede formular en términos de la menor distancia recorrida por el mediador redox en su camino al ánodo, vale decir, una mejora de la transferencia de masa que permite a su vez un aumento de la corriente, cuestión que en un sistema estático (sin agitación) puede tener efectos significativos al cambiar los perfiles (gradientes) de concentración.

A las 508 h de operación el voltagrama de la Fig. 12 muestra una notoria onda oxidativa y una reductora con un picos de densidad de corriente a ~0,52 y ~0,9 V vs Ag/AgCl respectivamente. Dichas ondas se pueden apreciar también en los voltagramas de condición de electrodo biótico con contacto directo de azufre elemental, con picos de corriente de menor intensidad que aparecen a potenciales similares, alrededor de 0,47 V vs Ag/AgCl para la onda oxidativa y 0,01 V vs Ag/AgCl para la onda reductora.

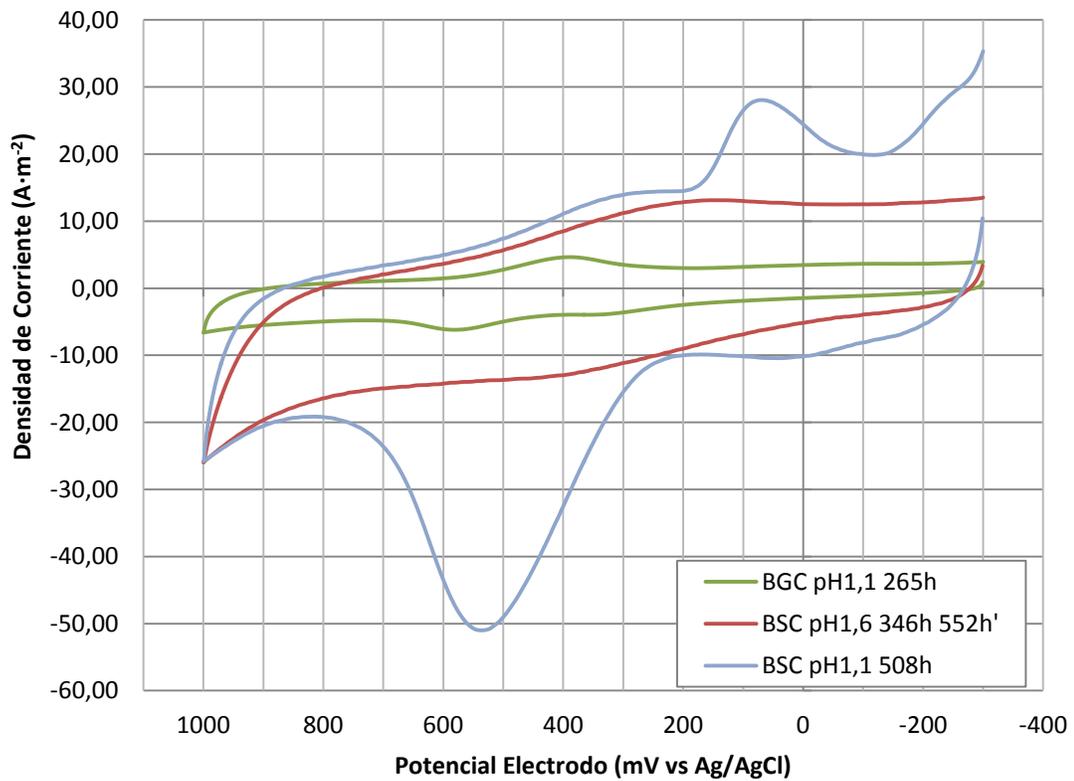


Fig. 12. CV del ánodo a distintos tiempos de operación desde 265 h a 528 h a  $50 \text{ mVs}^{-1}$

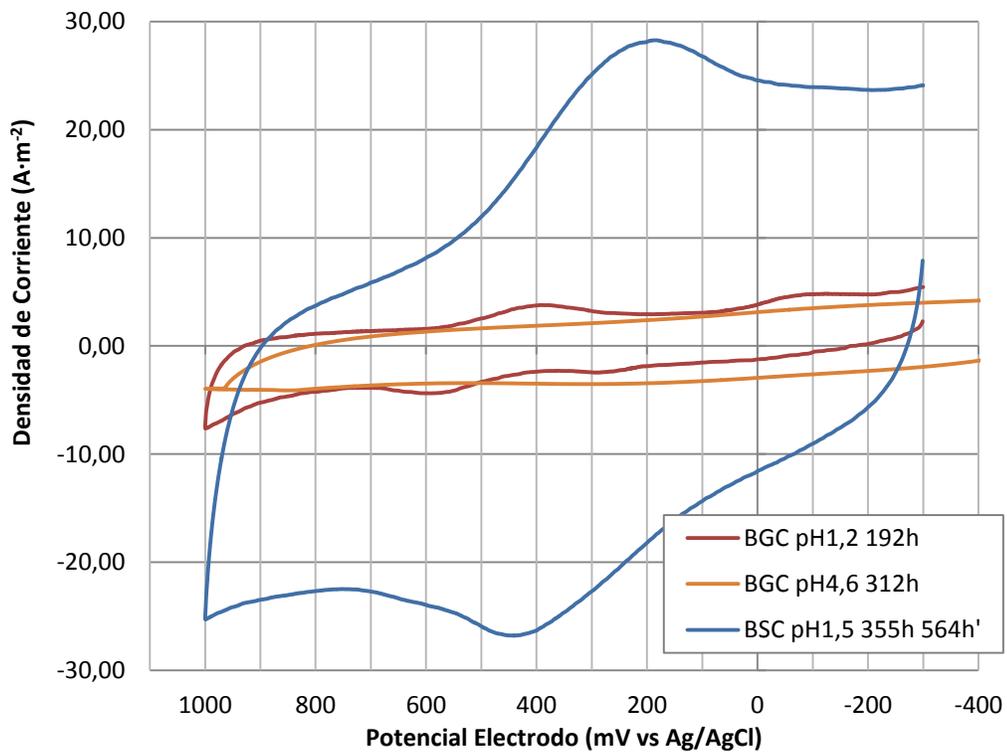


Fig. 13. CV del ánodo entre 192 h y 355 h de operación a  $100 \text{ mVs}^{-1}$

Probablemente, el incremento notorio se debió a la acumulación de las especies electroactivas en juego durante el lapso de tiempo que no se realizaron voltametrías cíclicas. En este sentido, se debe considerar que cualquier técnica de medida electroanalítica, para el caso la voltametría cíclica, altera la composición del electrolito y la superficie del electrodo una vez efectuada la medida. El voltagrama efectuado a 509 h de operación no muestra la misma intensidad en las ondas descritas, sugiriendo que la medición anterior agotó la cantidad de especie electroactiva oxidable (en su estado reducido) y reducible (en su estado oxidado). La diferencia significativa de la densidad de las ondas entre la medida a 508 y 509 h de operación sugeriría que la reducción de la especie oxidada en juego es un proceso muy irreversible, razón por la cual tras haber oxidado una primera vez dicha especie no se puede obtener posteriormente similares densidades de corriente alrededor de 0,5 V vs Ag/AgCl.

