



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

DISEÑO DEL ÁNODO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIOLÓGICA PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENERGÍA A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

FRANCISCO GABRIEL ULLOA ÁVILA

PROFESORA GUÍA:  
MELANIE COLET LAGRILLE

MIEMBRO DE LA COMISIÓN:  
ÁLVARO OLIVERA NAPPA  
FELIPE DÍAZ ALVARADO

SANTIAGO DE CHILE  
2017

## DISEÑO DEL ÁNODO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIOLÓGICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES

El tratamiento de aguas residuales es uno de los procesos más importantes que se deben realizar para cuidar el medio ambiente. El principal objetivo de este tratamiento es permitir la disposición de estos efluentes, tanto domésticos como industriales, asegurando que estos no pongan en peligro la salud humana o causen daños inaceptables al medio ambiente.

Sin embargo, este proceso tiene un alto costo energético, alcanzando un consumo de entre 560 y 2.300 GWh por año. Es por esto que hoy en día se buscan procesos alternativos para disminuir el gasto energético de estos tratamientos. Una de las alternativas que han surgido son las celdas de combustible microbiológicas, estos dispositivos son celdas electroquímicas que tienen la particularidad de utilizar microorganismos como catalizadores en el proceso de oxidación y/o reducción. El gran potencial de estos sistemas radica en la enorme variedad de microorganismos existentes, ya que, gracias a su metabolismo, abren la posibilidad de degradar diversos compuestos orgánicos presentes en aguas residuales y usarlos como combustibles.

Bajo este contexto, el objetivo general de este trabajo de memoria de título fue diseñar, fabricar y caracterizar el ánodo de una celda de combustible microbiológica para la producción de energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos presentes en aguas residuales.

Para cumplir con este objetivo, se utilizó el carbono vítreo reticular como material para la construcción de los ánodos utilizados en el estudio. Al calcular el área superficial del material y su conductividad eléctrica, éstas resultaron ser  $70 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y  $1,11 \cdot 10^4 \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$ , respectivamente. Estos valores lo hacen adecuado para su uso como electrodo en sistemas bioelectroquímicos.

Con el fin de caracterizar el desempeño electroquímico del ánodo y la electroactividad de éste, se realizaron voltametrías cíclicas e impedancias de espectroscopía electroquímica en dos esquemas experimentales: uno con el ánodo inoculado con la bacteria *Acidiphilium cryptum* y el otro utilizando un electrodo que fue previamente cultivado con el mismo microorganismo. Las voltametrías cíclicas mostraron que en ambos casos, al tener una mayor concentración de bacterias en la celda, la corriente aumentaba.

Por otra parte, las impedancias de espectroscopía electroquímica arrojaron que los microorganismos causaron un aumento de la resistencia, tanto en el electrodo, como en la solución de la cámara anódica. Al complementar estos resultados con los de las voltametrías cíclicas, se notó que la actividad catalítica que muestra el microorganismo utilizado tiene un efecto mayor sobre la producción de corriente que el aumento de las resistencias del sistema que causa.

En base a los resultados obtenidos a lo largo del estudio, se concluye que la bacteria *Acidiphilium cryptum* genera un aumento de corriente al ser utilizada en el ánodo de una celda de combustible microbiológica. En vista de lo anterior, se recomienda comenzar con el estudio del cátodo a utilizar, con el fin de realizar una caracterización electroquímica general del sistema.



*Para mis Padres, Patricia y Héctor  
y para quienes partieron cuando este camino recién comenzaba, abuelo Héctor y tía Mirtha*

# Agradecimientos

A mis papás, por siempre haber estado ahí para mí, por todo el cariño y confianza que me dieron y el apoyo constante que sentí de ellos en todas las decisiones que tome durante todo este proceso y mi vida en general. También agradecer a mis hermanos porque, a pesar de no hablar tanto, siempre estamos preocupados de cómo está el otro o cómo le estará yendo.

A los profesores que conocí en mi paso por esta universidad. En primer lugar a Melanie, estaré eternamente agradecido por la confianza que depositó en mí, en primer lugar, al ser su auxiliar y luego como su memorista. Sin duda este difícil trabajo no se podría haber llevado a cabo sin su constante ayuda, motivación y apoyo. Igualmente agradecer al profesor Álvaro por siempre haberme dado de su tiempo para resolver mis dudas y orientarme sobre cómo continuar con el trabajo. Por último, agradecer a la profesora Blanca por haberme escogido como su auxiliar en sus distintos ramos, y por su constante preocupación acerca de mí y mi trabajo.

A las grandes personas que conocí en estos años de universidad. En primer lugar a mis Chicocos, Tati, Tamara, Vale, Lore, Sev, Fede, Felits y Lucho, agradecer todo el cariño, risas, estrés, viajes, salidas y muchas otras cosas que compartimos durante todo este tiempo, espero de corazón que sigamos así por mucho tiempo más. También agradecer a Joaco, por ser un increíble amigo en el que siempre podré confiar, gracias por todas las conversaciones y enseñanzas que me has dejado a lo largo de estos 6 años. Por otro lado agradecer a mi grupo de taller Trisus, Nacho y Juan, por enseñarme lo que es el trabajo en equipo, por hacer agradable trabajar en ese ramo y por mantenernos unidos, a pesar de las distancias que nos separan. También agradecer a los amigos que conocí mediante la docencia en IQBT, en particular a Marcelo por siempre haber apañado en todos los proyectos que lo invité a participar y llevamos a cabo trabajando juntos. Y también a los alumnos que tuve, que se terminaron transformando en amigos, Panchi, Nico, Cheko, Nefta y Gabi.

A los integrantes del GIE, Sergio y Matías, con quienes pasé el último tiempo de este trabajo. Gracias por todas las conversaciones, risas y buenos ratos que pasamos en esa oficina, y por todo el café consumido. También agradecer a los integrantes del laboratorio, Fran, Jaque, Mabel, Carla, Evelyn, Kathy, Pato, Roberto, Isaac y Mamani por hacer más agradable todo el trabajo ahí.

Por último, agradecer a una persona que fue fundamental para terminar este trabajo, la que siempre estuvo ahí para apoyarme, que lograba darme esperanza y fuerza para continuar con el trabajo, a pesar de que yo no veía por dónde este trabajo podría dar frutos, y que se mantuvo siempre a mi lado a pesar de todo. Constanza, muchísimas gracias por todo el amor, compañía y soporte que me has entregado durante estos años, espero que podamos seguir creciendo juntos y cumpliendo nuestras metas y sueños.

# Tabla de contenido

<b>Índice de tablas</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Panorama energético . . . . .	1
1.2. Tratamiento de aguas residuales . . . . .	2
1.3. Energía consumida en el tratamiento de aguas residuales . . . . .	4
1.4. Celdas de combustible . . . . .	5
1.5. Celdas de combustible microbiológicas . . . . .	8
1.6. Objetivo general . . . . .	9
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>10</b>
2.1. Fundamentos de electroquímica . . . . .	10
2.1.1. Termodinámica de una reacción electroquímica: ecuación de Nernst . . . . .	10
2.1.2. Concepto de sobrepotencial y generación de corriente en un sistema . . . . .	11
2.2. Metabolismo y crecimiento microbiológico . . . . .	12
2.2.1. Metabolismo microbiano . . . . .	12
2.2.2. Crecimiento microbiano . . . . .	13
2.2.3. Fases del crecimiento microbiano . . . . .	15
<b>3. Antecedentes bibliográficos</b>	<b>17</b>
3.1. Microorganismos utilizados en celdas de combustible microbiológicas y su mecanismo de transferencia de electrones . . . . .	17
3.2. Combustibles utilizados en las CCMs . . . . .	18
3.3. Materiales utilizados en la fabricación de ánodos de CCMs . . . . .	19
3.4. Materiales utilizados como cátodos de CCMs . . . . .	21
3.5. Recapitulación y objetivos específicos . . . . .	22
<b>4. Metodología</b>	<b>23</b>
4.1. Preparación de soluciones . . . . .	23
4.1.1. Medio de cultivo para <i>Acidiphilium cryptum</i> . . . . .	23
4.1.2. Medio de cultivo para <i>Acidiphilium cryptum</i> con ion férrico . . . . .	24
4.1.3. Buffer fosfato pH 4 . . . . .	24
4.1.4. Solución para hidratación de membrana Nafion <sup>®</sup> 117 . . . . .	25
4.2. Preparación de electrodos . . . . .	25
4.2.1. Conductividad del CVR . . . . .	26

4.2.2.	Construcción del electrodo . . . . .	27
4.2.3.	Limpieza del electrodo . . . . .	27
4.3.	Cultivos microbiológicos . . . . .	28
4.3.1.	Cultivo de <i>Acidiphilium cryptum</i> en matraz Erlenmeyer . . . . .	28
4.3.2.	Cultivos de <i>Acidiphilium cryptum</i> en tubos Falcon® . . . . .	29
4.3.3.	Curva de crecimiento microbiano con recuento al microscopio . . . . .	30
4.3.4.	Curva de crecimiento microbiano con densidad óptica . . . . .	30
4.4.	Montaje experimental . . . . .	31
4.4.1.	Celda electroquímica utilizada . . . . .	31
4.4.2.	Hidratación membrana Nafion® 117 . . . . .	31
4.4.3.	Armado de la celda . . . . .	32
4.4.4.	Mediciones electroquímicas con bacterias en solución . . . . .	33
4.4.5.	Mediciones electroquímicas con bacterias en electrodo . . . . .	34
4.5.	Técnicas utilizadas . . . . .	36
4.5.1.	Método de las cuatro puntas (conductividad de un material) . . . . .	36
4.5.2.	Recuento directo al microscopio (concentración de microorganismos) . . . . .	37
4.5.3.	Densidad óptica (concentración de microorganismos) . . . . .	39
4.5.4.	Voltametría cíclica . . . . .	39
4.5.5.	Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) . . . . .	40
4.5.6.	Microscopia electrónica de barrido . . . . .	41
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusiones</b>	<b>42</b>
5.1.	Diseño de celda electroquímica utilizada . . . . .	42
5.2.	Diseño del electrodo de trabajo . . . . .	43
5.3.	Cultivos microbiológicos . . . . .	44
5.4.	Determinación de parámetros para voltametrías cíclicas . . . . .	48
5.5.	Mediciones electroquímicas con bacterias en solución . . . . .	50
5.6.	Mediciones electroquímicas con bacterias adheridas al electrodo de trabajo . . . . .	55
5.7.	Micrografías a electrodos con bacterias adheridas . . . . .	58
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>60</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>62</b>
	<b>Anexos</b>	<b>66</b>
<b>A.</b>	<b>Voltametrías con barrido entre -0,5 y 1,5 V</b>	<b>67</b>
<b>B.</b>	<b>EIE a celda con bacterias en solución, ajuste al modelo 1</b>	<b>69</b>
<b>C.</b>	<b>EIE a celda con bacterias en solución, ajuste al modelo 2</b>	<b>71</b>
<b>D.</b>	<b>EIE a celda con bacterias adheridas al electrodo, primer caso</b>	<b>73</b>
<b>E.</b>	<b>EIE a celda con bacterias adheridas al electrodo, segundo caso</b>	<b>76</b>

# Índice de tablas

1.1. Tipos de celdas de combustible . . . . .	8
3.1. Sustratos utilizados en celdas de combustible microbiológicas . . . . .	20
4.1. Reactivos medio de cultivo <i>Ac. cryptum</i> . . . . .	23
4.2. Reactivos medio de cultivo <i>Ac. cryptum</i> con ion férrico . . . . .	24
4.3. Reactivos para la preparación de buffer fosfato . . . . .	25
4.4. Reactivos para solución de hidratación de membrana . . . . .	25
4.5. Volumen y factor de cada cuadro en la cámara Neubauer . . . . .	38
5.1. Resultados del ajuste al modelo 1 . . . . .	53
5.2. Resultados del ajuste al modelo 2 . . . . .	54
5.3. Resultados del ajuste al modelo 2, primer caso . . . . .	56
5.4. Resultados del ajuste al modelo 2, segundo caso . . . . .	58

# Índice de figuras

1.1.	Distribución matriz energética chilena . . . . .	1
1.2.	Distribución de fuentes de energía en Chile . . . . .	2
1.3.	Lugar de descarga de efluentes de plantas de tratamiento en Chile . . . . .	3
1.4.	Diagrama general del proceso de tratamiento de aguas residuales . . . . .	4
1.5.	Distribución porcentual de energía contenida en aguas residuales . . . . .	5
1.6.	Esquema básico de una celda de combustible . . . . .	6
1.7.	Esquema del funcionamiento de una celda de combustible de hidrógeno (CCH) . . . . .	8
1.8.	Esquema básico de una celda de combustible microbológica . . . . .	9
2.1.	Crecimiento exponencial de un microorganismo . . . . .	14
2.2.	Curva de crecimiento de un microorganismo . . . . .	15
3.1.	Mecanismos de transferencia de electrones de forma: (a) directa y (b) indirecta . . . . .	18
4.1.	Conexiones utilizadas para el método de las cuatro puntas . . . . .	26
4.2.	Esquema del electrodo de trabajo utilizado . . . . .	27
4.3.	Celda utilizada en los experimentos electroquímicos . . . . .	32
4.4.	Montaje de la celda para los experimentos electroquímicos . . . . .	35
4.5.	Rejilla de la cámara de Neubauer . . . . .	38
4.6.	Gráficos obtenidos desde una voltametría cíclica . . . . .	39
4.7.	Gráficos obtenidos desde una espectroscopia de impedancia electroquímica . . . . .	40
5.1.	Esquema de la celda electroquímica utilizada en el estudio . . . . .	42
5.2.	Imágenes de MEB al carbono vítreo reticular . . . . .	45
5.3.	Curvas de potencial vs corriente obtenidas con configuraciones AB-CD y BC-DA . . . . .	46
5.4.	Curvas de crecimiento de <i>Ac. cryptum</i> utilizando: (a) recuento directo, y (b) densidad óptica . . . . .	47
5.5.	Curvas de crecimiento de <i>Ac. cryptum</i> con y sin mediador determinadas utilizando el método de densidad óptica . . . . .	47
5.6.	Voltamograma con inóculo de bacterias a distintos tiempos de crecimiento . . . . .	48
5.7.	Voltamograma con inóculo de 7 horas de crecimiento . . . . .	49
5.8.	Voltametrías realizadas con el nuevo rango de potenciales . . . . .	50
5.9.	Voltametrías cíclicas con inóculos a distintos tiempos de crecimiento . . . . .	51
5.10.	Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 4 horas de crecimiento . . . . .	52
5.11.	Circuito equivalente modelo 1 . . . . .	52
5.12.	Ajuste del modelo 1 a los datos experimentales . . . . .	52
5.13.	Circuito equivalente modelo 2 . . . . .	53

5.14. Ajuste de los modelos 1 y 2 a los datos experimentales obtenidos con un inóculo de 4 horas . . . . .	54
5.15. Voltametrías cíclicas utilizando electrodos de trabajo con bacterias adheridas, primer caso . . . . .	55
5.16. Voltametrías cíclicas utilizando electrodos de trabajo con bacterias adheridas, segundo caso . . . . .	57
5.17. Imágenes MEB a electrodos de trabajo con 4 horas de crecimiento . . . . .	59
5.18. Imágenes MEB a electrodos de trabajo con 4 y 6 horas de crecimiento . . . . .	59
A.1. Voltamograma con inóculo de 0 horas de crecimiento . . . . .	67
A.2. Voltamograma con inóculo de 3 horas de crecimiento . . . . .	68
A.3. Voltamograma con inóculo de 25 horas de crecimiento . . . . .	68
B.1. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 0 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1 . . . . .	69
B.2. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 6 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1 . . . . .	70
B.3. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 8 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1 . . . . .	70
C.1. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 0 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2 . . . . .	71
C.2. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 6 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2 . . . . .	72
C.3. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 8 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2 . . . . .	72
D.1. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo sin bacterias, con ajuste del modelo 2 . . . . .	73
D.2. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 4 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	74
D.3. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 6 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	74
D.4. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 8 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	75
E.1. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo sin bacterias, con ajuste del modelo 2 . . . . .	76
E.2. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 4 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	77
E.3. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 6 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	77
E.4. Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 8 horas, con ajuste del modelo 2 . . . . .	78

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Panorama energético

Al mes de febrero de 2016 Chile registró una capacidad instalada de 20.713 MW, de la cual el 99 % fue aportado entre el Sistema Interconectado Central (SIC) y el Sistema Interconectado del Norte Grande (SING). El 1 % restante se generó a partir de los Sistemas Eléctricos de Aysén (SEA), Magallanes (SEM), Isla de Pascua y Los Lagos. En la Figura 1.1 se muestra la distribución de capacidad de cada sistema [1].

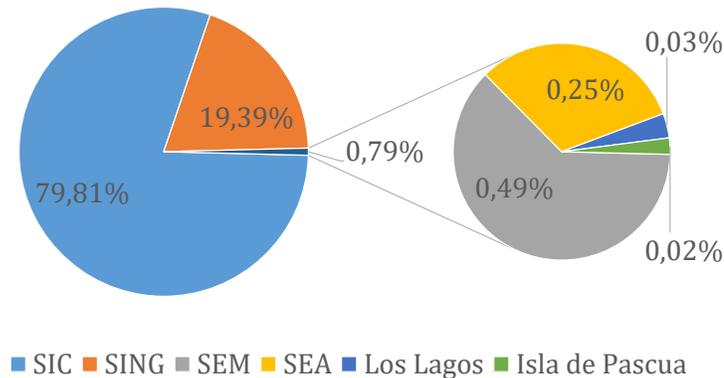


Figura 1.1: Distribución matriz energética chilena [1]

Esta energía es producida a partir de diversas fuentes, las cuales pueden ser clasificadas en tres grupos: plantas termoeléctricas, plantas hidroeléctricas convencionales y ERNC; en la Figura 1.2 se aprecia la distribución porcentual de los procesos de generación de energía eléctrica en Chile. Se observa que cerca del 45 % proviene de plantas termoeléctricas, las cuales son una de las principales fuentes de emisión de gases de efecto invernadero [1].