La Fig. 13 da cuenta de los efectos ya descritos, desarrollo de un biofilm electroactivo, inhibición del biofilm por aumento de pH e incremento significativo de la densidad de corriente ya sea por el contacto directo del azufre elemental con el electrodo y/o el remplazo del anolito por un medio de cultivo aeróbico de *At. ferrooxidans*, creciendo con  $S^0$ , de elevada edad (564 h'). Para esclarecer el último efecto se necesita repetir la experiencia, evitando la variación de ambas condiciones a la vez, no obstante, el hecho que tras varios días de operación el incremento se mantenga sugeriría que éste no se ha debido sólo a un efecto transiente de adición de especies electroactivas acumuladas.

Por último, en relación a las medidas efectuadas con 1 g de grafito granular añadido, al parecer no se ha logrado el efecto deseado de aumento del área de electrodo, pues no hay incremento significativo de la densidad de corriente respecto a los voltagramas de condición de electrodo biótico con azufre elemental en contacto directo sin grafito granular. Eventualmente la cantidad de grafito fue insuficiente para establecer una red de contacto (eléctrico) entre los gránulos, además al mezclarse con azufre elemental, que actúa como aislante eléctrico, en mayor proporción (4:1) aumenta la dificultad que ocurra el contacto entre los gránulos de grafito y entre los gránulos y el electrodo de grafito masivo.

#### **4.2.2 Voltametrías serie catódica**

Los procesos redox en el compartimento aeróbico se comenzaron a estudiar a partir de 192 h de operación. Este compartimento se mantuvo con medio basal pH 2,3 estéril como electrolito, añadiéndose medio en la medida que se apreciaba una evaporación significativa del electrolito, a fin de mantener un nivel relativamente estable del mismo.

Hasta las 220 h de operación no se inculó el compartimento, razón por la cual se esperaba que los procesos redox hasta dicho momento sólo fuesen de naturaleza abiótica. No obstante, al apreciar los voltagramas de la Fig. 14 se observa la aparición de procesos redox no vistos antes con electrodos de grafito en condición abiótica en medio estéril, se trata de una onda oxidativa con un pico de densidad de corriente a  $\sim 0,56$  V vs Ag/AgCl, y dos ondas reductoras con picos de densidad de corriente alrededor de 0,23 y 0,06 V vs Ag/AgCl respectivamente. Estos procesos no parecen depender de la concentración de oxígeno disuelto, observación derivada de comparar la condición supuestamente de electrodo abiótico en medio estéril vs abiótica en medio estéril con burbujeo de  $O_2$ .

Luego de inocular el compartimento aeróbico con *At. ferrooxidans*, proveniente de un cultivo aeróbico creciendo con  $S^0$ , se observa un cambio de las ondas redox vistas anteriormente, pudiéndose reconocer ahora dos pares redox con potencial formal de electrodo ( $E'$ ) de 0,47 y 0,18 V vs Ag/AgCl (Fig. 14, líneas punteadas). Este resultado reproduce parcialmente lo visto en la Fig. 6 de la Serie B (ver Sec. 4.1.2), excepto el corrimiento hacia un potencial más negativo del par redox con  $E'$  igual a 0,18 V vs Ag/AgCl.

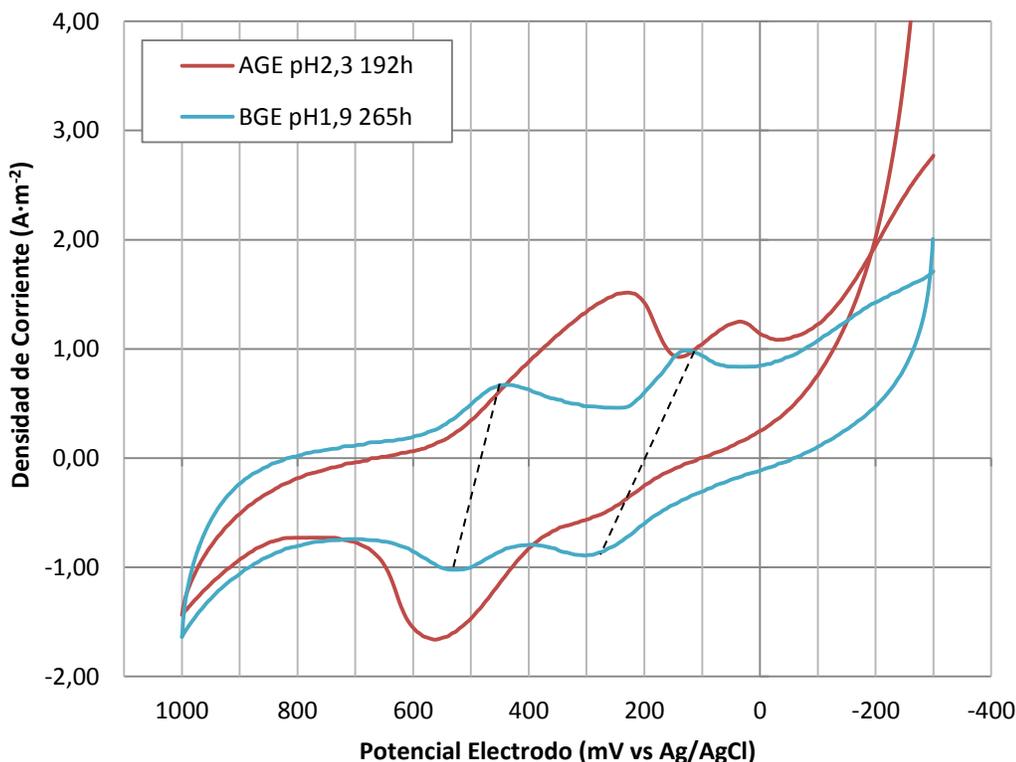


Fig. 14. CV del cátodo entre 192 h y 265 h de operación a  $5 \text{ mVs}^{-1}$

Tanto la aparición de los procesos redox no esperados en la condición de electrodo supuestamente abiótica, como el cambio significativo de dichos procesos tras la inoculación de *At. ferrooxidans* (Fig. 14) son fenómenos que requieren mayor investigación para su comprensión. Eventualmente se puede especular que las ondas redox a 192 h se deban a la migración de especies electroactivas generadas en el compartimento anóxico, que reaccionan entonces sobre el cátodo. Asimismo, el cambio tras la inoculación estaría asociado efectivamente a procesos bióticos como colonización de la superficie por las bacterias, y formación de un biofilm electroactivo. Esto último probablemente sí ocurre como lo sugiere la reproducción parcial de resultados ya observados con biofilms de *At. ferrooxidans* en aerobiosis.

La Fig. 15 muestra la evolución de los procesos redox en el cátodo tras la formación de un supuesto biofilm electroactivo. A 354 h de operación se registra un fuerte incremento de la densidad de corriente, este incremento coincide con aquel ocurrido en el ánodo dentro del mismo periodo de tiempo. Una vez que se añade 1 g de grafito granular se aprecia un claro efecto de incremento de las corrientes catódicas, lo cual se esperaba por el aumento del área del electrodo (Fig. 16).

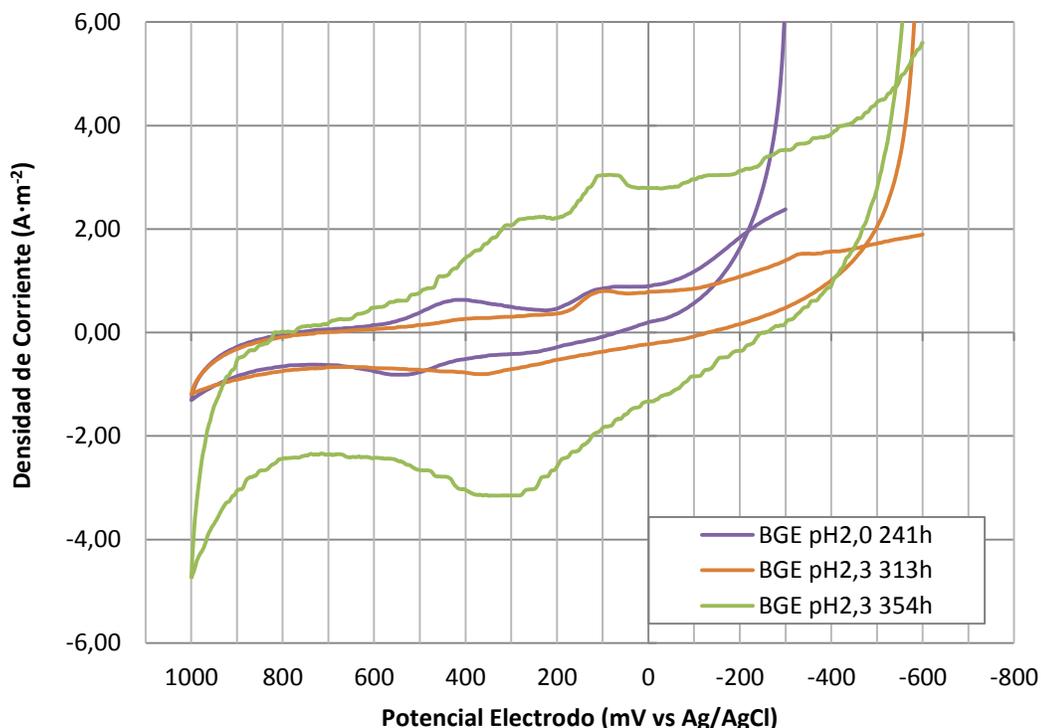


Fig. 15. CV del cátodo entre 241 h y 526 h de operación a  $5 \text{ mVs}^{-1}$

La Fig. 16 da cuenta también de la evolución de los procesos redox, además del efecto de la adición de grafito granular. La condición de electrodo biótico en medio estéril a 265 h de operación pareciera no presentar ondas redox asociadas al biofilm, no obstante, esto se debe a la escala del gráfico y la velocidad de barrido utilizada de  $50 \text{ mV/s}$ . Si se considera dicha condición también registrada a una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV/s}$  (Fig. 14), se comprenderá que una velocidad de barrido alta puede entregar un resultado que “enmascara” las ondas redox debido a la generación de una corriente de carga mayor (Bard, 2001).

La adición de  $1 \text{ g}$  de grafito granular a las  $508 \text{ h}$  de operación genera un incremento de la intensidad de corriente, que de forma aparente, dado que se mantiene el cálculo de la densidad de corriente con el valor del área nominal del electrodo masivo, se observa como incremento de la densidad de corriente. En estricto rigor, no debiese observarse un cambio de la densidad de corriente, pero dado que se desconoce el nuevo valor de área de electrodo se opta por presentar este resultado aparente.

Es interesante notar que al aumentar el área de electrodo con grafito granular desaparecen los procesos redox asociados al biofilm, probablemente lo que ocurre es, por así decirlo, una “dilución” de los fenómenos redox del biofilm, dado que justamente el grafito granular, que pasa a representar la mayor cantidad de área electródica, no se encuentra colonizado por las bacterias y no ocurren allí dichos procesos. Al comparar los voltagramas de la condición de electrodo biótico con grafito granular a  $508$  y  $526 \text{ h}$  de operación, se aprecia una disminución de la densidad de corriente sin corrimiento de los potenciales de corte ( $i = 0$ ), lo cual se explicaría simplemente por un cambio en la distribución espacial de los gránulos de grafito, logrando en

distintos momentos mayor o menor contacto entre ellos, es decir, mayor o menor área electródica efectiva. La redistribución de los gránulos es efecto de la reposición de electrolito y/o la colocación, al realizar las voltametrías, del electrodo de referencia cerca del electrodo de trabajo, causando cierta agitación del medio.

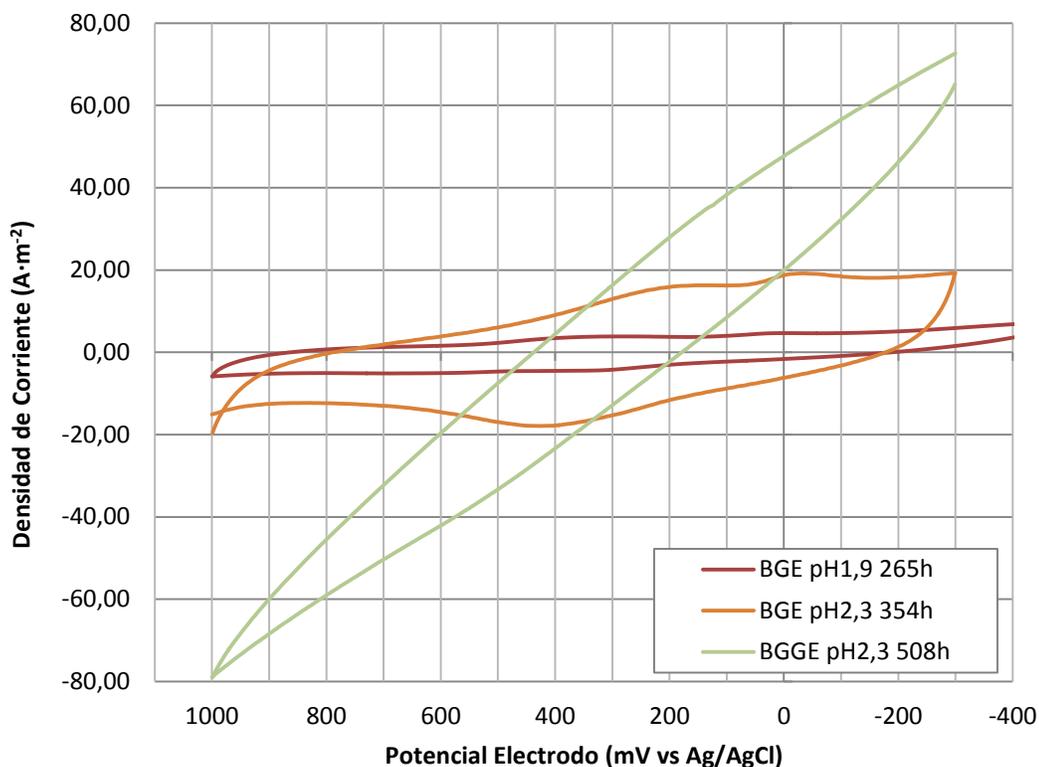


Fig. 16. CV del cátodo entre 265 h y 526 h de operación a  $50 \text{ mVs}^{-1}$

#### 4.2.3 Curvas de polarización y potencia

Las curvas de polarización (o corriente-potencial) se pueden obtener tanto para los electrodos por separados como para el sistema en su conjunto, vale decir, la celda. A fin de caracterizar y determinar la potencia eléctrica máxima que se puede obtener de una determinada celda, es necesaria de partida la obtención de la curva de polarización de la misma. Dicha curva se puede calcular teóricamente si se conocen las curvas de polarización de los electrodos por separado, pero también se puede determinar experimentalmente mediante un sistema de medición en celda de 2 electrodos, utilizando el cátodo de la celda como electrodo de trabajo, y el ánodo como contraelectrodo y electrodo de referencia a la vez. (Logan et al., 2006; Logan, 2008).