Esto hace notar la necesidad de buscar otras fuentes de energía, las cuales sean menos contaminantes y renovables. En esto aparecen las energías renovables no convencionales (ERNC) como una gran alternativa; entre ellas se puede encontrar la energía eólica, hidráulica y solar, entre otras [2].

Otra alternativa posible para generar energía son las celdas de combustible, dispositivos capaces de transformar la energía química de las reacciones en energía eléctrica [3].

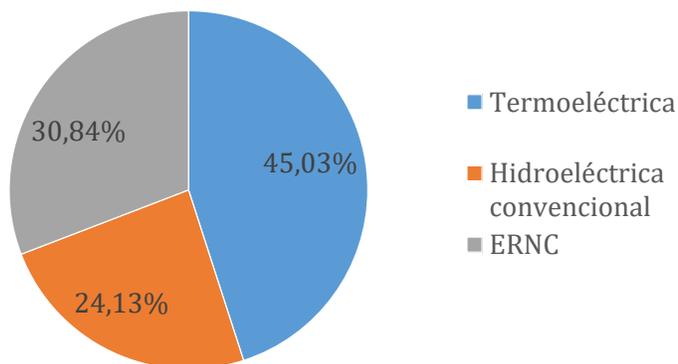


Figura 1.2: Distribución de fuentes de energía en Chile [1]

## 1.2. Tratamiento de aguas residuales

Desde hace muchos años, una de las preocupaciones principales de las personas es el cuidado del medio ambiente. Uno de los procesos más importantes asociado a este tema es el tratamiento de aguas residuales, las cuales pueden ser clasificadas, de acuerdo a su origen, como sigue [4]:

- Efluentes domésticos, considerando aguas grises y negras.
- Aguas de establecimientos comerciales u otras instituciones.
- Efluentes industriales.
- Efluentes de agricultura, horticultura y acuicultura.
- Combinación de los efluentes listados anteriormente.

El principal objetivo del tratamiento es permitir la disposición de estos efluentes, tanto humanos como industriales, asegurando que estos no pongan en peligro la salud humana o causen daños inaceptables al medio ambiente. Por lo tanto, estos deben cumplir con ciertos estándares según lo que se quiera hacer con ellos luego del proceso [5].

En Chile, la mayor parte de los efluentes tratados en las plantas son dispuestos en cuerpos de agua superficiales (como se puede ver en la Figura 1.3), por lo que los parámetros controlados dentro del proceso —los cuales son tanto características físicas, químicas como biológicas— y sus límites máximos están descritos en el Decreto Supremo N°90 para descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua superficiales [6] [7].

Una de las características controladas de mayor importancia en el proceso es la materia orgánica presente en el efluente de la planta, ya que una alta carga orgánica puede producir malos olores y crecimiento de microorganismos dentro del agua. Generalmente, este parámetro es evaluado con la demanda bioquímica de oxígeno —o  $DBO_5$ — la cual representa la cantidad de oxígeno requerido

para llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica biodegradable por medio de una oxidación aeróbica bacteriana [8].

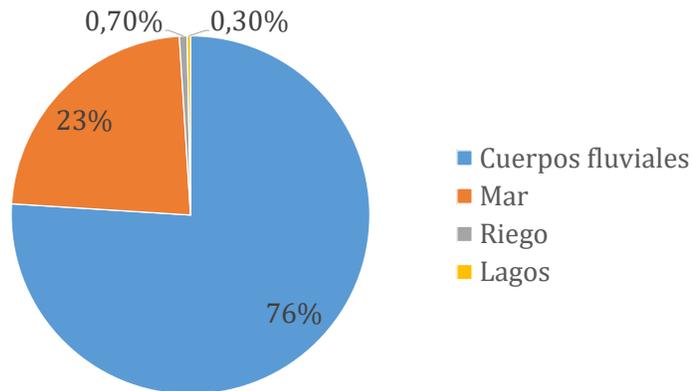


Figura 1.3: Lugar de descarga de efluentes de plantas de tratamiento en Chile [6]

Un tratamiento convencional de aguas residuales consiste en una combinación de operaciones (y procesos) tanto físicos, químicos como biológicos, que tienen como finalidad la remoción de sólidos, materia orgánica y nutrientes que estén presentes en estas corrientes. En términos generales, este proceso puede dividirse en distintas secciones o niveles de tratamiento, los cuales comúnmente se denominan como preliminar, primario, secundario y terciario o avanzado. Usualmente, a estos procesos se añade una etapa final de desinfección, donde se busca eliminar microorganismos patógenos que puedan existir luego de las etapas antes mencionadas. En la Figura 1.4 se puede ver un diagrama general del proceso [5].

En el tratamiento preliminar se eliminan los sólidos o materiales de gran tamaño que puedan venir en el agua sin tratar; de esta forma, se puede asegurar el correcto funcionamiento y mantenimiento de las siguientes etapas. Posteriormente, en el tratamiento primario se tiene como objetivo la remoción de sólidos sedimentables -tanto orgánicos como inorgánicos- mediante sedimentación, también se utiliza la flotación para la eliminación de otros materiales. En este nivel del tratamiento se elimina entre un 25 y un 50 % de la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), además, cerca del 60 % de los sólidos totales suspendidos y un 65 % de los aceites y grasas [5].

En el siguiente nivel de tratamiento, tratamiento secundario, se elimina la mayoría de los residuos orgánicos y los sólidos suspendidos presentes en el agua. En la mayoría de los casos, el tratamiento secundario sigue al primario y para disminuir la carga orgánica se utilizan microorganismos aeróbicos (principalmente bacterias), los cuales mediante su metabolismo son capaces de oxidar los compuestos orgánicos y generar otras especies como  $CO_2$ ,  $NH_3$  o  $H_2O$  [5].

La mayoría de las plantas de tratamiento de aguas instaladas en Chile trabaja con la tecnología de lodos activados [6]. En este proceso se utiliza un tanque, en donde se encuentra el agua a tratar junto con los microorganismos, el cual es aireado con el objetivo de mezclar vigorosamente el contenido y, además, suplementar el oxígeno a las bacterias, el cual es usado como sustrato para que éstas lleven a cabo la oxidación de la materia orgánica. Estos tanques pueden tener un tiempo de residencia entre 3 a 8 horas, pero puede ser mayor dependiendo de la carga orgánica presente en el afluente [5].

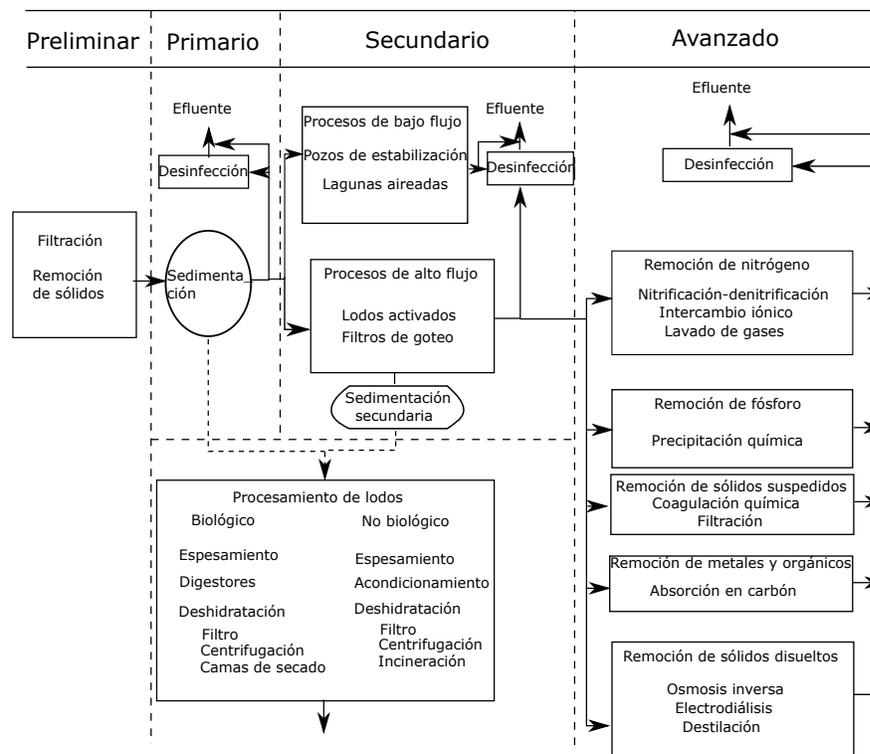


Figura 1.4: Diagrama general del proceso de tratamiento de aguas residuales. Adaptado de [5]

Luego del tanque aeróbico se encuentra un sedimentador en el cual se separa el líquido clarificado, el que continúa el tratamiento, de los lodos biológicos (o activados). Una fracción de estos lodos es recirculada al tanque aeróbico con el fin de mantener constante la concentración de microorganismos, mientras que lo restante es sometido a un tratamiento de lodos o es dispuesto de forma segura. Al terminar esta sección del tratamiento la  $DBO_5$  ya habrá sido disminuida en cerca de un 85 % del valor original [5].

Una vez clarificado, el efluente del sedimentador ingresa al tratamiento terciario. En esta etapa del tratamiento se busca eliminar contaminantes específicos que no pudieron ser eliminados en etapas previas, tales como nitrógeno, fósforo o metales pesados. Finalmente, en la etapa de desinfección se adiciona cloro en concentraciones de entre 5 y 15  $mg\ l^{-1}$  dependiendo del agua a tratar. También es posible utilizar ozono o radiación ultravioleta, aunque estos dos tratamientos no son comúnmente usados, ya que su eficiencia tiene una alta dependencia de las características del afluente a tratar, y además, estos procesos no dejan un remanente en el efluente, por lo que es posible que se produzca crecimiento de microorganismos luego del tratamiento. [5, 9]

### 1.3. Energía consumida en el tratamiento de aguas residuales

Actualmente, el sistema de alcantarillado de Chile alcanza una cobertura del 96,65 %, y del volumen total de aguas residuales recolectadas el 99,93 % es tratado en las 283 plantas de tratamientos operativas a lo largo de Chile [6].

En estas plantas, en el año 2013, se alcanzó un volumen de 1.119 millones de metros cúbicos tratados, lo que involucra un consumo energético de entre 560 y 2.300 GWh, del cual una parte mayoritaria corresponde al tratamiento secundario. La energía utilizada durante el tratamiento corresponde a entre un 1% y 3% de la energía total consumida en Chile durante ese año. Sin embargo, el agua tratada en las plantas puede contener entre 3 a 10 veces la energía necesaria para su tratamiento [10–12].

Esta energía puede estar presente en 3 formas distintas: materia orgánica ( $\sim 1,79 \text{ kWh m}^{-3}$ ); elementos nutricionales, tales como nitrógeno y fósforo ( $\sim 0,7 \text{ kWh m}^{-3}$ ); y por último, como energía térmica ( $\sim 7 \text{ kWh m}^{-3}$ ). Logrando extraer esta energía presente en las aguas residuales sería posible reducir la energía consumida durante el tratamiento, transformar el proceso a uno energéticamente independiente o en un proceso de generación de energía. En la Figura 1.5 se presenta la distribución porcentual de la energía contenida en las aguas residuales [11].

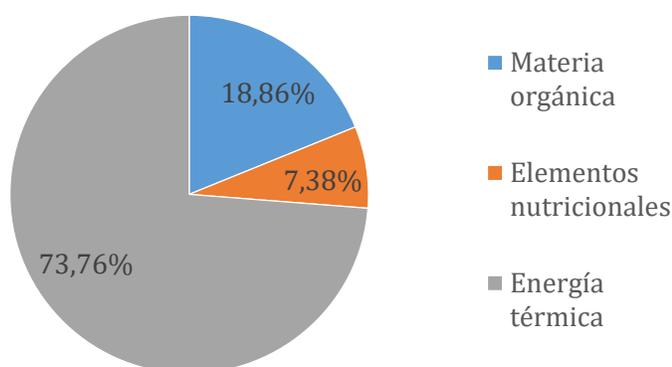


Figura 1.5: Distribución porcentual de energía contenida en aguas residuales [11]

## 1.4. Celdas de combustible

Una forma de poder utilizar la materia orgánica presente en las aguas residuales como una fuente de energía es mediante la tecnología de las celdas de combustible, las cuales son dispositivos electroquímicos capaces de transformar la energía química de las reacciones en energía eléctrica.

La estructura de una celda de combustible básica consta de 3 partes principales, las cuales se muestran en la Figura 1.6. En primer lugar, se tiene el ánodo de la celda, electrodo sobre el cual ocurre la oxidación del combustible mediante la cual se obtienen los electrones que fluyen a través del sistema y generan la corriente de la celda. En la Reacción 1.1 se puede ver la reacción ocurrida en el ánodo, donde  $R_{ox}$  representa a una especie oxidada y  $R_{red}$  a una especie reducida [3]:



El segundo componente de esta celda es el cátodo, electrodo que recibe los electrones desde el ánodo, los que son utilizados para llevar a cabo la reducción de otro compuesto, tal como se muestra en la Reacción 1.2:



Por último, el tercer componente de estas celdas es el electrolito, el cual permite el intercambio de iones entre ambos electrodos [3].

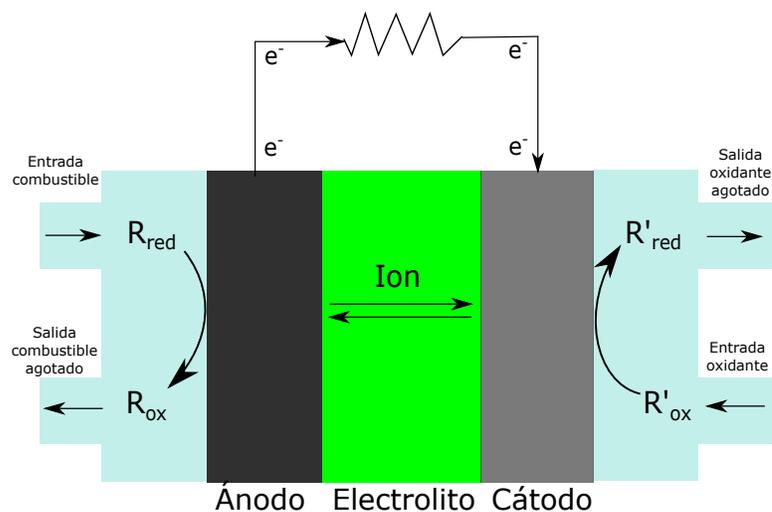


Figura 1.6: Esquema básico de una celda de combustible

A lo largo del tiempo se han desarrollado distintos tipos de celdas de combustible, las cuales pueden diferenciarse en el combustible utilizado, ion intercambiado, temperatura de operación, entre otros. En general, se habla de 5 tipos de celdas de combustible, las cuales usualmente reciben su nombre por el combustible o electrolito que utilizan. A continuación se da una breve descripción de cada uno de estos tipos [3] [13]:

1. **Celda de combustible de electrolito polimérico:** Esta celda (también llamada celda de combustible de membrana de intercambio protónico) consiste en una membrana polimérica con conductividad protónica, usualmente NAFION 1135, 115 o 117, como electrolito, y tanto el ánodo como el cátodo usualmente son de platino soportado sobre un carbón con alta área superficial. En términos operacionales, esta celda utiliza generalmente H<sub>2</sub> como combustible, reducen O<sub>2</sub> en el cátodo y tienen una temperatura de funcionamiento de entre 0 y 100 °C. Debido a su rápido encendido y apagado, entre otros beneficios, esta celda tiene un amplio mercado entre los cuales se incluye el abastecimiento de energía en zonas remotas y su uso en distintos tipos de medios de transporte, entre los que se encuentran autos, buses, camiones y submarinos.
2. **Celda de combustible alcalina:** Este modelo de celda de combustible fue uno de los primeros que se desarrollaron y fueron usadas en diversas misiones espaciales de Estados Unidos con el fin de proveer energía eléctrica y agua caliente con estos dispositivos. Para su funcionamiento, estas celdas utilizan una solución de KOH como electrolito, en concentraciones entre 35 y 85 %p/p dependiendo de la temperatura a la cual se opere, la que puede variar entre 50 y 200 °C. Una de las ventajas que tiene este tipo de celda es que no se necesitan metales preciosos como catalizador, por lo que se pueden utilizar materiales de menor costo para construir los electrodos, los cuales son de níquel principalmente. Sin embargo, esta celda tiene una gran

desventaja ya que el sistema presenta una significativa degradación ante la presencia de  $\text{CO}_2$ , por lo que se debe procurar que el combustible o el flujo de oxidante no contengan este gas.