Esta última metodología fue la escogida ante la dificultad de obtener una curva de polarización definida para cada electrodo, es decir, las curvas corriente-potencial de los electrodos presentan un fenómeno de histéresis acentuado, a pesar de haber sido obtenidas a muy baja velocidad de barrido ( $\leq 1 \text{ mV/s}$ ), intentando aproximarse a una trayectoria cuasireversible. La histéresis apreciada impide definir una trayectoria única (o al menos promedio con una pequeña desviación) como curva corriente-potencial del electrodo.

En la Fig. 17 se presentan las curvas de polarización y potencia de la celda para dos condiciones distintas. A las 527 h ya se ha añadido 1 g de grafito granular a cada compartimento, y además el catolito contiene 1 g de dicromato de potasio, en este sentido, las curvas presentadas son sólo aparentes puesto que la densidad de corriente se calcula con el valor nominal del área (idéntica) de los electrodos masivos, pues se desconoce el nuevo valor de área electródica resultado de la adición del grafito. A 507 h no hay grafito granular en ningún compartimento y por ende las curvas asociados se suponen reales. Si bien una curvas son aparentes y otras reales, la comparación entre ellas es válida, puesto que se mantiene el mismo valor de área nominal para el cálculo de la densidad de corriente, y las diferencias son reales en términos de la intensidad de corriente registrada. Es decir, si se multiplica la densidad de corriente por el área nominal de cálculo, entonces se recuperan valores reales de intensidad de corriente registrada que mantienen la misma diferencia relativa de la densidad de corriente. Todo esto se traduce en el hecho de constatar que efectivamente se puede obtener mayor potencia del sistema incrementando el área de los electrodos y/o haciendo el potencial del cátodo más positivo, lo cual aumenta la diferencia de potencial disponible.

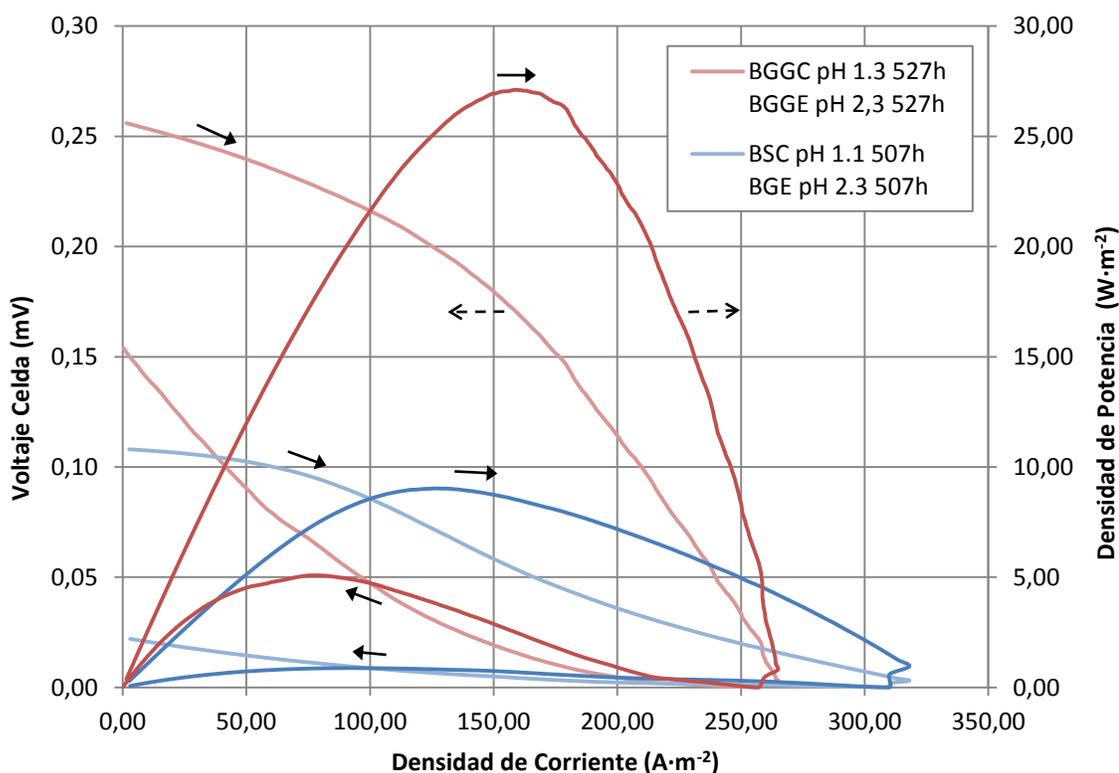


Fig. 17. Curvas de polarización y potencia a 507 h (real) y 527 h (aparente) de operación

La acentuada histéresis vista en el intento de obtener curvas corriente-potencial de los electrodos por separados, reaparece, como sería lógico, en el comportamiento del sistema. En la Fig. 17 se indica mediante flechas el sentido de ida (desde circuito abierto a cortocircuito) y regreso (desde cortocircuito a circuito abierto) en las curvas obtenidas. Una clara diferencia en las trayectorias es lo que se denomina efecto de histéresis, y estaría asociado a procesos redox fuertemente irreversibles.

Los valores de los puntos de potencia máxima (MPP) y densidad de corriente asociados en el sentido de ida (Fig. 17), son sumamente altos comparados con aquellos reportados en la literatura. De acuerdo al *review* de Pant et al. (2010) el máximo valor reportado de potencia para una celda de combustible microbiológica (con sustrato orgánico) es  $\sim 2,7 \text{ W/m}^2$  y la densidad de corriente es  $2,05 \text{ mA/cm}^2$ . Ciertamente uno de los valores obtenidos es simplemente aparente y no demanda mayor discusión, pero el valor real de  $\sim 9 \text{ W/m}^2$  a una densidad de corriente de  $\sim 12,5 \text{ mA/cm}^2$  sin duda representa especial interés. El valor de potencia máxima, de la curva real, a 507 h de operación, en el sentido de regreso es  $87 \text{ mW/m}^2$ , lo cual se encuentra un orden de magnitud más bajo que el promedio de los valores recopilados por Pant et al. (2010).

El hecho que el sistema de celda opere a pHs bastante ácidos y con un sustrato inorgánico simple molecularmente podría explicar la mayor potencia vista en el sentido de ida. Es decir, a pH muy ácido el potencial redox del par  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  es más positivo que a pH neutro ( $1,082 \text{ V}$  vs NHE a pH 2,3 versus  $0,82 \text{ V}$  vs NHE a pH 7 para  $p\text{O}_2=0,2$ ) al cual operan la mayoría de las celdas revisadas por Pant et al. (2010). Si bien en el compartimento anódico el potencial redox de la oxidación de especies inorgánicas parcialmente reducidas de azufre (RISC) es más positivo que aquél de la oxidación de especies orgánicas (ver Sec. 2.1.2), la estructura molecular simple de dichas especies de azufre, tales como tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) y politionatos de cadena corta ( $\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$ ), permitiría eventualmente una cinética oxidativa más rápida y por ende mayor densidad de corriente, lo cual a su vez se traduce en mayor potencia eléctrica.