3. **Celda de combustible de ácido fosfórico:** El electrolito utilizado en esta celda, tal como lo dice su nombre, es ácido fosfórico concentrado, el cual es contenido en una matriz compuesta de teflón y carburo de silicio. Los electrodos utilizados en estos sistemas son de carbón, el que tiene una carga entre  $0,2-0,3 \text{ mg cm}^{-2}$  de platino. Para asegurar una buena conductividad protónica del electrolito, esta celda opera a una temperatura cercana a los  $215 \text{ }^\circ\text{C}$ , a la cual el ácido utilizado es estable. Una de las ventajas de la temperatura de operación utilizada es que se reduce la posibilidad del envenenamiento del platino causada por el  $\text{CO}$ , lo que incrementa el tiempo de vida del dispositivo hasta cerca de 9 años. La mayoría de las celdas de ácido fosfórico están diseñadas para operar en plantas combinadas de calor y potencia, pudiendo generar desde 250 kW hasta 1 MW de potencia.
4. **Celda de combustible de carbonato fundido:** Tal como lo dice su nombre, esta celda utiliza como electrolito una mezcla de carbonato de litio y potasio o sodio contenido en una matriz cerámica porosa de  $\text{LiAlO}_2$ . Esta celda trabaja a una temperatura entre  $600$  y  $800 \text{ }^\circ\text{C}$ , para su operación se utiliza generalmente un cátodo de litio poroso dopado con  $\text{NiO}$  y un ánodo poroso de  $\text{Ni}$  o una aleación de  $\text{Ni/Cr}$  con un porcentaje de cromo entre 2 y 10 % p/p. Al comparar esta celda con otras de alta temperatura (como las de óxido sólido) el costo de fabricación es bajo, sin embargo, la densidad de potencia obtenida con estos sistemas es menor (entre  $120$  y  $160 \text{ mW cm}^{-2}$ ). Debido a esto y su alta temperatura de operación, este tipo de celda se utiliza generalmente en estaciones de generación de calor y potencia obteniendo entre 250 kW y 1 MW.
5. **Celda de combustible de óxido sólido:** Este último tipo de celda se compone de un electrolito sólido que tenga la capacidad de conducir iones óxido ( $\text{O}^{2-}$ ). Uno de los materiales utilizados es la zirconia dopada con entre un 3 a 10 % molar de  $\text{Y}_2\text{O}_3$ . El ánodo utilizado generalmente es una cerámica de  $\text{Ni/YSZ}$  o  $\text{Co/YSZ}$ , mientras que el cátodo puede ser del mismo material del electrolito y manganato dopado con lantanoestroncio ( $(\text{LaSr})\text{MnO}_3$ ). El electrolito utilizado presenta una baja conductividad iónica a bajas temperaturas, es por esto que estos dispositivos operan a altas temperaturas, las que pueden variar entre  $600$  y  $1.000 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por esto último, el costo de construcción de estas celdas es alto, ya que se debe trabajar con materiales que soporten estas temperaturas. Sin embargo, la densidad de potencia generada es superior a las obtenidas con otras celdas de alta temperatura (se generan entre  $400$  y  $500 \text{ mW cm}^{-2}$ ).

En la Tabla 1.1 se presenta un resumen del ion intercambiado en cada tipo de celda descrito y su temperatura de operación, donde se pueden diferenciar las celdas de baja temperatura (electrolito polimérico, alcalina y ácido fosfórico) de las de alta temperatura (carbonato fundido y óxido sólido) [3].

Para el funcionamiento de estas celdas se ha planteado el uso de diversos combustibles: etanol, metanol, gas natural o diesel son algunos ejemplos de estos. El combustible más importante que puede ser utilizado es el hidrógeno, el cual presenta diversos beneficios, ya que puede ser producido de forma renovable (o sustentable) mediante el uso de celdas fotoelectroquímicas, las cuales no causan emisiones de gases que puedan ser contaminantes para el medio ambiente.

Una vez el combustible es producido, este ingresa a una celda de combustible de hidrógeno (o CCH, por su sigla), la cual es una celda de combustible de membrana de intercambio protónico. Como se mencionó anteriormente, estas celdas utilizan electrodos de platino soportado en un carbón

Tabla 1.1: Tipos de celdas de combustible

Tipo de celda	Ion intercambiado en el electrolito	Temperatura de operación
Electrolito polimérico	$H^+$	0-100 °C
Alcalina	$OH^-$	50-200 °C
Ácido fosfórico	$H^+$	160-220 °C
Carbonato fundido	$CO_3^{2-}$	600-800 °C
Óxido sólido	$O^{2-}$	600-1.000 °C

de alta área superficial, donde se llevan a cabo las reacciones de este sistema. En el ánodo se lleva a cabo la oxidación del hidrógeno gaseoso (Reacción 1.3), mientras que en el cátodo ocurre la generación de agua por medio de la reducción del oxígeno (Reacción 1.4). En la Figura 1.7 se puede ver un esquema general de una CCH.

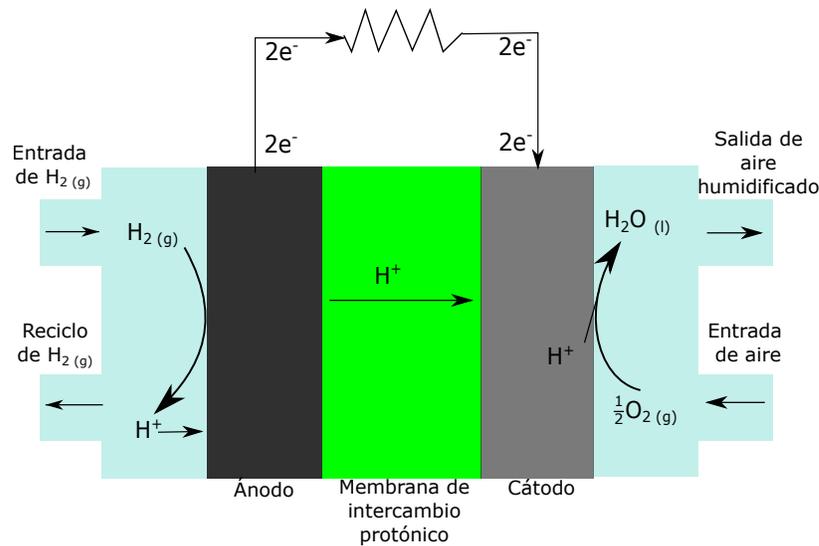
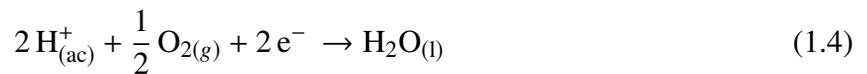
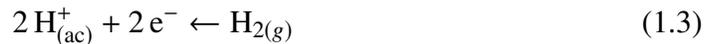


Figura 1.7: Esquema del funcionamiento de una celda de combustible de hidrógeno (CCH)

## 1.5. Celdas de combustible microbiológicas

Dentro de las celdas de combustible de baja temperatura, existe un subtipo de celdas que actualmente se encuentra en etapa de investigación y desarrollo: las celdas de combustible biológicas; las cuales a su vez pueden ser divididas en dos tipos: las celdas de combustible microbiológicas y las celdas de combustible enzimáticas. [3].

Las celdas de combustible microbiológicas son dispositivos en los cuales se utilizan microorganismos (generalmente bacterias), los que actúan como catalizador en la reacción de oxidación del combustible -el cual puede ser orgánico o inorgánico- y utilizan electrodos sólidos como receptores de electrones<sup>1</sup>. Estas celdas operan en un medio líquido y se utiliza una membrana de intercambio protónico para separar los fluidos del lado anódico con los del lado catódico [14] [15].

Este tipo de celda generalmente opera a temperatura ambiente y con soluciones neutras. En el lado anódico se alimenta el combustible, el cual en el caso de ser un orgánico se oxida generando  $\text{CO}_2$  y protones. En el lado catódico se alimenta aire para así suministrar oxígeno el cual reacciona con los protones transportados a través de la membrana y los electrones del cátodo para formar agua, tal como se muestra en la Reacción 1.4. En la Figura 1.8 se muestra un esquema básico de una celda de combustible microbiológica [15].

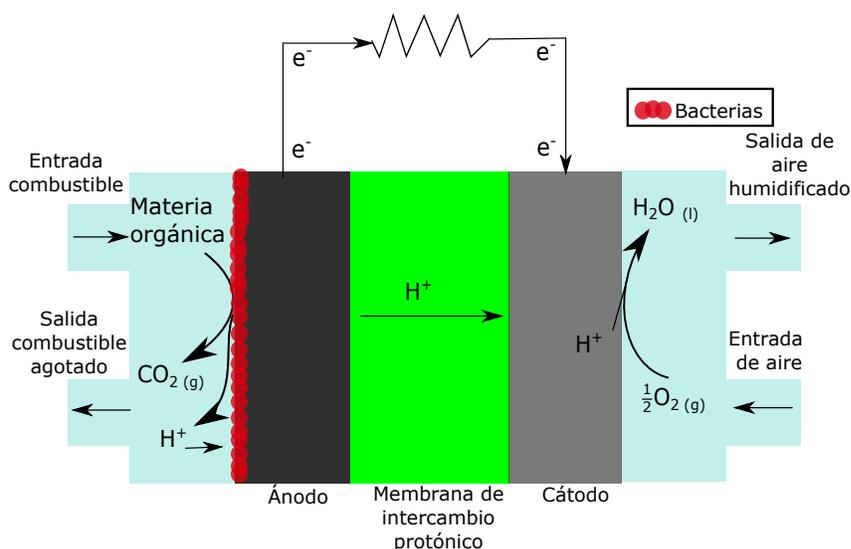


Figura 1.8: Esquema básico de una celda de combustible microbiológica

El gran potencial de estas celdas radica en la enorme diversidad de microorganismos existentes, ya que —gracias a sus variados metabolismos— abre la posibilidad al uso de diversos combustibles. Además, es posible usar cultivos mixtos de microorganismos para así utilizar la mayor cantidad de compuestos presentes en el flujo de combustible de la celda [16].

## 1.6. Objetivo general

El principal objetivo de este trabajo de memoria es diseñar, fabricar y caracterizar el ánodo de una celda de combustible microbiológica para la producción de energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos presentes en aguas residuales.

<sup>1</sup>Las celdas de combustible enzimáticas tienen las mismas características que la microbiológica, a excepción del catalizador utilizado en el ánodo y/o cátodo, el cual es una o varias enzimas.

# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Fundamentos de electroquímica

#### 2.1.1. Termodinámica de una reacción electroquímica: ecuación de Nernst

La electroquímica se encarga de estudiar la relación entre la energía eléctrica y las reacciones químicas, por lo que para entenderla se deben entender algunos conceptos básicos de la termodinámica de una reacción.

Cuando un sistema está a una temperatura constante, el potencial de una reacción química se puede determinar a partir de la energía libre de Gibbs mediante la Ecuación 2.1:

$$E = \frac{-\Delta G}{n \cdot F} \quad (2.1)$$

donde  $E$  es el potencial de oxidoreducción de la reacción,  $\Delta G$  es su energía libre de Gibbs,  $n$  es el número de electrones intercambiados y  $F$  es la constante de Faraday ( $96.485 \text{ C (mol-eq)}^{-1}$ ). La energía libre de Gibbs es una función definida para determinar la espontaneidad de una reacción en un sistema a temperatura y presión constantes. Esta función se puede calcular mediante la entropía y entalpía de reacción, o mediante la Ecuación 2.2:

$$\Delta G = \sum \left( G_g^o \cdot \nu_g \right)_{\text{productos}} - \sum \left( G_j^o \cdot \nu_j \right)_{\text{reactantes}} + R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{\prod a_g^{\nu_g}}{\prod a_j^{\nu_j}} \right) \quad (2.2)$$

donde  $G^o$  corresponde a la energía libre de Gibbs estándar de los compuestos de la reacción,  $\nu$  es el coeficiente estequiométrico de los compuestos,  $R$  es la constante universal de los gases ( $8,314 \text{ J (mol K)}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura y  $a$  es la actividad de los compuestos. Los subíndices  $g$  y  $j$  se refieren a los productos y reactantes, respectivamente [17].

Sabiendo que la energía libre de Gibbs estándar de una reacción ( $\Delta G^o$ ) y su potencial estándar

( $E^o$ ) se definen como:

$$\Delta G^o = \sum \left( G_g^o \cdot \nu_g \right)_{\text{productos}} - \sum \left( G_j^o \cdot \nu_j \right)_{\text{reactantes}} \quad (2.3)$$

$$E^o = \frac{-\Delta G^o}{n \cdot F} \quad (2.4)$$

y utilizando las expresiones 2.1 y 2.2, se obtiene la ecuación de Nernst (Ecuación 2.5), la cual relaciona el potencial de una reacción química con su potencial estándar y la actividad de sus especies electroactivas, en un sistema en el cual no existe un flujo externo de corriente [17].

$$E = E^o - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \left( \frac{\prod a_g^{\nu_g}}{\prod a_j^{\nu_j}} \right) \quad (2.5)$$

La actividad de una especie química es adimensional y depende del estado de agregación en que se encuentre la especie en el sistema, tal como se detalla a continuación [17]:

- Cuando la especie se encuentra disuelta, la actividad de una especie  $i$  se aproxima a su concentración molar  $C_i$ .
- En el caso que la especie sea un gas, la actividad se aproxima a su presión parcial  $P_i$ .
- Por último, cuando la especie  $i$  es un líquido o sólido, la actividad se aproxima a 1.

Así por ejemplo, el potencial de Nernst de la reducción de oxígeno (Reacción 1.4) en una celda de combustible de hidrógeno se puede determinar de la siguiente forma:

$$E = E^o - \frac{R \cdot T}{2 \cdot F} \cdot \ln \left( \frac{1}{[H^+]^2 \cdot P_{O_2}^{0.5}} \right) \quad (2.6)$$

### 2.1.2. Concepto de sobrepotencial y generación de corriente en un sistema

Para explicar el concepto de sobrepotencial, se tomará una reacción genérica con ambas especies disueltas en la cual, mediante la transferencia de un electrón, la especie A se reduce a la especie B, reacción que tiene un potencial de equilibrio  $E_{AB}$ :



Al aplicar un potencial  $E$  sobre un electrodo se generará un sobrepotencial ( $\eta$ ) definido como [18]:

$$\eta = E - E_{AB} \quad (2.8)$$

El valor del sobrepotencial definirá el sentido en que ocurrirá la reacción 2.7 sobre el electrodo en el cual es aplicado el potencial. Al analizar el sobrepotencial se pueden presentar 3 casos distintos [18]:

- En el caso de que  $\eta > 0$  se producirá la reacción anódica, por lo que se favorecerá la oxidación de B. Por convención la corriente anódica es positiva.
- Cuando  $\eta < 0$  se produce la reacción catódica, es decir, se favorecerá la reducción de A. Por convención, estas reacciones producen una corriente negativa.
- Por último, cuando  $\eta = 0$  no se producirá corriente en el sistema.

La magnitud del sobrepotencial del sistema también tendrá un efecto sobre la densidad de corriente generada en éste. La Expresión 2.9, conocida como ecuación corriente-sobrepotencial, muestra la relación que existe entre el sobrepotencial y la densidad de corriente del sistema:

$$j = j_0 \cdot \left[ \frac{C_B^S}{C_B} \cdot \exp\left(\frac{\alpha_a \cdot n \cdot F \cdot \eta}{R \cdot T}\right) - \frac{C_A^S}{C_A} \cdot \exp\left(\frac{-\alpha_c \cdot n \cdot F \cdot \eta}{R \cdot T}\right) \right] \quad (2.9)$$

donde  $j$  corresponde a la densidad de corriente generada,  $j_0$  es la densidad de corriente de intercambio,  $C_B^S$  y  $C_B$  corresponden a la concentración de B en la superficie del electrodo y el seno del electrolito, respectivamente,  $\alpha_a$  y  $\alpha_c$  son los coeficientes de transferencia de carga anódico y catódico, respectivamente, y  $C_A^S$  y  $C_A$  corresponden a la concentración de A en la superficie del electrodo y el seno del electrolito, respectivamente [17].

## 2.2. Metabolismo y crecimiento microbiológico

### 2.2.1. Metabolismo microbiano

El metabolismo de un microorganismo se define como una actividad celular coordinada, en la que muchos sistemas multienzimáticos (o rutas metabólicas) cooperan con el propósito de cumplir cuatro objetivos, los que se listan a continuación [19]:

- Obtener energía química a partir de energía solar o degradando nutrientes ricos en energía, los que son obtenidos del ambiente.
- Convertir moléculas de nutrientes en las moléculas características de la propia célula, incluyendo los precursores de macromoléculas.
- Polimerizar los precursores monoméricos en macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos o polisacáridos.
- Sintetizar y degradar biomoléculas para funciones celulares especializadas, tales como los lípidos de membrana, mensajeros intracelulares y pigmentos.

Según la forma química en la que los microorganismos obtienen carbono del medio, estos pueden dividirse en dos grupos: autótrofos y heterótrofos. Los organismos autótrofos utilizan el dióxido de carbono presente en la atmosfera como única fuente de carbono, con la que sintetizan todas sus biomoléculas carbonadas. Por otro lado, los heterótrofos no tienen la capacidad de utilizar el dióxido de carbono, por lo que deben obtener el carbono desde moléculas orgánicas relativamente complejas como glucosa, por ejemplo [19].

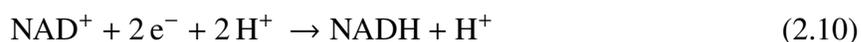
El metabolismo que envuelve todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, las que construyen las rutas metabólicas. Dentro de estas rutas pueden ocurrir dos tipos de procesos: el catabolismo y el anabolismo [19].

El catabolismo es la fase en donde las moléculas de nutrientes orgánicos son degradadas a productos de menor tamaño y más sencillos, como ácido láctico,  $\text{CO}_2$  o  $\text{NH}_3$ . Estas reacciones liberan energía, parte de ésta se utiliza para la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa y el resto se pierde en forma de calor. Durante el catabolismo también se generan especies transportadoras de electrones reducidas, tales como NADH, NADPH o  $\text{FADH}_2$  [19].

Por otro lado, en el anabolismo se produce la biosíntesis de moléculas de mayor tamaño, como lípidos, polisacáridos o proteínas, a partir especies más pequeñas. Para llevar a cabo estas reacciones se necesita energía, la que se obtiene a partir de la hidrólisis del ATP sintetizado con la energía generada en las reacciones catabólicas. Durante este proceso también se utiliza el poder reductor del NADH, NADPH y  $\text{FADH}_2$  [19].