El problema de la acentuada histéresis observada es la diferencia de cerca de 100 veces entre los valores de máxima potencia en el sentido de ida y regreso. Esto conlleva naturalmente a la pregunta por cuál es el “verdadero” punto de máxima potencia del sistema, en busca de una caracterización definida para eventuales cálculos de escalamiento. Eventualmente al repetir la experiencia y medición a velocidades de barrido aún más bajas ( $\ll 1 \text{ mV/s}$ ) se podría lograr un estado pseudoestacionario que defina valores cercanos de diferencia de potencial y potencia para el sentido de ida y regreso de la medición.

En la Fig. 18 se presenta la curva de polarización y potencia de la celda para 265 h de operación. La manera experimental como se obtuvo difiere de las curvas anteriores (barrido desde  $-0,6$  a  $1$  a  $-0,6 \text{ V}$ , en vez, trayectoria desde potencial de circuito abierto a  $0 \text{ V}$  a potencial de circuito abierto), y probablemente por esta razón las curvas en el sentido de regreso toman valores negativos que se opta por no presentar. De todas formas, cabe notar que la potencia máxima alcanzada es mucho menor que a 507 h de operación, alcanzando tan sólo  $\sim 20 \text{ mW/m}^2$  a  $0,006 \text{ mA/cm}^2$ , por otro lado en cambio, el voltaje de circuito abierto (OCV) es mayor que a 507 y 527 h,  $\sim 0,47 \text{ V}$  vs  $0,15 \text{ V}$  y  $0,26 \text{ V}$  respectivamente.

Asumiendo que dichos valores no contengan un error significativo y representen al menos la tendencia del sistema, es razonable pensar que, durante la adaptación del microorganismo al ambiente anóxico, la disminución del voltaje de la celda se deba a un uso de parte de la fem para el crecimiento y mantención de la bacteria. Es decir, un sobrepotencial asociado al metabolismo de la bacteria. Matemáticamente se puede denotar con la forma de la Ec. 7, en ese caso,  $\Sigma\eta_a$  y  $\Sigma\eta_c$  contendrían términos que crecen a medida que el electrodo es colonizado, y la bacteria comienza a interactuar con éste en el accionar de su cadena de transporte de electrones. A pesar que el voltaje de la celda descienda, la corriente generada aumenta dado

que el número de bacterias sobre el electrodo crece, por así decirlo, aumenta el número de sitios biocatalíticos.

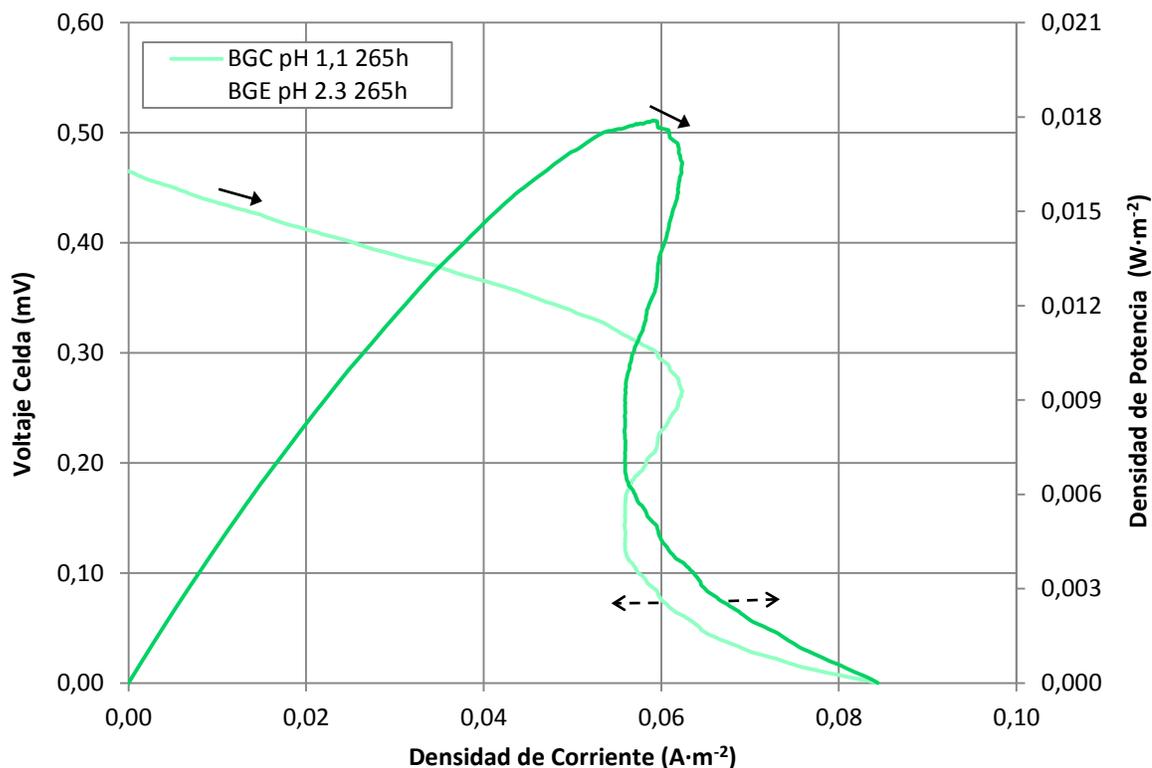


Fig. 18. Curva de polarización y potencia a 265 h de operación

#### 4.2.4 Evolución de potenciales y voltaje

La Fig. 19 muestra medidas del potencial en circuito abierto de los electrodos del compartimento anódico (ánodo) y aeróbico (cátodo), y de la diferencia de potencial de la celda. Los valores de potencial se registraron mediante el electroanalizador, en cambio, para los valores de voltaje se utilizó en algunos casos sólo el multímetro. Si bien el monitoreo de estas variables no fue suficientemente acucioso, y sin duda se requiere la repetición de la experiencia haciendo hincapié en la regularidad de las mediciones, se puede apreciar importantes cambios del voltaje de la celda aparentemente ligados a la formación y electroactividad del biofilm de *At. ferrooxidans*.

Al inicio de la operación la diferencia de potencial de la celda resulta prácticamente despreciable y con signo contrario al esperado,  $\sim -0,04$  V, transcurridas  $\sim 200$  h se aprecia una inversión del voltaje al signo esperado, electrodo en compartimento anódico a potencial más negativo en relación a aquél del compartimento aeróbico, y un aumento de su magnitud,  $\sim 0,07$  V, hasta registrar un máximo de  $\sim 0,2$  V a las 264 h de operación. Tras la adición a 300 h de operación de 1 g  $\text{CaCO}_3$  con consecuente aumento de pH y eventual inhibición y/o decaimiento de las bacterias, en el biofilm y en suspensión, se registra nuevamente una diferencia de potencial muy pequeña y de signo contrario al esperado de  $-0,002$  V; tras un restablecimiento del pH a 1,6 con ácido sulfúrico, y posterior cambio del anolito por un medio de cultivo de  $\sim 552$

h', se registra un valor de voltaje cercano a 0,12 V pero que vuelve a caer 24 h más tarde a ~ 0,02 V. Nuevamente a ~500 h se recupera un voltaje cercano a 0,12 V.

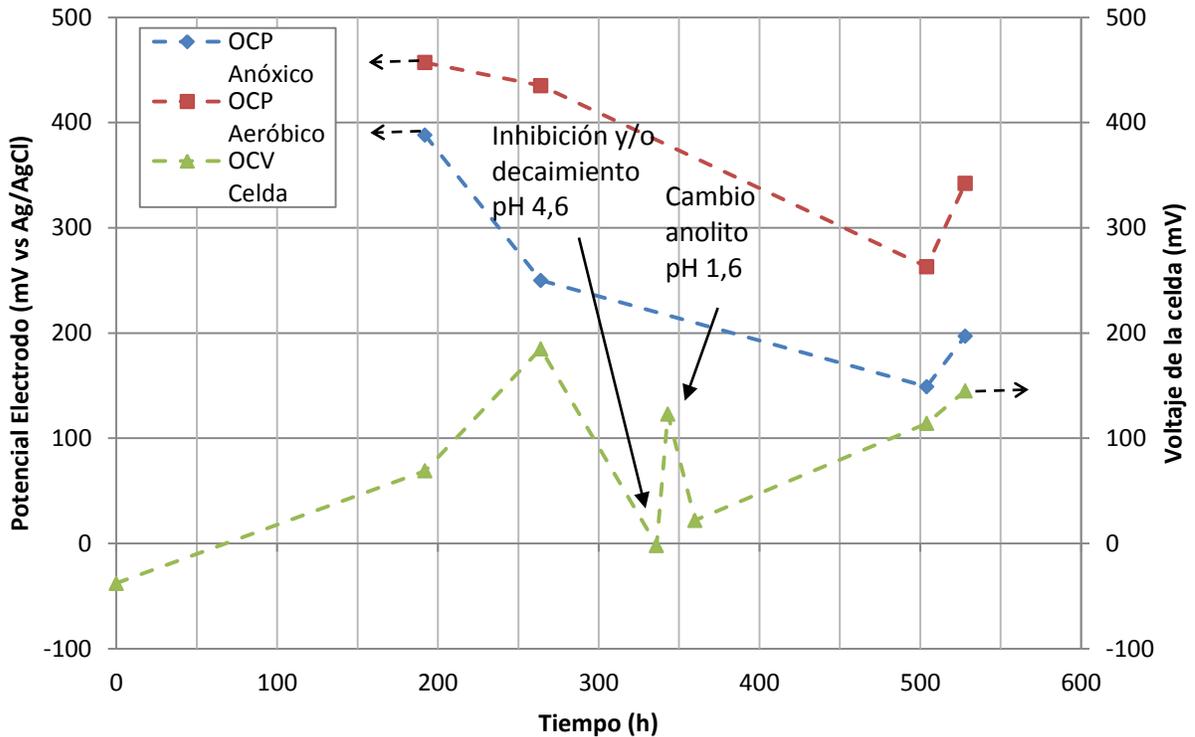
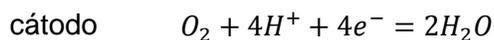
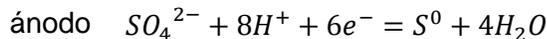


Fig. 19. Evolución de los potenciales de electrodo y voltaje de la celda en el tiempo

#### 4.2.5 Eficiencia energética y rendimiento

Dado que la intensidad de corriente (o voltaje de la celda en circuito cerrado) del sistema no fue monitoreada durante el curso de la operación, no es posible calcular la eficiencia energética exacta de este sistema fed-batch, biopila. No obstante, asumiendo que se tratase de una operación en continuo, celda de combustible, entonces en base a los valores puntuales de voltaje registrados y asumiendo una determinada eficiencia coulombica, para el caso  $\epsilon_{cb} = 1$ , se puede calcular la eficiencia energética de la operación, así como el rendimiento del combustible en términos de kWh por unidad de kg de azufre elemental (ver Sec. 2.1.5).

Suponiendo que los procesos redox del compartimento anódico y aeróbico se pueden representar por las siguientes semireacciones:



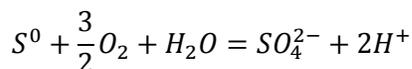
usando la ecuación de Nerst con los valores de las condiciones experimentales de pH, e imponiendo  $[SO_4^{2-}] = 10\text{mM}$ , se determina la fem máxima de la celda ( $OCV_{teo}$ ) en relación a la cual se calcula la eficiencia energética (respecto de la energía libre de Gibbs) según la Ec. 21. El rendimiento del combustible se calcula según la Ec. 16 suponiendo también una eficiencia coulombica igual a 1. Además, considerando un valor referencial del precio de azufre elemental de 10 USD / ton  $S^0$  se determina un precio para el kWh generado.

**Tabla 5. Voltaje de la celda, rendimiento del combustible, costo del kWh generado y eficiencia energética de la operación**

	Voltaje V	Rendimiento kWh/kgS <sup>0</sup>	Costo ¢USD/kWh	Eficiencia $\epsilon_G$
OCV <sub>teo</sub>	0.86	4.31	2.32	100%
OCV <sub>exp</sub>	0.46	2.30	4.35	53%
V <sub>MPP</sub>	0.13	0.64	15.6	15%

El valor de OCV<sub>teo</sub> presentado en la Tabla 5 corresponde a aquel de la fem teórica de una celda definida por las reacciones postuladas; el valor de OCV<sub>exp</sub> es la mayor diferencia de potencial en circuito abierto efectivamente medida durante la operación de la celda prototipo; el valor de V<sub>MPP</sub> corresponde al voltaje de la celda en el punto real de máxima potencia a ~9 W/m<sup>2</sup> registrado a 507 h de operación.

Para efectos de comparación de la eficiencia energética con una operación termoeléctrica, es decir, una transformación que involucra combustión molecular, máquina térmica y generador, se debiese considerar la eficiencia energética respecto de la entalpía de la reacción  $\epsilon_H$ . En el caso que la operación de la celda sea continua, celda de combustible propiamente, bastará ponderar la eficiencia energética respecto de la energía libre de Gibbs  $\epsilon_G$  por el factor  $\left(\frac{-\Delta G}{\Delta H}\right)_{comb}$  donde  $\Delta G$  y  $\Delta H$  son los cambios de energía libre de Gibbs y entalpía de la reacción neta que define la celda, a condiciones de operación determinadas, es decir, de:



## V Conclusiones y Perspectiva

---

### 5.1 Conclusiones

Se construyó una celda de combustible microbiológica (MFC) con sustrato inorgánico, a escala de laboratorio, de doble cámara anóxico-aeróbico, y operada como sistema *fed-batch* (biopila), utilizando azufre elemental como combustible y *Acidithiobacillus ferrooxidans* como biocatalizador. La operación de la celda confirmó la viabilidad de generar bioelectricidad a partir de compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC).

Al inicio de la operación el voltaje de la celda resultó muy cercano a cero. Transcurrido un lapso de 200 h se registró un voltaje de circuito abierto ( $OCV_{exp}$ ) de 0,19 V; a 265 h de operación se obtuvo un desempeño de 17 mW/m<sup>2</sup> como punto de máxima potencia (MPP) con un voltaje de circuito abierto de 0,46 V; a 507 h de operación hubo un aumento de la potencia máxima a ~9 W/m<sup>2</sup> y  $OCV_{exp}$  igual a 0.108 V. El rendimiento teórico máximo del combustible es 4,31 kWh/kgS<sup>0</sup>, no obstante en las condiciones experimentales se calculó un rendimiento < 0,64 kWh/kgS<sup>0</sup>.