Las enzimas que catalizan las oxidaciones que ocurren al interior de la célula son capaces de canalizar los electrones desde diversos sustratos a solo unos cuantos tipos de transportadores universales de electrones, entre los que se pueden encontrar el nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$  en su forma oxidada) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$  en su forma oxidada). Estos compuestos son coenzimas hidrosolubles que son constantemente oxidadas y reducidas en muchas de las reacciones de transferencia de electrones del metabolismo.

Cuando ocurre la reducción de estas coenzimas, el sustrato oxidado cede 2 protones y dos electrones, mientras que los transportadores de electrones aceptan 2 electrones y un protón, transformándose a su forma reducida (NADH o NADPH). En las ecuaciones 2.10 y 2.11 se muestran las semireacciones de reducción de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , respectivamente [19, 20].



En muchas células la proporción entre  $\text{NAD}^+$  y NADH es alta, por lo que se favorece la reducción de este compuesto, mientras que la relación entre  $\text{NADP}^+$  y NADPH es baja, por lo que en este caso se favorece la oxidación. Existen algunas enzimas que pueden utilizar cualquiera de estos dos transportadores de electrones, sin embargo, la mayoría de éstas tienen preferencia más por una que otra. Esto hace notar la importancia de tener un aceptor final de electrones en la célula, ya que de no existir, la proporción entre las coenzimas reducidas y oxidadas aumentaría y esto provocaría que el metabolismo de la bacteria disminuyera o se detuviera [19, 20].

## 2.2.2. Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se define como el aumento del número de células presentes en un cultivo microbiológico. Durante el crecimiento, un microorganismo se divide para generar 2 nuevas

células, el tiempo que demora este proceso es conocido como el tiempo de duplicación. Este parámetro dependerá del microorganismo utilizado y las condiciones de cultivo en las cuales se encuentre (su temperatura y la composición del medio de cultivo) [20].

En la Figura 2.1 se muestra la cantidad de microorganismos en el tiempo de un cultivo comenzado con una bacteria, la cual tiene un tiempo de duplicación de 30 minutos. Este patrón de aumento de población microbiana, donde el número aumenta al doble durante intervalos constantes de tiempo se denomina crecimiento exponencial. Como se ve en la imagen, cuando se grafica la concentración de microorganismos en función del tiempo, se obtiene una curva que presenta un continuo incremento. Por otro lado, cuando se utiliza un gráfico semilogarítmico se obtiene una línea recta, por lo que, si al graficar de forma semilogarítmica la concentración de bacterias en el tiempo se obtiene una línea recta, significa que las bacterias están creciendo de forma exponencial [20].

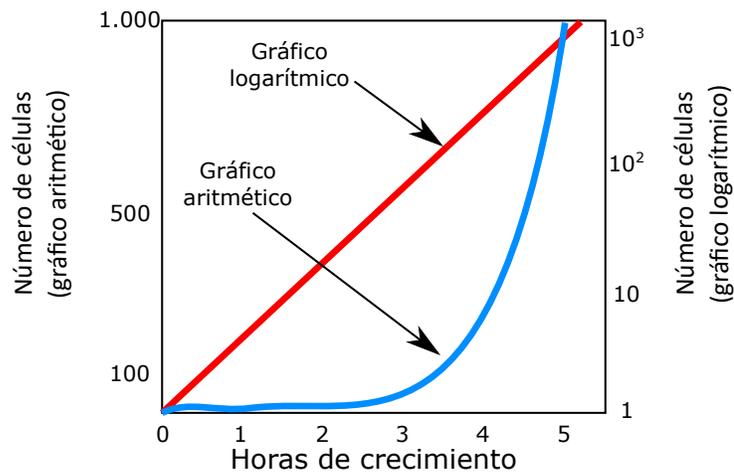


Figura 2.1: Crecimiento exponencial de un microorganismo

El incremento de células en un crecimiento exponencial se puede aproximar a una progresión geométrica del número 2. Para calcular el número final de microorganismos en un cultivo batch, luego de  $n$  tiempos de duplicación, se puede utilizar la siguiente expresión:

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (2.12)$$

donde  $N$  corresponde al número final de microorganismos y  $N_0$  al número inicial [20].

Otro parámetro que se puede utilizar para describir el crecimiento exponencial de un microorganismo es la velocidad específica de crecimiento, la que corresponde a la variación de la concentración de microorganismos en el tiempo. Este parámetro puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (2.13)$$

en esta expresión  $\mu$  corresponde a la velocidad específica de crecimiento,  $x$  a la concentración de microorganismos y  $t$  al tiempo [20].

Al integrar y linealizar la expresión 2.13 se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln(x) = \mu \cdot t + \ln(x_0) \quad (2.14)$$

donde  $x_0$  corresponde a la concentración inicial de microorganismos. La ecuación 2.14 muestra que en un gráfico semilogarítmico de la concentración de bacterias en el tiempo, en crecimiento exponencial, la pendiente de la recta corresponderá a la velocidad específica de crecimiento del microorganismo bajo las condiciones a las que fue cultivado [20].

### 2.2.3. Fases del crecimiento microbiano

La figura presentada anteriormente solo muestran una parte del ciclo de crecimiento de los microorganismos. Por diversas razones (falta de nutrientes o inhibición por algún compuesto generado en el crecimiento, por ejemplo), un organismo que se está desarrollando en un recipiente cerrado, tal como un matraz o un tubo, no podrá crecer de forma exponencial indefinidamente; en lugar de esto se tienen distintas fases en su crecimiento, las que se pueden ver en la curva de crecimiento mostrada en la Figura 2.2 [20].

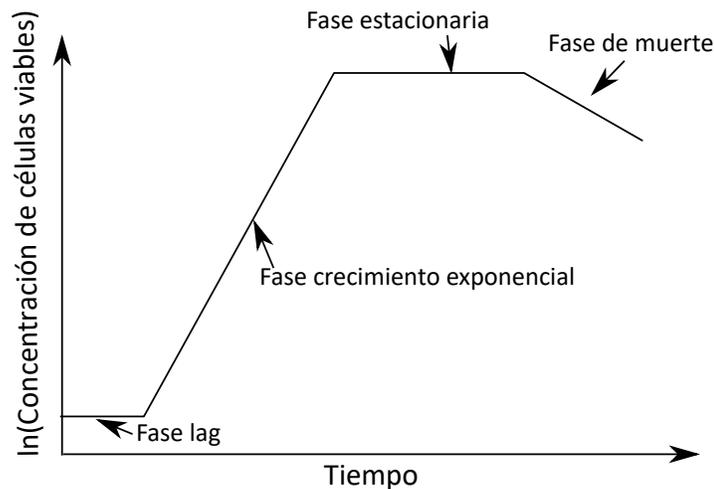


Figura 2.2: Curva de crecimiento de un microorganismo

En la curva de crecimiento se muestran las 4 fases principales del crecimiento de un microorganismo, las cuales son: fase *lag*, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. A continuación, se da una breve descripción de cada una de estas fases [20]:

- **Fase *lag*:** Cuando un medio fresco es inoculado desde un cultivo microbiológico, el crecimiento usualmente comienza luego de un periodo llamado fase *lag*. Este intervalo de tiempo puede ser breve o extendido, lo que dependerá del inóculo utilizado y de las condiciones en que se realice el cultivo. Si el inóculo es tomado desde un cultivo que se encuentra en la fase exponencial, y se utilizan las mismas condiciones de cultivo, el crecimiento comenzará inmediatamente. Sin embargo, cuando se utiliza un inóculo proveniente de un cultivo que

se encontraba en fase estacionaria (o de muerte), se producirá una fase lag, debido a que las bacterias no tendrán compuestos esenciales para su crecimiento, por lo que necesitarán tiempo para sintetizarlos. Otros motivos que pueden causar la existencia de una fase lag son que las bacterias hayan sido dañadas por cambios significativos de temperatura, radiación o compuestos químicos tóxicos, o que el inóculo haya sido transferido desde un medio rico en nutrientes a uno pobre en estos.

- **Fase de crecimiento exponencial:** Como se mencionó anteriormente, durante la fase de crecimiento exponencial de un cultivo, cada célula se divide para formar dos más, y éstas se vuelven a dividir para generar dos más cada una; este periodo puede ser corto o extenso, dependiendo de la disponibilidad de los recursos y de otros factores. La velocidad de crecimiento de las bacterias puede estar influenciada por las condiciones del medio (temperatura y composición del medio de cultivo) y por características genéticas de cada microorganismo (en general las bacterias procariontes crecen más rápido que las eucariontes). Las células que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial son las más sanas dentro de su ciclo de crecimiento, por lo tanto, es la mejor etapa para la realización de estudios con ellas.
- **Fase estacionaria:** En un cultivo *batch*, ya sea en un matraz, tubo o placa de Petri, el crecimiento exponencial estará limitado. Típicamente esto puede suceder porque un nutriente esencial en el crecimiento del microorganismo sea consumido totalmente o porque los desechos del microorganismo se acumulen e inhiban el crecimiento de éste, de ambas formas el cultivo alcanzará la fase estacionaria. En esta etapa no hay un incremento o disminución neta de células, por lo que la velocidad específica de crecimiento es cero.
- **Fase de muerte:** Si la incubación del cultivo continúa luego de alcanzar la fase estacionaria, las células continuarán con su metabolismo, pero eventualmente morirán. Cuando esto sucede, el cultivo entra en su fase de muerte, la cual puede venir acompañada de lisis celular (ruptura de membrana celular). Como se puede notar en la curva, la muerte celular también es una función exponencial, sin embargo, tiene una velocidad mucho menor que la del crecimiento exponencial.

# Capítulo 3

## Antecedentes bibliográficos

### 3.1. Microorganismos utilizados en celdas de combustible microbiológicas y su mecanismo de transferencia de electrones

Las celdas de combustible son capaces de producir energía eléctrica a partir de distintos combustibles. Dentro de éstas, las celdas de combustible microbiológicas (CCMs) se distinguen por no tener la necesidad de utilizar metales como catalizador en el ánodo, ya que ocupan microorganismos con la capacidad de oxidar biológicamente materia orgánica y transferir electrones al ánodo de la celda. Los microorganismos utilizados han sido aislados desde sedimentos marinos, suelos, aguas residuales y lodos activados; estos microorganismos fueron definidos por Logan como exoelectrógenos, debido a su capacidad de transferir los electrones extracelularmente [14].

Los microorganismos comúnmente utilizados en CCMs son de especies como *Geobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Desulfomonas*, y éstos son capaces de utilizar acetato, etanol, lactato, ácido propanoico o butanoico como sustrato para la producción de electricidad. Un asunto importante a estudiar para utilizar estas bacterias es el mecanismo con el que éstas pueden transferir los electrones al ánodo del sistema [21].

Esta transferencia de electrones puede ocurrir de dos formas: de manera directa o indirecta [22]. En la Figura 3.1 se puede ver un esquema de ambos mecanismos.

En el mecanismo directo, la bacteria es capaz de utilizar como aceptor final de electrones el ánodo de la celda, lo que ocurre gracias a los citocromos c presentes en la membrana de la célula. También se ha demostrado que esto puede suceder debido a la presencia de conductos extracelulares, llamados pilis conductores o nanocables bacterianos [23,24]. Cuando un microorganismo no cuenta con nanocables o citocromos capaces de transferir el electrón directo al electrodo de la celda, se podrá utilizar el mecanismo indirecto. En éste, la bacteria utiliza un mediador como aceptor final de electrones, el cual posteriormente se oxida en el electrodo y de esta forma, el electrón es transferido al ánodo. Este mediador también podría ser utilizado como donador de electrones en el metabolismo de otra bacteria, la que mediante el mecanismo directo podría transferir el electrón al electrodo de la celda [24].

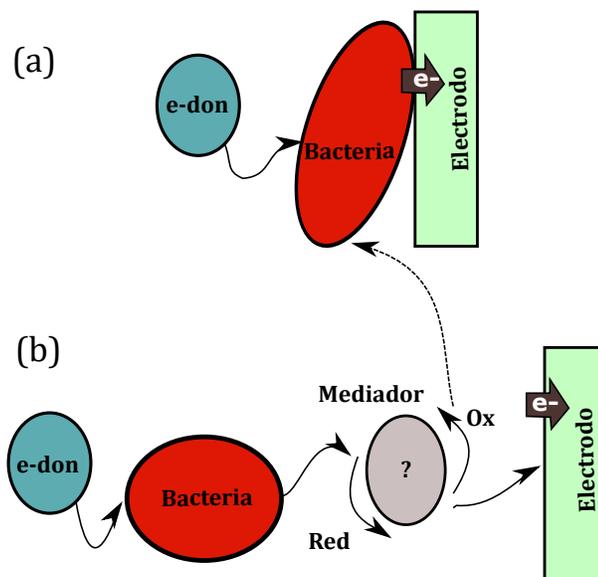


Figura 3.1: Mecanismos de transferencia de electrones de forma: (a) directa y (b) indirecta. Adaptado de [11]

Una de las cepas que más se ha utilizado es *Geobacter sulfurreducens*. Esta bacteria es estrictamente anaeróbica, quimioorganotrófica, utiliza como sustrato acetato y puede utilizar como aceptor de electrones  $\text{Fe}^{3+}$ , S,  $\text{Ce}^{3+}$ , fumarato o malato. Gorby y Beveridge *et al.* concluyeron que este microorganismo es capaz de generar nanocables cuando está en un cultivo con ausencia de receptores de electrones. En otros estudios también se ha visto que los citocromos c de la membrana de *G. sulfurreducens* pueden transferir el electrón a un electrodo sólido [21, 25].

*Shewanella oneidensis* es otra de las bacterias más estudiadas. Este microorganismo es una bacteria aeróbica, capaz de reducir oxígeno o ion férrico y, al igual que *G. sulfurreducens*, puede generar nanocables en ausencia de aceptores de electrones [26]. Este microorganismo es capaz de producir su propio mediador (2-amino-3-dicarboxi-1,4-naftoquinona), característica compartida con otras bacterias como *Pseudomonas alcaliphila* o *Pseudomonas aeruginosa* [24].

La mayoría de los microorganismos utilizados en estas tecnologías crecen a pH cercano a 7. Sin embargo, hay otros trabajos en los cuales se han utilizado bacterias que crecen a un pH menor. Por ejemplo, Borole *et al.* utilizó *Acidiphilium cryptum* en su trabajo, la cual es una bacteria reductora de  $\text{Fe}^{3+}$  (pudiendo utilizarlo como mediador en la transferencia de electrones), acidófila (tolera pH entre 2,1 a 5,8), aeróbica y heterotrófica. La principal ventaja de utilizar una bacteria acidófila es que se tendrá una mayor concentración de protones, por lo que la transferencia de estos hacia el cátodo y la reducción del oxígeno podrían no ser etapas limitantes dentro del sistema [27].

## 3.2. Combustibles utilizados en las CCMs

Uno de los factores más importantes a considerar dentro de la generación de energía en celdas de combustible microbiológicas es el combustible a utilizar. En la Tabla 3.1 se presentan diversos

sustratos utilizados en estudios de celdas de combustible microbiológicas con su respectiva densidad de potencia obtenida. Es importante mencionar que es difícil realizar una comparación entre cada uno de los estudios, debido a que estos fueron llevados a cabo con distintas concentraciones de sustrato, origen del inóculo, electrodos y condiciones de operación.

Los datos mostrados en la tabla solo son una pequeña muestra de los sustratos que pueden ser utilizados en las celdas de combustible microbiológicas [11]. Como se mencionó anteriormente, dentro de estas celdas se puede utilizar una gran variedad de combustibles, como sustratos no fermentables (acetato, ácido butírico), fermentables (glucosa, sacarosa o xilosa) o sustratos más complejos (aguas residuales domésticas, riles de la industria de alimentos o de reciclaje de papel). Por ejemplo, Chae *et al.* comparó en su estudio el desempeño de cuatro sustratos diferentes en términos de su eficiencia coulombica<sup>3</sup>, utilizando lodos activados como inóculo. Los sustratos utilizados fueron acetato, ácido butírico, ácido propanoico y glucosa, y estos obtuvieron una eficiencia coulombica de 72,3 %, 43 %, 36 % y 15 %, respectivamente [32].

En las pruebas realizadas por Chae *et al.* se utilizaron dos de los sustratos más comunes en este tipo de tecnologías. El acetato es el combustible más usado en los diversos estudios realizados, ya que es un compuesto simple y es inerte a otro tipo de conversiones microbiológicas, como fermentación y metanogénesis, a temperatura ambiente [16]. Liu *et al.* utilizó este sustrato en sus experimentos con una celda de una cámara, donde reportó que la densidad de potencia alcanzada fue un 66 % mayor a la obtenida utilizando ácido butírico [33].

El segundo sustrato más utilizado es la glucosa. Rabaey *et al.* reportó que la máxima densidad de potencia fue de  $216 \text{ W m}^{-3}$  cuando se utilizó una celda *fed-batch* con este compuesto como sustrato (como inóculo se utilizó lodos activados) y ferricianuro como receptor de electrones en el cátodo [34]. En otro estudio, realizado por Lee *et al.*, se comparó la densidad de potencia obtenida al utilizar un lodo anaeróbico o glucosa como combustible (utilizando las bacterias presente en los lodos), donde el lodo generó  $0,3 \text{ mW m}^{-2}$ , mientras que con la glucosa se obtuvo una densidad de potencia de  $161 \text{ mW m}^{-2}$  [35]. Es importante mencionar que este sustrato, a diferencia del acetato, es un compuesto fermentable, por lo que podría ser consumido por otro microorganismo presente en el inóculo y que no sea capaz de generar corriente eléctrica [16].

### 3.3. Materiales utilizados en la fabricación de ánodos de CCMs

Uno de los componentes más importantes de toda celda de combustible es el ánodo del sistema. El material utilizado para la fabricación de este electrodo, para su uso en celdas de combustible microbiológica, debe tener ciertas especificaciones, para así poder interactuar adecuadamente con las bacterias utilizadas en el sistema. Las características más importantes que se deben evaluar son: su conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, biocompatibilidad y bajo costo.