Se observó un proceso de aparente adaptación anodofílica (ánodo como aceptor terminal de electrones) y formación de biofilms electroactivos de *At. ferrooxidans*. Una serie característica de ondas redox apareció en los voltagramas de los electrodos en condición biótica, donde los picos de densidad de corriente de las ondas características aumentan con el tiempo de crecimiento del biofilm y/o la edad del medio de cultivo. Esto sugiere una capacidad electroactiva del biofilm capaz de catalizar, probablemente, la oxidación de RISCs como tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), tetrionato (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) y otros politionatos (S<sub>N</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), compuestos producidos por el metabolismo bacteriano en crecimiento con azufre elemental. Se constató también la posibilidad de inhibir la electroactividad del biofilm mediante un aumento de pH, y su reaparición al restablecer un pH bajo adecuado para la bacteria acidófila.

La capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* para crecer usando un ánodo directamente como aceptor terminal de electrones no queda totalmente clara. No obstante, así lo sugiere el incremento en el tiempo de los picos de corriente de las ondas características del biofilm durante la operación de la celda prototipo, al encontrarse la bacteria en un ambiente que carece de cualquier aceptor de electrones conocido para *At. ferrooxidans*, es decir, carente al menos de O<sub>2</sub> y Fe<sup>3+</sup>. Este resultado representaría una cualidad novedosa de este microorganismo que, a conocimiento del autor, no ha sido reportado en la literatura.

### 5.2 Proyecciones

Los usos más evidentes de una tecnología de MFC como la planteada en este trabajo son aquellos ya mencionados, no obstante, los fenómenos de formación de biofilms electroactivos podrían ser de utilidad para el diseño de sensores de actividad microbiológica, en este caso de *At. ferrooxidans*, cuestión que puede ser aplicada a la predicción de la generación de aguas ácidas de mina o el control de pilas de biolixiviación convencionales.

Respecto a la generación de bioelectricidad con material de botaderos o relave como combustible, una estimación a *grasso modo* da cuenta que por 1 ton de cobre fino producido se debe disponer de ~ 600 ton de desechos mineros (Villas-Bôas y Sanchez, 2006), suponiendo

que sólo la mitad de este material contenga una alta cantidad de RISCs como piritita, pirrotita y otros, entonces se pueden extraer del orden de cientos de MWh de energía eléctrica por ton de Cu fino mediante su oxidación en una MFC.

Los resultados obtenidos de la operación de la celda confirman la posibilidad de generar bioelectricidad a partir de la energía libre de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC), concretamente, a partir de la oxidación biocatalizada de azufre elemental. Esta evidencia experimental podría conducir al rediseño de procesos metalúrgicos a fin de aprovechar dicha energía libre para generar electricidad, usando celdas de combustible microbiológicas en procesos como biolixiviación de menas de sulfuros metálicos electrogeneradora, o generación de bioelectricidad a partir de material de botaderos o relaves ricos en RISCs. Esta última alternativa representa una revalorización de los residuos de la minería, al transformarlos en combustible para la generación de bioelectricidad.

La oxidación bacteriana de sulfuros metálicos produce azufre elemental (Hansford y Vargas, 2001), y su oxidación como fuente de energía para la celda de combustible microbiológica debiese comportarse de la manera ya observada en este trabajo, pero los iones metálicos en el anolito o el metabolismo de un consorcio bacteriano podría cambiar drásticamente el comportamiento del sistema.

Para resolver el problema de la generación de ácido sulfúrico como parte de la operación de una celda de combustible microbiológica alimentada con RISCs, se propone una integración tecnológica, donde otra MFC utilizando bacterias reductoras de sulfatos actúe como operación de bioremediación a la vez que generan electricidad a partir de materia orgánica. Esta alternativa es al menos termodinámicamente posible (ver Sec. 2.1.5). Se puede imaginar un sistema que oxida glucosa, producida por degradación de celulosa por ejemplo, en un compartimento anóxico con bacterias electroactivas heterótrofas; y que reduce sulfato en otro compartimento anóxico con bacterias sulfato reductora electroactivas.

### **5.3 Recomendaciones**

El valor de este trabajo es la propuesta de innovación que plantea y la exploración de la misma. Justamente por esta naturaleza de carácter exploratorio demanda que toda la experiencia sea reproducida, procurando un mejor monitoreo de las variables del sistema, a la vez que se aseguran las condiciones de operaciones deseadas. El error sistemático o aleatorio durante la marcha experimental puede ser reducido mediante la planificación detallada de la misma.

Muchas son las ramas de investigaciones del sistema de celda propuesta. Explicar en profundidad la aparición de las ondas redox características del biofilm, la generación de voltaje en la celda, comprobar si existe efectivamente una adaptación anodofílica de *At. ferrooxidans*, identificar las especies electroactivas generadas por el metabolismo bacteriano y su rol como posibles mediadores en la interacción con el ánodo. Evaluar la generación de bioelectricidad, caracterizando adecuadamente el desempeño de la celda en cuanto a potencia eléctrica, y el arreglo de celdas en series y paralelo para aumentar voltaje e intensidad de corriente, comprender los fenómenos de acentuada histéresis vistos en la obtención de las curvas de polarización. Experimentar efectivamente con el uso de sulfuros metálicos como combustibles, igualmente con otras cepas de bacterias oxidantes del azufre y hierro en monocultivo o cultivo mixto. Operar el sistema en continuo y comparar el consumo energético de bombas versus la

generación del sistema, para así determinar la forma óptima de extraer la energía libre de los combustibles RISC (sistema continuo o discontinuo).

Las posibilidades de generar mayor conocimiento respecto de los sistemas bioelectroquímicos, así como la potencial aplicabilidad de estos fenómenos para la generación de bioelectricidad con desechos mineros, llaman fuertemente la atención y estimulan a continuar la investigación en esta línea. En el corto plazo se recomienda la reproducción de la experiencia con miras a la publicación de sus resultados; en el mediano plazo, la construcción de un piloto a mayor escala es la única opción para evaluar de forma certera el potencial de bioelectricidad, a fin de esclarecer la exactitud de los elevados valores de potencia eléctrica generable hallados en esta experiencia ( $9 \text{ Wm}^{-2}$ ).