Los materiales basados en carbono son los más utilizados en los estudios de celdas de combustible

---

<sup>2</sup>Demanda química de oxígeno

<sup>3</sup>La eficiencia coulombica es el porcentaje de electrones que pasan por el sistema, con respecto a los generados en la reacción de interés [18]

Tabla 3.1: Sustratos utilizados en celdas de combustible microbiológicas

Sustrato utilizado	Concentración	Inóculo	Densidad de potencia / mW m <sup>2</sup>	Diseño de la celda	Referencia
Acetato	800 mg l <sup>-1</sup>	Aguas residuales domésticas	506	Una cámara	[28]
Glucosa	200 mg l <sup>-1</sup>	<i>Geobacter SPP</i>	40	Doble cámara	[29]
Ácido butírico	1.000 mg l <sup>-1</sup>	Aguas residuales domésticas	305	Una cámara	[30]
Aguas residuales domésticas	215 mg l <sup>-1</sup> de DQO <sup>2</sup>	Cultivo mixto	26	Una cámara	[30]
Aguas residuales artificiales	3.000 mg l <sup>-1</sup> de DQO	Cultivo mixto	170	Doble cámara	[31]
Etanol	1,5 mM	Lodos anaeróbicos	488	Una cámara	[21]

microbiológicas, esto se debe a que estos materiales cumplen, en buena medida, con todas las características mencionadas anteriormente [36]. A continuación se dará una breve descripción de algunos de los materiales más utilizados:

- **Tela de carbono:** Es uno de los materiales más comúnmente utilizados para este tipo de tecnologías, debido a que garantiza una alta área superficial, una porosidad relativamente alta, adecuada conductividad eléctrica y buenas propiedades mecánicas. La desventaja que presenta este material es su alto costo en comparación a otros materiales basados en carbono [37].
- **Cepillos de carbono:** La estructura de este material consta con un centro de titanio, el cual es rodeado de fibras de carbono. Estas fibras le dan al electrodo una alta área superficial y el centro de titanio le otorga una buena conductividad eléctrica, sin embargo, esto también aumenta su precio de venta [38].
- **Esponja de carbono:** Las esponjas de carbono tienen como características principales su alta porosidad y su alta conductividad eléctrica. El gran tamaño de los poros de estos materiales permite a las bacterias colonizar la estructura de la esponja, tanto en el exterior como en el interior. Otro punto que tienen a favor estos materiales es su bajo costo en comparación a otros materiales basados en carbono [24].
- **Carbón activado granular:** Debido a su biocompatibilidad y bajo costo, este material también es utilizado en la fabricación de ánodos para celdas de combustible microbiológicas. La porosidad de este material es muy alta, lo que causa que su conductividad eléctrica sea baja en comparación a otros materiales basados en carbono. Otra desventaja que posee el carbón activado granular es que el tamaño de sus poros es muy pequeño, por lo que las bacterias solo podrán acceder al área exterior de los granos, lo que reduce considerablemente el área disponible para generar biofilms bacterianos [24].
- **Carbono vítreo reticular:** Éste es uno de los últimos materiales que se ha comenzado a utilizar como ánodos en CCMs . Las principales características que presenta este material es su alta conductividad eléctrica y su gran porosidad, la que permite a las bacterias colonizar toda la superficie disponible del electrodo y así, obtener mayores densidades de corriente debido a la acción catalítica de los microorganismos [39].

Es difícil llevar a cabo una comparación cuantitativa entre los materiales planteados en esta sección, ya que sus propiedades, como área superficial o conductividad eléctrica, dependerán de su respectivo fabricante.

### 3.4. Materiales utilizados como cátodos de CCMs

La reducción de oxígeno (Reacción 1.4) que ocurre en el cátodo de las celdas de combustible microbiológicas, frecuentemente es la reacción limitante del sistema. Es por esto que también se busca catalizar este proceso, lo que se puede llevar a cabo mediante tres formas: enzimas, bacterias o catalizadores abióticos. Esta última opción es la que más se ha utilizado para este tipo de sistemas [24].

Los catalizadores abióticos pueden ser agrupados en 3 categorías distintas: materiales basados en platino, materiales basados en carbono (libre de metales) y materiales libres de elementos del

grupo del platino<sup>4</sup>. Estos catalizadores son soportados sobre algún colector de corriente, los que pueden ser los mismos materiales mencionados en la Sección 3.3 [24].

Los materiales basados en platino son los más utilizados como catalizadores de la reducción de oxígeno. Sin embargo, el costo de estos catalizadores es alto y su durabilidad hace que su uso sea insostenible a largo plazo, en especial en celdas de una cámara que utilizan como sustrato aguas residuales (debido al envenenamiento del platino por los sulfuros presentes en este fluido). La segunda categoría se muestra como una opción viable debido a su bajo costo, y tienen un buen rendimiento; los materiales utilizados como catalizadores son principalmente basados en grafeno, carbón activado, nanotubos o nanofibras de carbono [40, 41].

Finalmente, los catalizadores basados en elementos libres de elementos del grupo del platino son los que están llamando la atención de los investigadores en el último tiempo. Estos catalizadores están basados en metales de transición asociados con carbono y nitrógeno, los que utilizan el acrónimo de M-C-N, donde M usualmente es Mn, Fe, Co o Ni [24, 42].

### **3.5. Recapitulación y objetivos específicos**

En base a lo mostrado anteriormente, se decidió utilizar como material para la fabricación de los electrodos de trabajo del estudio el carbono vítreo reticular y la bacteria *Acidiphilium cryptum* como catalizador de la oxidación de la materia orgánica. La justificación y discusión de estas decisiones se encuentran en el Capítulo 5.

De esta manera, los objetivos específicos de este trabajo de memoria son:

- Diseñar y fabricar una celda de combustible microbiológica.
- Seleccionar y caracterizar los materiales para construir los ánodos de la celda de combustible microbiológica.
- Caracterizar el desempeño del ánodo de la celda de combustible microbiológica mediante técnicas electroquímicas.
- Estudiar el efecto de las bacterias sobre la electroactividad del ánodo utilizado.

---

<sup>4</sup>Los elementos del grupo del platino son: Ru, Rh, Pd, Os, Ir y Pt.

# Capítulo 4

## Metodología

### 4.1. Preparación de soluciones

A continuación se detallarán tanto los reactivos como el procedimiento para la preparación de las soluciones que fueron utilizadas a lo largo de este estudio.

#### 4.1.1. Medio de cultivo para *Acidiphilium cryptum*

Cada microorganismo necesita distintos nutrientes y compuestos para su crecimiento, por lo que para los cultivos de *Acidiphilium cryptum* se utilizó un medio descrito en bibliografía, específico para esta bacteria. Esta solución fue abreviada como MC1 [27].

En la Tabla 4.1 se presentan los reactivos que son necesarios para la preparación de 1 litro de medio de cultivo.

Tabla 4.1: Reactivos medio de cultivo *Ac. cryptum*

Reactivo	Cantidad	Marca	Pureza
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
KCl	0,1 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	<i>Merck</i>	≥ 99 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
Caldo de soja triptico sin dextrosa <sup>5</sup>	0,1 g	<i>Becton Dickinson</i>	-
Glucosa	1 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
Agua destilada	1.000 ml	-	-

El procedimiento de preparación del medio es el siguiente:

1. Se disolvió la glucosa en 10 ml de agua destilada.

<sup>5</sup>Tryptic soy broth without dextrose

2. Posteriormente, el resto de los reactivos fueron disueltos en 990 ml de agua destilada.
3. Se ajustó el pH de la última solución a 3 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
4. Se esterilizaron las soluciones mediante un autoclave.
5. Finalmente, se mezclaron ambas soluciones bajo mechero.

#### 4.1.2. Medio de cultivo para *Acidiphilium cryptum* con ion férrico

Para poder utilizar la bacteria *Acidiphilium cryptum* en una celda de combustible, fue necesario agregar un mediador, como se explica en la Sección 3.1, (en este caso el ion férrico, añadido como sulfato férrico), por lo que se realizó una modificación a MC1, la cual fue llamada MC2 [27].

En la Tabla 4.2 se presentan los reactivos que son necesarios para la preparación de 1 litro de esta solución.

Tabla 4.2: Reactivos medio de cultivo *Ac. cryptum* con ion férrico

Reactivo	Cantidad	Marca	Pureza
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
KCl	0,1 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	<i>Merck</i>	≥ 99 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	11 mg	<i>Sigma Aldrich</i>	97 %
Caldo de soja tréptico sin dextrosa <sup>6</sup>	0,1 g	<i>Becton Dickinson</i>	-
Glucosa	1 g	<i>Merck</i>	≥ 99,5 %
Agua destilada	1.000 ml	-	-

Para este caso, el procedimiento de preparación del medio es el siguiente:

1. Se disolvió la glucosa en 10 ml de agua destilada.
2. Posteriormente, el resto de los reactivos fueron disueltos en 990 ml de agua destilada.
3. Se ajustó el pH a la última solución a 3 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
4. Se esterilizaron las soluciones mediante un autoclave.
5. Finalmente, se mezclaron ambas soluciones bajo mechero.

#### 4.1.3. Buffer fosfato pH 4

En esta sección se listan los reactivos y se describe el procedimiento utilizado para la preparación del buffer fosfato de pH 4 utilizado durante los experimentos realizados. Esta solución fue abreviada como BF4 [27].

En la Tabla 4.3 se listan los reactivos necesarios para la preparación de un litro de esta solución.

<sup>6</sup>Tryptic soy broth without dextrose

Tabla 4.3: Reactivos para la preparación de buffer fosfato

Reactivo	Cantidad	Marca	Pureza
$K_2HPO_4$	17,41 g	<i>Merck</i>	$\geq 99\%$
$KH_2PO_4$	13,60 g	<i>Merck</i>	$\geq 99,5\%$
Agua destilada	1.100 ml	-	-

El procedimiento de preparación del buffer fosfato es el siguiente:

1. Se disolvió el  $K_2HPO_4$  en 100 ml de agua destilada.
2. Se disolvió el  $KH_2PO_4$  en 100 ml de agua destilada.
3. Se mezclaron 91,5 ml de la solución de  $KH_2PO_4$  con 8,5 ml de la solución de  $KH_2PO_4$  y se aforó a 1.000 ml con agua destilada.
4. Finalmente, se ajustó el pH a 4 mediante  $H_3PO_4$  al 85 % v/v.

#### 4.1.4. Solución para hidratación de membrana Nafion<sup>®</sup> 117

Para hidratar la membrana Nafion<sup>®</sup> 117 utilizada, se llevó a cabo un proceso de hidratación usando una solución de KCl 0,5 M. A continuación, se indican los reactivos utilizados y se describe el procedimiento para la preparación de esta solución, la cual fue abreviada como HM1.

En la Tabla 4.4 se listan los reactivos necesarios para la preparación de 100 ml de esta solución.

Tabla 4.4: Reactivos para solución de hidratación de membrana

Reactivo	Cantidad	Marca	Pureza
KCl	3,73 g	<i>Merck</i>	$\geq 99,5\%$
Agua destilada	100 ml		

Para preparar esta solución simplemente se debe disolver el cloruro de potasio en el agua destilada.

## 4.2. Preparación de electrodos

Para llevar a cabo las pruebas electroquímicas del estudio, se eligió el carbono vítreo reticular (CVR) como material para la fabricación del electrodo de trabajo a utilizar (ánodo). Además, se estandarizó el diseño, proceso de construcción y limpieza del electrodo.

## 4.2.1. Conductividad del CVR

Para medir la conductividad eléctrica del carbono vítreo reticular, se utilizó el método de las cuatro puntas. A continuación se describirá el procedimiento realizado y los materiales necesarios para llevarlo a cabo. Los materiales utilizados fueron:

- Carbono vítreo reticular de 80 ppi, 100 mm x 100 mm x 6 mm.
- Cortacartón.
- 4 cables de cobre de 1,5 mm de diámetro y 2 cm de largo.
- Multímetro digital DT9501.
- Potenciostato/Galvanostato *Gamry Instruments* modelo Reference 3000.

El procedimiento seguido es el siguiente:

1. En primer lugar, se cortó un disco de carbono vítreo reticular de radio 3 cm y altura de 6 mm con el cortacartón.
2. Los cables de cobre fueron pelados a la altura de 2 mm por un lado y 5 mm por el otro.
3. Los extremos más cortos de los cables fueron introducidos por el contorno del disco de carbón, en las posiciones que se muestran en la Figura 4.1a.
4. Utilizando el multímetro, se comprobó que existiera conexión entre los cuatro cables.
5. Los terminales del potenciostato correspondientes al electrodo de trabajo (abreviado ET), contraelectrodo (abreviado CE), sensor de electrodo de trabajo (abreviado ST), sensor de contraelectrodo (abreviado SC) y electrodo de referencia (abreviado ER) fueron conectados en la configuración mostrada en la Figura 4.1b.
6. El potenciostato fue conectado al computador de adquisición de datos y se llevó a cabo una voltametría cíclica de cuatro ciclos, entre -1 y 1 V y con una velocidad de barrido de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ .
7. Una vez terminada la voltametría, los terminales del potenciostato fueron cambiados de posición, colocándolos de la forma que se muestra en la Figura 4.1c.
8. Se volvió a realizar una voltametría cíclica con la nueva configuración y con los parámetros mencionados anteriormente.

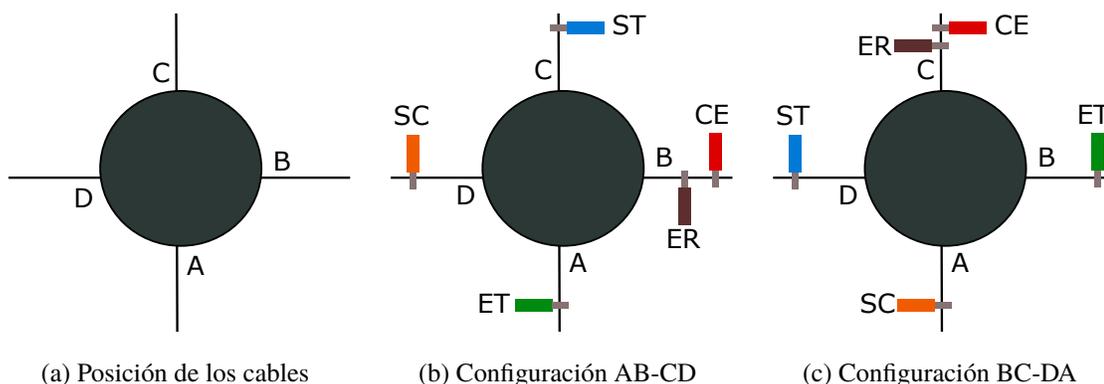


Figura 4.1: Conexiones utilizadas para el método de las cuatro puntas

## 4.2.2. Construcción del electrodo

En esta sección se listan los materiales necesarios y el procedimiento para el ensamblaje de los electrodos utilizados. Los materiales y herramientas utilizados son:

- Carbón vítreo reticular de 80 ppi, 100 mm x 100 mm x 6 mm.
- Cable de cobre de 1,5 mm de diámetro y 8 cm de largo.
- Cortacartón.
- Pintura de plata *Pelco® Colloidal Silver Liquid, Ted Pella, Inc.*
- Multímetro digital DT9501.
- Resina epóxica *Poxipol®* transparente o negra.

El procedimiento seguido para la fabricación del electrodo es el siguiente:

1. Se cortó el carbono vítreo reticular en paralelepípedos de 40 mm x 8 mm x 3 mm con ayuda del cortacartón.
2. El cable de cobre fue pelado a una altura de 2 mm por un extremo y 20 mm por el otro.
3. Se recubrió el extremo más corto del cable de cobre con pintura de plata y fue introducido en el centro de la cara mas pequeña del carbono de forma que todo el cobre descubierto quede dentro de este.
4. Utilizando el multímetro se comprobó que exista contacto entre el carbono y el cable de cobre.
5. Se recubrió con resina epóxica la cara donde fue insertado el cable, para así evitar que éste pueda ser removido.
6. Para finalizar, se comprobó nuevamente mediante el multímetro que el cable siga en contacto con el carbono. En la Figura 4.2 se puede ver un esquema del electrodo terminado.

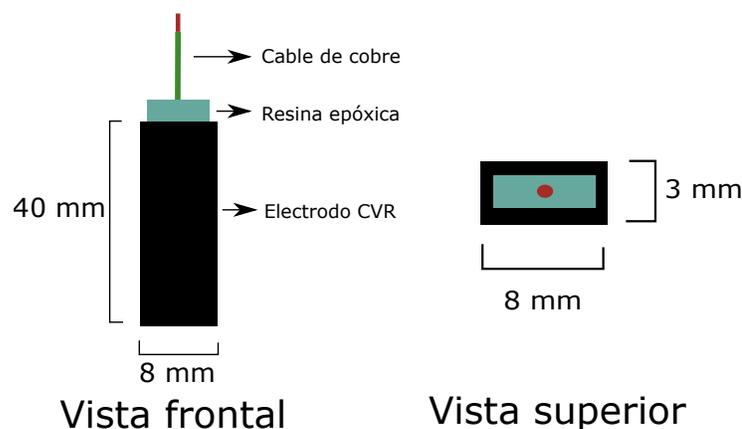


Figura 4.2: Esquema del electrodo de trabajo utilizado

## 4.2.3. Limpieza del electrodo

Para evitar que la superficie de los electrodos haya estado contaminada con microorganismos o impurezas, estos fueron limpiados mediante ultrasonido antes y después de realizar cada prueba (en

el caso de ser reutilizados). Para ello se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- Agua destilada.
- Etanol al 70 %v/v.
- Vaso precipitado de 50 ml.
- Limpiador ultrasónico *Cole-Parmer* 8852.