## Referencias Bibliográficas

- Aelterman, P., Rabaey, K., Hai The Pham, Boon, N., and Verstraete, W. (2006). Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology* 40, 3388–3394.
- Allegretti, P., Furlong, J., and Donati, E. (2006). The role of higher polythionates in the reduction of chromium(VI) by *Acidithiobacillus* and *Thiobacillus* cultures. *Journal of Biotechnology* 122, 55–61.
- Bard, A. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (New York: Wiley).
- Bhavaraju, S.S.R., Modak, J.M., Kumar, R., and Gandhi, K. (1993). Dissolution of Sulphur Particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: Substrate for Unattached Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 612–616.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* 295, 483–485.
- Boudghene, A., and Traversa, E. (2002). Fuel cells, an alternative to standard sources of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 6, 295–304.
- Bredberg, K., Karlsson, H.T., and Holst, O. (2004). Reduction of vanadium(V) with *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Bioresource Technology* 92, 93–96.
- Bretschger, O., Obratsova, A., Sturm, C.A., Chang, I.S., Gorby, Y.A., Reed, S.B., Culley, D.E., Reardon, C.L., Barua, S., Romine, M.F., et al. (2007). Current Production and Metal Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 Wild Type and Mutants. *Appl Environ Microbiol* 73, 7003–7012.
- Chaudhuri, S.K., and Lovley, D.R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229–1232.
- Diaz, P. (2007). Estudio de la actividad oxidativa y crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de ión ferroso en presencia de carbón activado. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* 25, 464–482.
- Dutta, P., Rabaey, K., Yuan, Z., and Keller, J. (2008). Spontaneous electrochemical removal of aqueous sulfide. *Water Research* 42, 4965–4975.
- Franks, A.E., and Nevin, K.P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies* 3, 899–919.
- Gargarello, R.M., Di Gregorio, D., Huck, H., Fernandez Niello, J., and Curutchet, G. (2010). Reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 104, 529–532.
- Hansford, G., and Vargas, T. (2001). Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. *Hydrometallurgy* 59, 135–145.
- ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2007). Microbial Fuel Cell Operation with Continuous Biological Ferrous Iron Oxidation of the Catholyte. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4130–4134.
- ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., de Wilde, V., Rozendal, R.A., and Buisman, C.J.N. (2006). A Bipolar Membrane Combined with Ferric Iron Reduction as an Efficient Cathode System in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5200–5205.
- Holmes, D.E., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004). Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and Graphite Electrodes. *Appl Environ Microbiol* 70, 1234–1237.
- INE (2009). *Energía Eléctrica, Informe Anual 2008* (Santiago, Chile: Instituto Nacional de Estadísticas).

- Jung, S., and Regan, J.M. (2007). Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 393–402.
- Keller, J., and Rabaey, K. (2008). Experiences from MFC pilot plant operation (Penn State University, USA).
- Kim, B.H., Chang, I.S., and Gadd, G.M. (2007). Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 485–494.
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., and Kim, B.H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 145–152.
- Liu, H., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005). Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5488–5493.
- Logan, B. (2008). *Microbial fuel cells* (Wiley-Interscience).
- Logan, B., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., and Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181–5192.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006a). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology* 14, 512–518.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006b). Microbial fuel cells--challenges and applications. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5172–5180.
- Lovley, D.R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263–290.
- Lovley, D.R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 564–571.
- Meruane, G. (2002). Oxidación Bacteriana de Sulfato Ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado en Ingeniería mención Química. Universidad de Chile.
- Miller, L.G., and Oremland, R.S. (2008). Electricity generation by anaerobic bacteria and anoxic sediments from hypersaline soda lakes. *Extremophiles* 12, 837–848.
- Min, B., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research* 39, 1675–1686.
- Min, B., and Logan, B. (2004). Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5809–5814.
- Oh, S., Min, B., and Logan, B.E. (2004). Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol* 38, 4900–4904.
- Oh, S.-E., and Logan, B.E. (2005). Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 162–169.
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., and Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology* 101, 1533–1543.
- Pronk, J.T., de Bruyn, J.C., Bos, P., and Kuenen, J.G. (1992). Anaerobic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2227–2230.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., et al. (2006). Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83, 263–272.
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., and Verstraete, W. (2005). Tubular Microbial Fuel Cells for Efficient Electricity Generation. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8077–8082.

- Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., and Verstraete, W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* 25, 1531–1535.
- Rabaey, K. et al., 2006. Microbial Fuel Cells for Sulfide Removal†. *Environmental Science & Technology*, 40(17), págs.5218-5224.
- Rawlings, D.E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* 4, 13.
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Fertig, S., and Wang, W. (2000). Harvesting Energy from the Marine Sediment–Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* 35, 192–195.
- Rittmann, B.E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 203–212.
- Scott, K., Cotlarciuc, I., Hall, D., Lakeman, J.B., and Browning, D. (2008). Power from marine sediment fuel cells: the influence of anode material. *Journal of Applied Electrochemistry* 38, 1313–1319.
- Sugio, T., Tsujita, Y., Inagaki, K., and Tano, T. (1990). Reduction of Cupric Ions with Elemental Sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 693–696.
- Sugio, T., Tsujita, Y., Katagiri, T., Inagaki, K., and Tano, T. (1988). Reduction of Mo<sup>6+</sup> with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 170, 5956–5959.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 97–105.
- US DoE (2009). FCT Fuel Cells: Fuel Cells for Transportation.
- Villas-Bôas, R., and Sanchez, M. (2006). Clean Technologies for the Mining Industry (CYTED-CETEM).
- Watanabe, K. (2008). Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 528–536.
- Watling, H.R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review. *Hydrometallurgy* 84, 81–108.
- Xiao, L., Fang, Z., Qiu, G., and Liu, J. (2007). Electro-generative mechanism for simultaneous leaching of pyrite and MnO<sub>2</sub> in presence of *A. ferrooxidans*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 17, 1373–1378.
- Xiao, L., Liu, J., Fang, Z., and Qiu, G. (2008). Mechanism of electro-generating leaching of chalcopyrite-MnO<sub>2</sub> in presence of *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18, 1458–1462.
- You, S., Zhao, Q., Zhang, J., Jiang, J., and Zhao, S. (2006). A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor. *Journal of Power Sources* 162, 1409–1415.
- Zhdanov, S.I. (1975). Sulfur. En Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements, A.J. Bard, (New York, Basel: Marcel Dekker), pp. 273–360.
- Zuo, Y., Xing, D., Regan, J.M., and Logan, B.E. (2008). Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3130–3137.

## Apéndice A: Fotografías de la celda y electrodos



Fig. 20. Fotografía de la celda prototipo recién montada

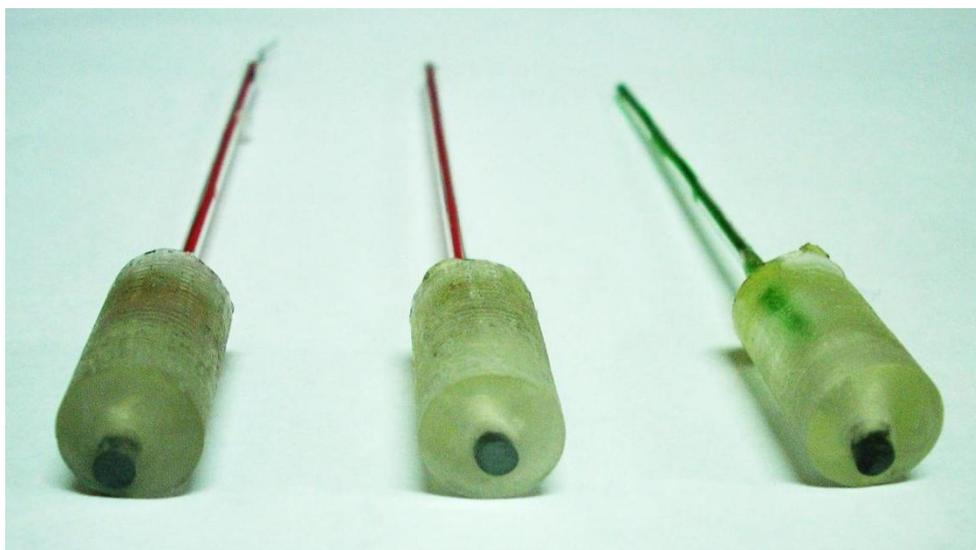


Fig. 21. Electrodos usados para el crecimiento controlado de biofilms de *At. ferrooxidans* en cultivos aeróbico creciendo con  $S^0$  como fuente de energía