Y se procedió de la siguiente manera:

1. Se enjuagó el electrodo con agua destilada.
2. Posteriormente, se limpió el electrodo con etanol.
3. Utilizando 30 ml de agua destilada en un vaso precipitado de 50 ml sumergido en el baño maría del limpiador ultrasónico, se sonicó el electrodo durante 5 minutos para así eliminar toda impureza que este pueda tener en su superficie.
4. Se volvió a limpiar el electrodo con etanol.
5. Finalmente, se enjuagó el electrodo con agua destilada, para eliminar todo resto de etanol.

### **4.3. Cultivos microbiológicos**

En esta sección se detalla el procedimiento seguido para llevar a cabo los cultivos de bacterias utilizados durante este trabajo y la obtención de su curva de crecimiento. Como se buscó estudiar el comportamiento de un microorganismo específico, todo el trabajo microbiológico se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, para así evitar que los cultivos se pudieran contaminar con otros microorganismos.

#### **4.3.1. Cultivo de *Acidiphilium cryptum* en matraz Erlenmeyer**

A continuación se describe el procedimiento para realizar los cultivos de la bacteria *Acidiphilium cryptum*, utilizada en este trabajo, tanto con el medio sin el ion férrico (MC1) como con éste (MC2). Los materiales utilizados son:

- Etanol al 70 % v/v.
- Mechero de mesa.
- Probeta de 100 ml estéril.
- Soluciones MC1 y MC2.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril.
- Tapón de algodón estéril.
- Micropipeta 5.000 µl.
- Puntas micropipeta 5.000 µl estériles.
- Cultivo antiguo de *Ac. cryptum*.
- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.

El procedimiento de cultivo se describe a continuación:

1. Se partió limpiando el mesón de trabajo con etanol.
2. Una vez seco el mesón, se encendió el mechero y se trabajó siempre en un radio de 15 cm a su alrededor para mantener el ambiente de esterilidad.
3. Utilizando la probeta, se añadieron 90 ml de la solución MC1 o MC2 (dependiendo del cultivo que se quiera realizar) al matraz y éste se tapó con el tapón de algodón.
4. Para inocular el matraz, mediante el uso de la micropipeta se tomó una alícuota de 10 ml desde un cultivo anterior y fue agregada al nuevo.
5. Para finalizar, el cultivo se dejó en un shaker a 30 °C y a una velocidad de agitación de 150 rpm durante 8 horas para las pruebas de bacterias en solución y 3 días en caso de ser un cultivo para mantener la bacteria.

#### **4.3.2. Cultivos de *Acidiphilium cryptum* en tubos Falcon®**

Para realizar la prueba de bacterias adheridas al electrodo, se llevaron a cabo cultivos con electrodos en su interior. A continuación se listan los materiales utilizados y se describe el procedimiento de cultivo seguido. Los materiales utilizados fueron:

- Etanol al 70 % v/v.
- Mechero de mesa.
- Probeta de 25 ml estéril.
- Solución MC2.
- Tubo Falcon® estéril.
- Micropipeta 5.000 µl.
- Puntas micropipeta 5.000 µl estériles.
- Cultivo antiguo de *Ac. cryptum*.
- Electrodo de carbono vítreo reticular.
- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.

El procedimiento de cultivo es el siguiente:

1. El electrodo se limpió tal como se indicó en la Sección 4.2.3 para así evitar que éste haya estado contaminado.
2. Luego se limpió el mesón de trabajo con etanol.
3. Una vez seco el mesón, se encendió el mechero y se trabajó siempre en un radio de 15 cm a su alrededor para mantener el ambiente de esterilidad.
4. Utilizando la probeta, se añadiorn 18 ml de la solución MC2 al tubo Falcon®.
5. Para inocular el tubo, mediante el uso de la micropipeta se tomó una alícuota de 2 ml desde un cultivo anterior y fue añadida al tubo.
6. Cuando el tubo estuvo inoculado, se añadió el electrodo de trabajo (previamente limpiado como se muestra en la Sección 4.2.3) y se colocó la tapa.

7. Finalmente, el tubo fue puesto en el shaker a 30 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm durante 4, 6 u 8 horas, dependiendo de la prueba a realizar.

### 4.3.3. Curva de crecimiento microbiano con recuento al microscopio

Para poder identificar las fases de crecimiento y la velocidad de crecimiento de la bacteria *Acidiphilium cryptum*, fue necesario construir su curva de crecimiento. En esta sección se indican los materiales necesarios y el procedimiento seguido para obtener la curva mediante el uso de recuento directo para calcular la cantidad de bacterias. Los materiales utilizados son:

- Cámara de *Neubauer*.
- Etanol al 70 % v/v.
- Micropipeta 20 µl.
- Puntas micropipeta 20 µl.
- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.
- Microscopio óptico *ZEISS* modelo Axio Lab.A1.

El procedimiento seguido es el siguiente:

1. Para comenzar a construir la curva se realizó un cultivo de *Acidiphilium cryptum* como se describe en la Sección 4.3.1, utilizando la solución en la cual se quiera estudiar el crecimiento (MC1 o MC2).
2. Se limpió la cámara de *Neubauer* con etanol.
3. Utilizando la micropipeta y sus puntas estériles, se sacó una muestra de 8 µl del cultivo (trabajando bajo mechero) y se puso en la cámara de recuento.
4. Una vez que la muestra fue tomada, el matraz fue devuelto al shaker a 30 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm.
5. Se puso la cámara de recuento en el microscopio y se llevó a cabo el recuento utilizando el lente del equipo que cuenta con un aumento de 40x.
6. Una vez terminado el recuento, se limpió nuevamente la cámara con etanol.
7. Se continuó sacando muestras y realizando el recuento en el microscopio cada dos horas hasta obtener los puntos necesarios para observar la fase exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento.

### 4.3.4. Curva de crecimiento microbiano con densidad óptica

Como método alternativo al recuento directo, la curva de crecimiento también fue realizada utilizando la densidad óptica del cultivo como referencia de la cantidad de microorganismos. Los materiales utilizados en este caso son:

- Micropipeta 1.000 µl.
- Puntas micropipeta 1.000 µl.

- Tubo Eppendorf 1,5 ml.
- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.
- Solución MC2.
- Cubeta de cuarzo para espectrofotómetro.
- Espectrofotómetro *Agilent* modelo 8453.
- Agua desionizada.

El procedimiento seguido es el siguiente:

1. Para comenzar a construir la curva se realizó un cultivo de *Acidiphilium cryptum* como se describe en la Sección 4.3.1, utilizando la solución en la cual se quiera estudiar el crecimiento (MC1 o MC2).
2. Utilizando la micropipeta, se tomó 1 ml del cultivo (trabajando bajo mechero) y se puso en un tubo Eppendorf.
3. Una vez que la muestra fue tomada, el matraz fue devuelto al shaker a 30 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm.
4. Se pusieron 1,5 ml de la solución MC2 en la cubeta, solución que fue utilizada como blanco en la medición de densidad óptica.
5. Se llevó a cabo la medición de la absorbancia del blanco a 600 nm<sup>7</sup>.
6. Se limpió la cubeta con agua desionizada, se puso la muestra a analizar y se le midió la absorbancia a 600 nm.
7. Se continuó sacando muestras y midiendo la absorbancia cada dos horas hasta obtener los puntos necesarios para observar la fase exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento.

## 4.4. Montaje experimental

### 4.4.1. Celda electroquímica utilizada

Para la realización de los experimentos electroquímicos de este estudio se diseñó una celda de doble cámara (en la Figura 4.3 se puede ver una foto de ésta). En la imagen se pueden apreciar claramente ambas cámaras, donde una de ellas tiene un sello tipo vial (cámara 1) y la otra es abierta (cámara 2), además, se puede ver que ambas cámaras están separadas por un puente en donde se inserta una membrana Nafion<sup>®</sup>, la cual evita la mezcla de las soluciones (anolito y catolito) que fueron utilizadas en las pruebas.

### 4.4.2. Hidratación membrana Nafion<sup>®</sup> 117

Para que la membrana utilizada presente la conductividad protónica adecuada, esta debió mantenerse hidratada. A continuación se explica el procedimiento seguido y los materiales necesarios

---

<sup>7</sup>Se usa esta longitud de onda debido a que en ésta la biomasa tiene su máxima absorbancia y, además, esta longitud de onda no tiene un efecto tóxico sobre las bacterias [43].

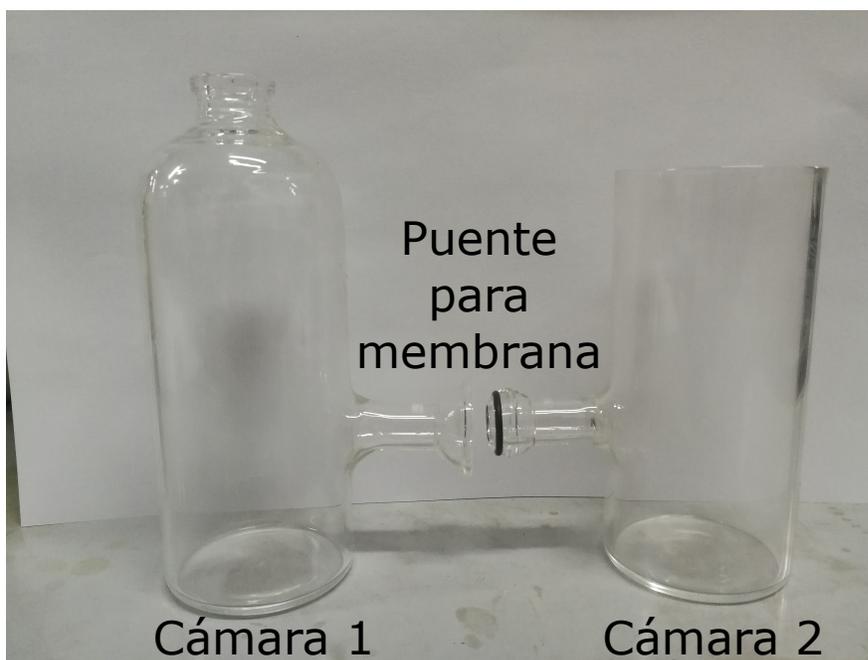


Figura 4.3: Celda utilizada en los experimentos electroquímicos

para esto.

Los materiales para el proceso de hidratación corresponden a:

- Membrana Nafion<sup>®</sup> 117.
- Tijeras.
- Placa de Petri 5 cm de diámetro.
- Solución HM1.
- Agua destilada.

El procedimiento seguido es el siguiente:

1. En primer lugar, se cortó la membrana en círculos de 1,5 cm de diámetro.
2. Utilizando la placa de Petri como recipiente, la membrana fue sumergida en la solución HM1 durante 24 horas.
3. Luego, se retiró la membrana de la solución y fue lavada con agua destilada para eliminar el exceso de solución.
4. Se volvió a sumergir la membrana en solución HM1 fresca por 1 hora en la placa de Petri.
5. Finalmente, se volvió a enjuagar la membrana con agua destilada para eliminar el exceso de solución HM1 que pueda haber tenido.

#### **4.4.3. Armado de la celda**

A continuación se describirá el procedimiento seguido para el armado de la celda electroquímica diseñada. Los materiales requeridos son:

- Membrana Nafion<sup>®</sup> 117 hidratada de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 4.4.2.
- Cámara 1 de la celda descrita en la Sección 4.4.1.
- Cámara 2 de la celda descrita en la Sección 4.4.1.
- Parafilm<sup>®</sup>.
- Cortacartón.
- Pinza rótula N° 18 de acero inoxidable.

El procedimiento de armado de la celda es el siguiente:

1. La membrana Nafion<sup>®</sup> 117 se puso en el lado de la unión correspondiente a la cámara 2 y se aseguró con parafilm<sup>®</sup>, para así evitar filtraciones.
2. Con un cortacartón se cortó (con mucho cuidado para no dañar la membrana) un círculo sobre el parafilm, de esta forma se aseguró el contacto entre la membrana y las soluciones de ambas cámaras.
3. Para terminar, se juntaron ambas cámaras y se apretó el puente utilizando la pinza.

#### 4.4.4. Mediciones electroquímicas con bacterias en solución

Para analizar el comportamiento catalítico de las bacterias, se realizaron experimentos inoculando la solución utilizada en el ánodo de la celda. En esta sección se listan los materiales y se detallan los procedimientos de medición utilizados. Los materiales utilizados para las mediciones electroquímicas son:

- Celda electroquímica.
- Solución BF4.
- Solución MC2.
- Mechero de mesa.
- Micropipeta 5.000 µl.
- Puntas micropipeta 5.000 µl estériles.
- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.
- Electrodo de carbono vítreo reticular.
- Electrodo de platino.
- Imán de agitador magnético.
- Tapa de cámara 2.
- Electrodo de referencia de Ag|AgCl KCl 3 M.
- Capilar de *Luggin* con solución KCl 3 M.
- Agitador magnético.
- Manguera para alimentación de nitrógeno.
- Capilar de vidrio.
- Potenciostato/Galvanostato *Gamry Instruments* modelo Reference 3000.

El procedimiento seguido es el siguiente:

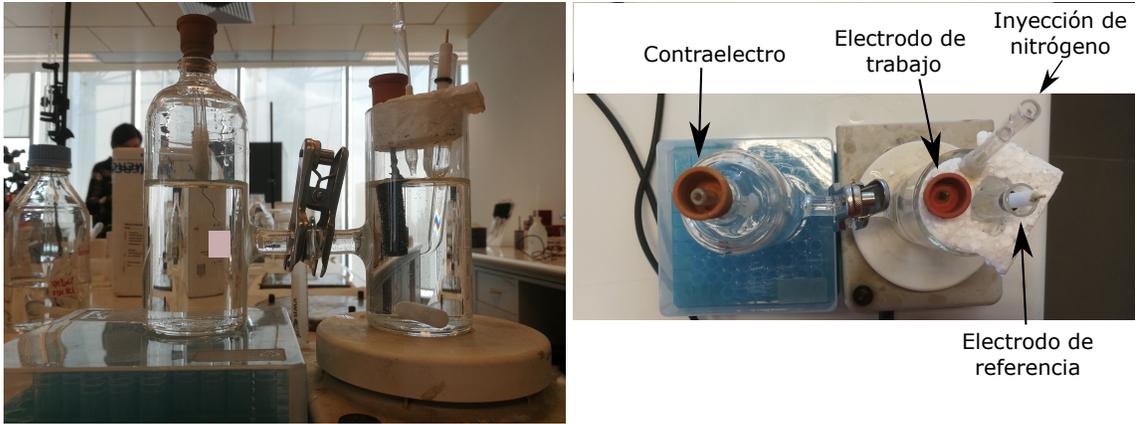
1. Para comenzar el experimento, se realizó un cultivo de *Acidiphilium cryptum* en la solución MC2, tal como se indica en la Sección 4.3.1.
2. Luego se ensambló la celda como se describe en la Sección 4.4.3.
3. En la cámara 1, se agregaron 100 ml de la solución BF4 y en la 2, 90 ml de la solución MC2.
4. Luego (trabajando bajo mechero), con la micropipeta se tomaron 10 ml del cultivo realizado y fueron añadidos a la cámara 2.
5. Una vez inoculada la celda, el cultivo se devolvió al shaker a 30°C y una agitación de 150 rpm.
6. Para asegurar que el electrodo de trabajo no haya estado sucio o contaminado, se limpió el electrodo de carbono vítreo reticular de la forma descrita en la Sección 4.2.3.
7. Se colocó el electrodo de platino en la cámara 1, para cumplir la función de contraelectrodo (abreviado como CE).
8. En la cámara 2 se puso el imán del agitador magnético, previamente lavado con agua destilada, y el compartimiento fue tapado.
9. Una vez tapada la cámara, se procedió a colocar el electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo (abreviado ET) y el electrodo de referencia (abreviado ER) sumergido en el capilar de *Luggin*.
10. La celda se colocó sobre un agitador magnético y se comenzó a agitar la cámara 2.
11. Se conectó el capilar de vidrio a la manguera de alimentación de nitrógeno, posteriormente, se introdujo el capilar de vidrio a la solución de la cámara 2 y se burbujeó nitrógeno por 10 minutos.
12. Se retiró el capilar de la solución, pero se continuó suministrando nitrógeno a la cámara, intentando no perturbar la solución.
13. El electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia fueron conectados al potenciostato, y éste al computador para la adquisición de datos.
14. Se realizó una espectroscopia de impedancia electroquímica, con una frecuencia inicial y final de  $10^5$  Hz y  $10^{-2}$  Hz, respectivamente, y una voltametría cíclica con una velocidad de barrido de  $25 \text{ mV s}^{-1}$  y el rango de potenciales indicado en la Sección 5.4.
15. Una vez realizadas las mediciones, el sistema fue desmontado, la membrana se lavó con agua destilada y se dejó sumergida en la solución HM1.
16. El experimento fue repetido a las 4, 6 y 8 horas del cultivo, utilizando la misma membrana que se dejó sumergida en la solución HM1 y los mismos electrodos (ER, CE y ET).

En la Figura 4.4a se puede ver la vista frontal de la celda electroquímica montada y en la Figura 4.4b se muestra una vista superior, donde se indica a qué corresponde cada elemento de la celda.

#### **4.4.5. Mediciones electroquímicas con bacterias en electrodo**

También se analizó la acción de los microorganismos cuando éstos estaban adheridos al electrodo de trabajo. En esta sección se describe el procedimiento seguido para llevar a cabo estas mediciones. Los materiales utilizados corresponden a:

- Mechero de mesa



(a) Vista frontal

(b) Vista superior

Figura 4.4: Montaje de la celda para los experimentos electroquímicos

- Shaker *Lab-line* modelo 3527-6.
- Celda electroquímica.
- Solución BF<sub>4</sub>.
- Solución MC2.
- Electrodo de carbono vítreo reticular.
- Electrodo de platino.
- Imán de agitador magnético.
- Tapa de cámara 2.
- Electrodo de referencia de Ag|AgCl KCl 3 M.
- Capilar de *Luggin* con solución KCl 3 M.
- Agitador magnético.
- Manguera para alimentación de nitrógeno.
- Capilar de vidrio.
- Potenciostato/Galvanostato *Gamry Instruments* modelo Reference 3000.

El procedimiento seguido para realizar las mediciones electroquímicas es el siguiente:

1. Para empezar el experimento, se realizaron 3 cultivos de *Acidiphilium cryptum* en tubos Falcon<sup>®</sup> y se pusieron a cultivar en el shaker a 30 °C y 150 rpm de velocidad de agitación.
2. Luego se ensambló la celda como se describe en la Sección 4.4.3.
3. En la cámara 1, se agregó 100 ml de la solución BF<sub>4</sub> y en la 2, 100 ml de la solución MC2.
4. La primera medición realizada se llevó a cabo con un ET sin bacterias, por lo que se tomó un electrodo de carbono vítreo reticular y se limpió como se muestra en la Sección 4.2.3.
5. Se colocó el electrodo de platino en la cámara 1, para cumplir la función de CE.
6. En la cámara 2 se puso el imán del agitador magnético, previamente lavado con agua destilada, y el compartimiento fue tapado.
7. Una vez tapada la cámara, se procedió a colocar el electrodo de carbón vítreo como ET y el ER sumergido en el capilar de *Luggin*.

8. La celda se colocó sobre un agitador magnético y se comenzó a agitar la cámara 2.
9. Se conectó el capilar de vidrio a la manguera de alimentación de nitrógeno, posteriormente, se introdujo el capilar de vidrio a la solución de la cámara 2 y se burbujeó nitrógeno por 10 minutos.
10. Se retiró el capilar de la solución, pero se continuó suministrando nitrógeno a la cámara, intentando no perturbar la solución.
11. El electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia fueron conectados al potenciostato, y éste al computador para la adquisición de datos.
12. Se realizó una espectroscopia de impedancia electroquímica, con una frecuencia inicial y final de  $10^5$  Hz y  $10^{-2}$  Hz, respectivamente, y una voltametría cíclica con una velocidad de barrido de  $25 \text{ mV s}^{-1}$  y el rango de potenciales indicado en la Sección 5.4.
13. Una vez realizadas las mediciones, el sistema fue desmontado, la membrana se lavó con agua destilada y se dejó sumergida en la solución HM1.
14. El experimento se repitió utilizando la misma membrana que se dejó sumergida y como ET se utilizaron los electrodos que estaban en los cultivos en tubos Falcon<sup>®</sup> (uno a las 4 h, otro a las 6 h y el último a las 8 h).

## 4.5. Técnicas utilizadas

### 4.5.1. Método de las cuatro puntas (conductividad de un material)

El método de las cuatro puntas, o de Van der Pauw, es una técnica comúnmente utilizada para la medición de la resistividad de un material. El poder de este método radica en la habilidad de llevar a cabo una medición precisa de las propiedades eléctricas de una muestra sin importar su forma, mientras la muestra sea aproximadamente de dos dimensiones (es decir, que su espesor sea mucho menor a su ancho) y los electrodos se sitúen en el perímetro de la muestra. El método surge como una alternativa a la medición directa de la resistencia de un material mediante un óhmetro, ya que éste mide todas las resistencias del circuito incluyendo la resistencia de los cables ( $R_{\text{cables}}$ ) que se utilizan en la conexión del equipo a la muestra [44].

Un ingenioso método para la medición de la resistencia de un material involucra el uso de un amperímetro y un voltímetro. Desde la Ley de Ohm (Ecuación 4.1) se conoce que la resistencia ( $R$ ) es igual al voltaje ( $E$ ) dividido por la intensidad ( $I$ ), por lo que conociendo la caída de voltaje a través del material y la corriente que circula a través de él, es posible calcular su resistencia. Como la corriente es la misma en todos los puntos del circuito, ésta puede ser medida a distancia sin ningún problema, pero la caída de voltaje de la muestra no puede ser separada de la del cable de conexión. Sin embargo, por los cables del voltímetro pasa una corriente despreciable por lo que tendrán una caída de voltaje insignificante. Por esto, la caída de voltaje medida será bastante cercana a la generada por el material [44].

$$R = \frac{E}{I} \quad (4.1)$$

Para llevar a cabo la medición de conductividad del carbono vítreo reticular, material elegido para la fabricación de los electrodos de trabajo (ánodos) utilizados en este estudio, se conectaron cuatro cables de cobre en los bordes de la muestra y se les nombró A, B, C y D como se ve en la Figura 4.1a. Utilizando el Potenciostato *Gamry Instruments* modelo Reference 3000 se obtuvieron las curvas de corriente-potencial realizando voltametrías cíclicas (con corriente directa y los parámetros mencionados en la Sección 4.2.1) a las muestras, donde la pendiente de las curvas obtenidas representan a la resistencia del material analizado. Se determinaron estas curvas y pendientes para dos casos diferentes [44]:

1. La corriente  $I_{AB}$  que circula entre los contactos A y B fue medida en amperes (A) y el voltaje  $V_{CD}$  entre los contactos C y D fue medido en volts (V). La resistencia  $R_{AB-CD}$  fue calculada en ohms ( $\Omega$ ).
2. La corriente  $I_{BC}$  que circula entre los contactos B y C fue medida en amperes (A) y el voltaje  $V_{DA}$  entre los contactos D y A fue medido en volts (V). La resistencia  $R_{BC-DA}$  fue calculada en ohms ( $\Omega$ ).

Las resistencias obtenidas fueron utilizadas para determinar la resistividad resolviendo la ecuación [44]:

$$\rho = \frac{\pi}{\ln(2)} \cdot \frac{R_{AB-CD} + R_{BC-DA}}{2} \cdot f \left( \frac{R_{AB-CD}}{R_{BC-DA}} \right) \cdot \delta \quad (4.2)$$

donde  $\delta$  es el espesor de la muestra y  $f$  está en función de la relación entre  $R_{AB-CD}$  y  $R_{BC-DA}$  y satisface la igualdad [44]:

$$\ln(2) \cdot \frac{R_{AB-CD} + R_{BC-DA}}{R_{AB-CD} - R_{BC-DA}} = f \cdot \cosh^{-1} \left( \frac{\exp(\ln(2)/f)}{2} \right) \quad (4.3)$$

Para resolver la Ecuación 4.3 se planteó el siguiente problema de optimización y sus restricciones:

$$\begin{aligned} \text{minimizar} \quad & \ln(2) \cdot \frac{R_{AB-CD} + R_{BC-DA}}{R_{AB-CD} - R_{BC-DA}} - f \cdot \cosh^{-1} \left( \frac{\exp(\ln(2)/f)}{2} \right) \\ & f \geq 0 \end{aligned}$$

El problema se resolvió con el complemento Solver de Excel, se calculó la resistividad utilizando la ecuación 4.2 y mediante esta, se calculó la conductividad de la muestra ( $\varepsilon$ ), ya que  $\varepsilon = \rho^{-1}$  [44].

#### 4.5.2. Recuento directo al microscopio (concentración de microorganismos)

El recuento directo al microscopio es una técnica común, rápida y barata que utiliza equipamiento con el que cuentan la mayoría de los laboratorios de microbiología. Para llevar a cabo este recuento generalmente se utilizan cámaras de recuento, aunque también es posible realizarlo a partir de

muestras filtradas en membranas, previamente teñidas con colorantes fluorescentes (como naranja de acridina, por ejemplo) [45].

Este tipo de recuento tiene algunas dificultades, entre las que se encuentran obtener una reproducibilidad en el llenado de la cámara o la adsorción de células en las superficies del vidrio. Sin embargo, este método también tiene ventajas, una de las principales es la información adicional que puede entregar sobre el tamaño y la morfología del microorganismo observado [45].

La cámara más utilizada para llevar a cabo este recuento es la cámara de Neubauer. Esta cámara cuenta con una rejilla de dimensiones conocidas, lo que facilita el recuento, y también se conoce la distancia entre su superficie y el porta objetos que se utiliza (distancia llamada profundidad de la cámara). En la Figura 4.5 se ve la rejilla mencionada [45].

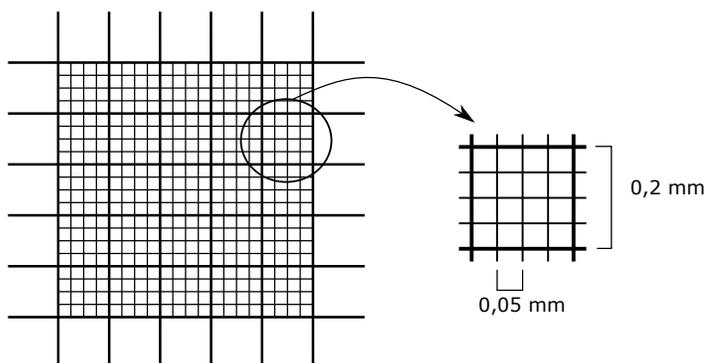


Figura 4.5: Rejilla de la cámara de Neubauer

En particular, la cámara utilizada durante el estudio fue una Neubauer *improved*, la cual tiene una profundidad de 0,02 mm y los cuadrados mas pequeños tienen una arista de 0,05 mm. Con estos datos es posible calcular el volumen de muestra que contiene cada cuadrado y con esto, el factor con el que es posible encontrar la concentración de microorganismos. En la Tabla 4.5 se muestran los volúmenes de cada cuadrado de la rejilla y en la Ecuación 4.4 se muestra la forma de calcular la concentración de microorganismos, donde  $C_b$  representa a la concentración de bacterias en bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ,  $B_c$  a las bacterias contadas dentro del cuadrado y  $F_c$  al factor del cuadrado utilizado para el conteo.

Tabla 4.5: Volumen y factor de cada cuadro en la cámara Neubauer

Tipo de cuadrado	Volumen ml	Factor $F_c$ $\text{ml}^{-1}$
Cuadrado total	$2,00 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^4$
Cuadrado grande	$8,00 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^6$
Cuadrado pequeño	$5,00 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^6$

$$C_b = B_c \cdot F_c \quad (4.4)$$

### 4.5.3. Densidad óptica (concentración de microorganismos)

Las técnicas de dispersión de luz para el monitoreo de la concentración de bacterias (en un cultivo puro) tiene una enorme ventaja, la cual es que es una técnica rápida y no destructiva. Sin embargo, esta técnica no mide el número de células, más bien se registra un valor referente al peso seco de células del cultivo [43].

En esta técnica, con un espectrofotómetro se hace pasar un haz de luz a través de la muestra y se mide la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 600 nm. La luz que es dispersada es un indicador de la cantidad de biomasa presente en la muestra analizada y es directamente proporcional a ésta, cuando la muestra es diluida [43].

Este procedimiento se realizó como una alternativa mas rápida al recuento directo, durante la realización de las curvas de crecimiento del microorganismo estudiado.

### 4.5.4. Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más comúnmente utilizadas para la caracterización de sistemas electroquímicos, sin embargo, no es un experimento adecuado para llevar a cabo análisis cuantitativos [46].

En una voltametría cíclica, el potenciostato aplica sobre el electrodo de trabajo un barrido de potenciales (con una velocidad definida y constante), entre un potencial inicial  $E_i$  hasta un potencial final  $E_f$  y luego vuelve al potencial inicial. Durante el barrido, el potenciostato registra el potencial aplicado al electrodo de trabajo y la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, datos con los que se puede construir el voltamograma del experimento. En la Figura 4.6a se puede observar el potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo en una voltametría de un ciclo, entre los potenciales  $E_i$  y  $E_f$ , y en la Figura 4.6b se muestra su respectivo voltamograma [46].

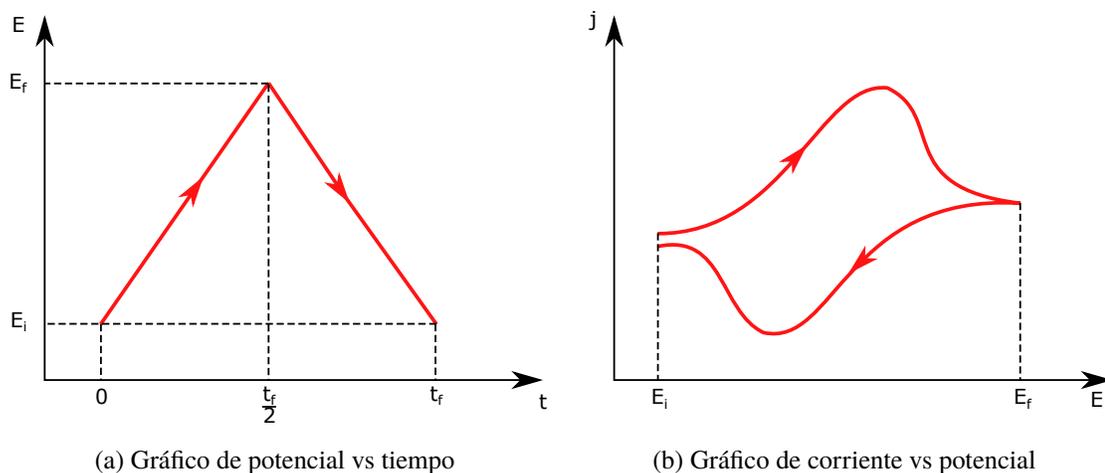


Figura 4.6: Gráficos obtenidos desde una voltametría cíclica

Durante este trabajo se utilizaron las voltametrías cíclicas con dos propósitos. En un principio, se llevaron a cabo para determinar el rango de potenciales utilizados durante las pruebas de acción catalítica de los microorganismos. Una vez que se determinaron los potenciales a utilizar, se realizaron voltametrías cíclicas con el fin de determinar si existía acción catalítica de los microorganismos en la generación de corriente al aplicar potenciales anódicos sobre el electrodo de trabajo.

#### 4.5.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE)

Para poder comprender esta técnica, primero se debe entender el concepto de impedancia. Cuando se trabaja con corriente directa (un caso especial de la corriente alterna, donde la frecuencia es 0 Hz) se puede utilizar la ley de Ohm para calcular la resistencia de un sistema, conociendo la corriente y el potencial. Pero cuando se trabaja con corriente alterna surge el término de impedancia, la que es la resistencia (en función de la frecuencia) al paso de corriente en un sistema. En la Ecuación 4.5 se ve un análogo de la ley de Ohm para cuando se trabaja con corriente alterna, donde  $Z_\omega$  corresponde a la impedancia,  $E_\omega$  corresponde al potencial dependiente de la frecuencia y  $I_\omega$  corresponde a la corriente dependiente de la frecuencia [47].

$$Z_\omega = \frac{E_\omega}{I_\omega} \quad (4.5)$$

La espectroscopia de impedancia electroquímica es una técnica no destructiva, en la cual se aplican pequeñas perturbaciones sinusoidales (ya sea de potencial o corriente) con una frecuencia fija, esto se realiza en un rango de frecuencias fijadas previamente. En este procedimiento se obtienen diversos valores de impedancia, los cuales tienen una parte real  $Z_{real}$  y una parte imaginaria  $Z_{imag}$  y estos resultados pueden presentarse en forma de dos gráficos: un gráfico de Bode (Figura 4.7a) y un gráfico de Nyquist (Figura 4.7b) [47, 48].

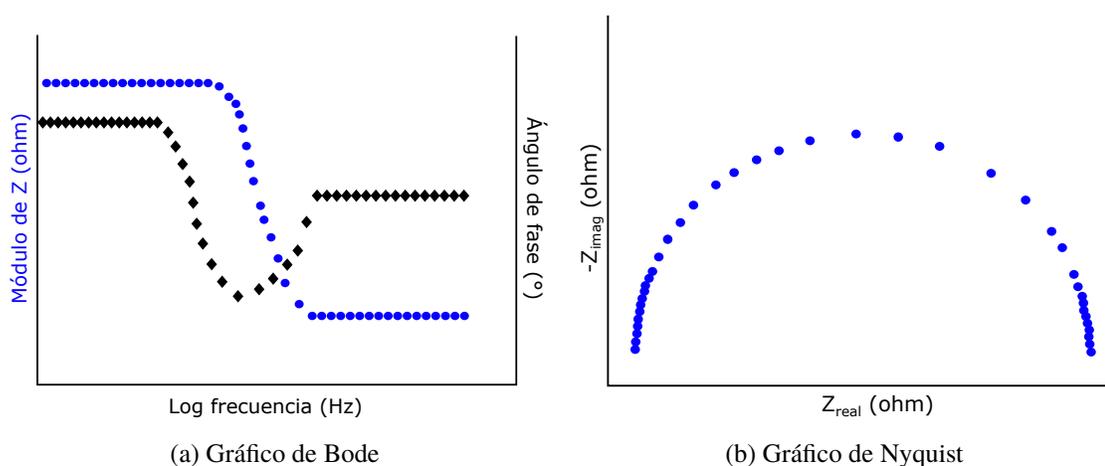


Figura 4.7: Gráficos obtenidos desde una espectroscopia de impedancia electroquímica

Una celda electroquímica puede ser modelada como una red de elementos pasivos de un circuito eléctrico, por lo que para analizar los datos entregados por esta técnica se construye un circuito

equivalente, donde cada componente de éste (sea una resistencia, un capacitor o un inductor, entre otros) están asociados a un fenómeno que ocurre dentro de la celda [48].

Durante este estudio se utilizó la espectroscopia de impedancia electroquímica con el fin de estudiar los fenómenos que ocurren en el ánodo de la celda (tales como la transferencia de carga o el fenómeno de doble capa eléctrica), y el efecto que tienen los microorganismos (sean adheridos al electrodo o en solución) sobre estos fenómenos.

#### **4.5.6. Microscopia electrónica de barrido**

La microscopia electrónica de barrido es una técnica no destructiva, en la cual se hace incidir un haz de electrones de energía entre 20 y 30 keV, de forma que el haz interactúe con la muestra y genere señales que puedan ser captadas por el equipo. Procesando estas señales, es posible formar una imagen, la que puede tener un aumento de entre 10x y 100.000x, dependiendo del equipo utilizado [49].

Esta técnica se utilizó con los propósitos de observar la estructura del carbono vítreo reticular y luego ver si efectivamente existen bacterias adheridas al electrodo, luego de realizar cultivos con éste en su interior. Es importante destacar que las muestras deben ser secadas antes de ingresar al equipo, ya que la baja presión en el microscopio causará que el agua se evapore y altere la estructura de la muestra a analizar. Por esta razón, las muestras fueron sometidas a una fijación con glutaraldehído, un secado a punto crítico<sup>8</sup> y, finalmente, a un metalizado con oro.

---

<sup>8</sup>El secado a punto crítico se basa en el principio de que a ciertas condiciones de presión y temperatura (el punto crítico), un fluido iguala la densidad de su fase líquida con la de su vapor, haciendo indistinguible la interfase. Bajo estas condiciones es posible retirar todo el fluido sin causar ningún daño a la estructura de la muestra [50].

# Capítulo 5

## Resultados y discusiones

### 5.1. Diseño de celda electroquímica utilizada

Para llevar a cabo los experimentos electroquímicos de una celda de combustible microbológica, se diseñó un sistema de doble cámara; en la Figura 5.1 se puede ver un esquema de ésta. Es importante mencionar que esta celda fue diseñada para trabajar con la bacteria *Geobacter sulfurreducens*, es por esto que algunas características de la celda se decidieron en base a las necesidades de este microorganismo.

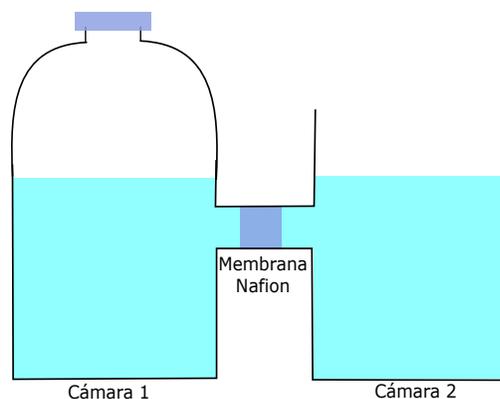


Figura 5.1: Esquema de la celda electroquímica utilizada en el estudio

La decisión de trabajar en dos cámaras distintas se tomó debido a que, como se mencionó en la Sección 3.1, *G. sulfurreducens* es una bacteria anaeróbica, por lo que para trabajar en una celda de combustible el microorganismo necesita un ambiente en el que no haya oxígeno. Por otro lado, como se dijo en la Sección 1.5, la reacción que ocurre en el cátodo de la celda es la reducción de oxígeno, por lo que es necesaria la presencia de oxígeno disuelto en las cercanías del cátodo. Una celda de doble cámara permitiría mantener estos dos ambientes para así asegurar el buen funcionamiento del sistema.

Otro factor importante para la elección de un sistema de doble cámara, es que en una celda de combustible microbológica se utilizan soluciones distintas (anólito y católito) para cada electrodo.

Es importante mantener separado el anolito del cátodo, debido a que esta solución se trataría del agua residual, la que contiene diversas especies que podrían desencadenar reacciones no deseadas en el cátodo.

Como se muestra en el esquema, se diseñó un sello tipo vial para la cámara 1. Esto se utilizó para evitar el ingreso de oxígeno a esta cámara de la celda, además, de esta forma no se necesitará un suministro constante de nitrógeno mientras se realicen las pruebas, ya que bastará con retirar el oxígeno presente en el medio solo una vez.

El último componente importante del diseño es la membrana que separa ambas cámaras de la celda. Para realizar las pruebas del estudio se eligió una membrana de intercambio protónico Nafion<sup>®</sup> (específicamente el tipo Nafion<sup>®</sup> 117), debido a que el ion intercambiado en la celda es un protón. Además, esta membrana no permite el paso de otros aniones o cationes entre ambas cámaras de la celda [51].

Como se indica en las Secciones 3.5 y 5.3, la bacteria con la que se realizaron las pruebas finalmente fue *Acidiphilium cryptum*, por lo que se debió analizar si esta celda diseñada sería compatible con este microorganismo. Al estudiar las características de *A. cryptum* se encontró que ésta debe utilizar el ion férrico como mediador, por lo tanto, es necesario contar con una membrana para evitar que este ion pase a la cámara donde se encuentre el cátodo de la celda.

La membrana Nafion<sup>®</sup> con la que cuenta el modelo diseñado cumple con el objetivo antes mencionado. Por otro lado, el sello tipo vial también será de utilidad, ya que al evitar que exista oxígeno en el ánodo se podrá favorecer la reducción del mediador (por parte de la bacteria) por sobre la del oxígeno, y así aumentar la corriente generada en la celda electroquímica.

Cabe destacar que esta celda fue diseñada con el fin de usarla como celda de combustible, contando con una cámara anódica (cámara 1) y una catódica (cámara 2). Sin embargo, para realizar las impedancias de espectroscopia electroquímica y las voltametrías cíclicas es necesario el uso de un electrodo de referencia. Por esto, al realizar las pruebas mencionadas, se utilizó la cámara 2 como el compartimiento con el electrodo de trabajo (ánodo) y el de referencia, donde se burbujeó constantemente el anolito con nitrógeno, para así evitar la presencia de oxígeno (ver Sección 4.4.4). Por su parte, el contraelectrodo (cátodo) fue puesto en la cámara 1, la cual se mantuvo abierta al aire.

## 5.2. Diseño del electrodo de trabajo

Uno de los componentes más importantes en una celda de combustible microbiológica es el ánodo. Para construir los electrodos de trabajo utilizados a lo largo del estudio, se decidió utilizar carbono vítreo reticular. Esto se hizo por dos razones principales: su bajo costo, con respecto a materiales metálicos (como platino), y la porosidad que presenta este material (como se mencionó en la Sección 3.3).

En una celda electroquímica, la porosidad del material puede favorecer la generación de corriente, debido a que genera una mayor superficie activa. Además, en el caso de las celdas de combustible microbiológicas, las bacterias tendrán una mayor superficie disponible para generar un biofilm.

Para observar la estructura de este material se realizaron microscopías electrónicas de barrido de su superficie. En la Figura 5.2a se pueden ver los poros del material y sus respectivas dimensiones, mientras que en la Figura 5.2b se muestran las fibras que lo conforman y la medida de su ancho.

Al analizar el tamaño de los poros se pudo comprobar que las bacterias podrían utilizar toda la superficie del electrodo, ya que el tamaño de los microorganismos<sup>9</sup> es considerablemente menor al de los poros, por lo que estos no tendrían problemas en difundir hacia el interior del CVR. Además, las fibras del material son suficientemente anchas para que las bacterias puedan adherirse sobre éstas sin problemas.

Otro de los parámetros importantes que se debe tener en cuenta al momento de diseñar un electrodo es su conductividad eléctrica. Para obtener la conductividad del material utilizado se usó el método de las cuatro puntas (ver Secciones 4.2.1 y 4.5.1). En la Figura 5.3 se muestran las curvas de potencial vs corriente obtenidas al realizar las voltametrías cíclicas con ambas configuraciones del método (ver Sección 4.2.1).

En el gráfico también se puede ver el ajuste lineal de estas curvas donde, como se mencionó en la Sección 4.3, la pendiente de la recta corresponde a la resistencia de cada configuración utilizada. Con estos datos, y utilizando las ecuaciones planteadas por Van der Pauw (ver Sección 4.5.1), se pudo calcular la conductividad del material, la cual resultó ser  $1,11 \cdot 10^4 \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$ .

Cabe destacar que el valor calculado para la conductividad pudo haberse visto afectado por la porosidad del material. Esto puede haber ocurrido ya que al conectar los cables a la muestra, éstos pudieron haber quedado en contacto con aire, lo que finalmente podría aumentar la resistencia en la medición. Sin embargo, el valor obtenido es menor al reportado para el carbono vítreo no poroso, pero del mismo orden de magnitud, lo que es esperable para materiales porosos en comparación con el mismo material no poroso [52]. Por esto, se creyó que la conductividad obtenida es la correcta.

Por último, mediante un análisis BET se obtuvo que este material tiene un área superficial de  $70 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Este parámetro es superior al de otros materiales utilizados en este tipo de tecnologías, como las esponjas de carbón o de grafito<sup>10</sup>, lo que representa una gran ventaja sobre estos, ya que en una menor masa se tendrá un área mayor para que los microorganismos puedan adherirse y generar un biofilm.

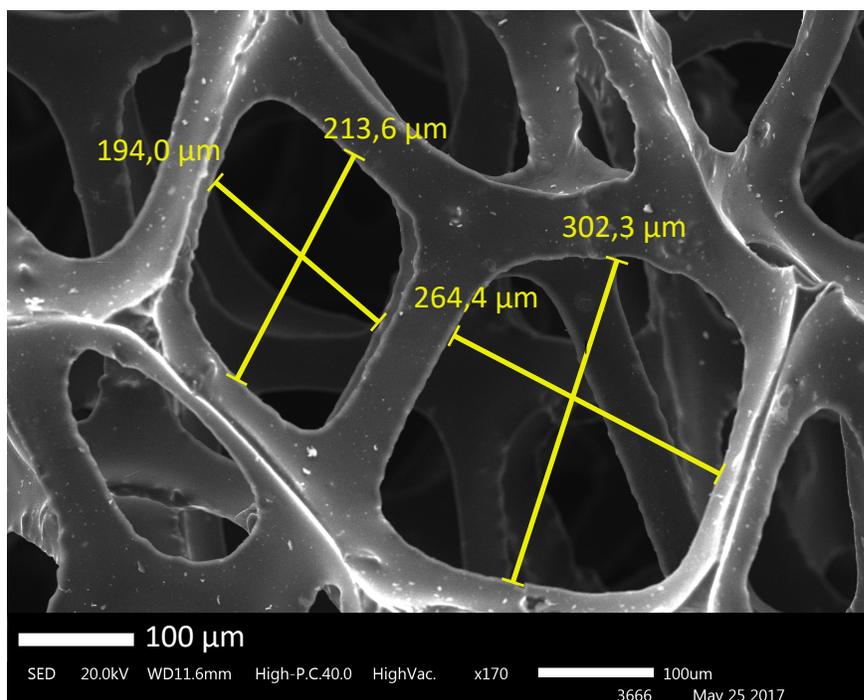
### 5.3. Cultivos microbiológicos

Al inicio de este trabajo, la bacteria seleccionada para realizar los experimentos era *Geobacter sulfurreducens*, debido a su capacidad de transferir electrones de forma directa al electrodo y su amplio uso en este tipo de tecnologías [15]. Sin embargo, al realizar los cultivos se tuvieron diversas dificultades, entre las que se pueden mencionar: el complejo medio de cultivo en el cual se desarrolla este microorganismo (ya que es un medio de cultivo con una gran cantidad de especies [54]), la dificultad de realizar sus cultivos (se debían mantener sin oxígeno durante su preparación y crecimiento) y su largo tiempo de duplicación (debido a que es una bacteria anaeróbica). Estos

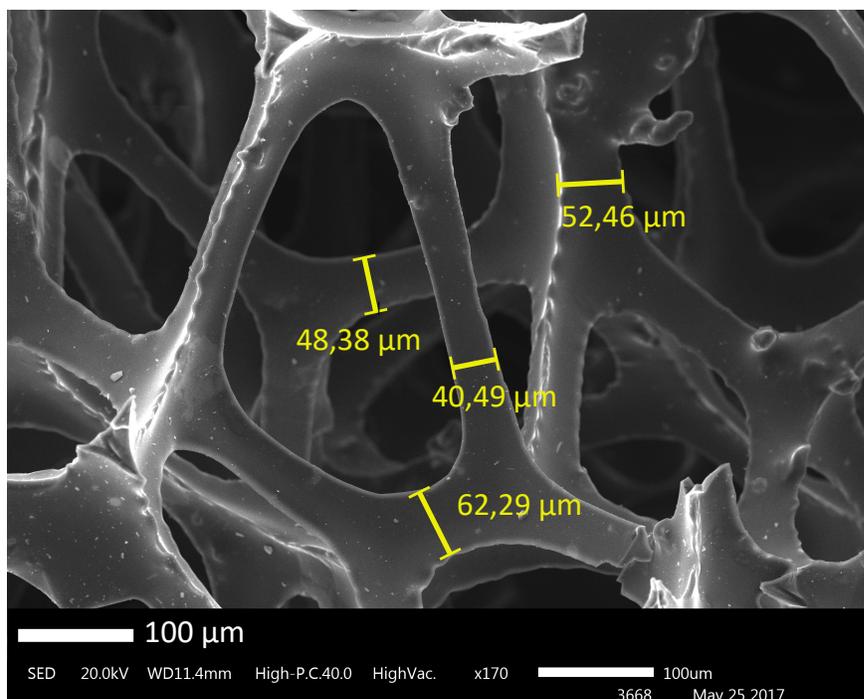
---

<sup>9</sup>El tamaño de los microorganismos puede estar entre los 0,5 y 10  $\mu\text{m}$  [20].

<sup>10</sup>Ambos tienen  $0,12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , aproximadamente [53].



(a) Medida de poros



(b) Medida de fibras

Figura 5.2: Imágenes de MEB al carbono vítreo reticular

factores causaron que los cultivos desarrollados tomaran bastante tiempo en ser llevados a cabo y, además, no se hayan obtenido resultados reproducibles. Es por esto que se decidió buscar otro microorganismo con el cual trabajar dentro de la celda.

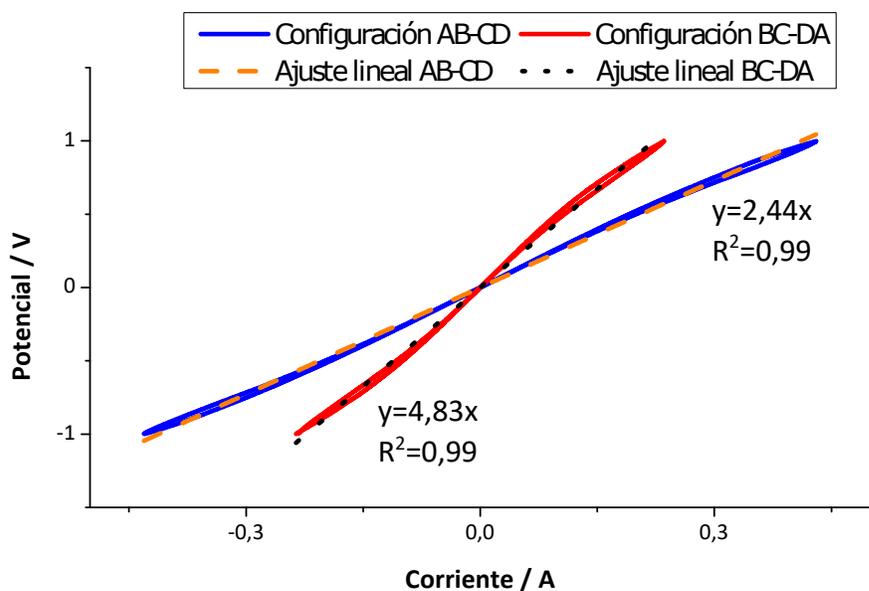


Figura 5.3: Curvas de potencial vs corriente obtenidas con configuraciones AB-CD y BC-DA

La bacteria elegida para reemplazar *G. sulfurreducens* fue *Acidiphilium cryptum*. La decisión se basó principalmente en las condiciones de crecimiento de esta bacteria, entre las que se pueden encontrar que es una bacteria aeróbica y que se desarrolla a temperaturas cercanas a los 30 °C. Estas condiciones son más cercanas a las utilizadas en el proceso de tratamiento de aguas, por lo que su aplicabilidad industrial puede ser más factible que la de *Geobacter sulfurreducens*. Además, este microorganismo es capaz de oxidar glucosa, compuesto orgánico presente en las aguas residuales.

Para comenzar el trabajo microbiológico se realizó la curva de crecimiento de este microorganismo, con el fin de poder identificar las etapas de su crecimiento y utilizar esta información en las pruebas posteriores. En la Figura 5.4a se puede ver la curva de crecimiento obtenida cuando se utilizó el recuento directo (ver Sección 4.5.2) como técnica para calcular la concentración de microorganismos.

Analizando la curva, se pudo apreciar la ausencia de una fase lag (o de duración despreciable) en el cultivo, por lo que la bacteria comenzó rápidamente su crecimiento exponencial. Al linealizar la sección de datos que podría corresponder a esta última fase, se encontró que el microorganismo tenía una velocidad específica de crecimiento de  $0,056 \text{ h}^{-1}$  y el ajuste tuvo un coeficiente de determinación de 0,98, lo que confirmó que estos puntos correspondían a la fase de crecimiento exponencial.

Para facilitar el conteo de microorganismos al construir la curva de crecimiento, se usó como alternativa para la cuantificación de bacterias la técnica de densidad óptica, ya que éste es un procedimiento bastante más rápido de realizar que el recuento al microscopio. En la Figura 5.4b se muestra la curva de crecimiento obtenida con este procedimiento.

Desde la curva realizada con densidad óptica se obtuvo que la velocidad específica de crecimiento es de  $0,052 \text{ h}^{-1}$ , resultado que es bastante similar al obtenido utilizando el recuento directo. Las leves diferencias que se encuentran pueden ser causadas por los errores asociados a cada uno de estos métodos como, por ejemplo la adherencia de bacterias a la superficie de la cámara o a las paredes de

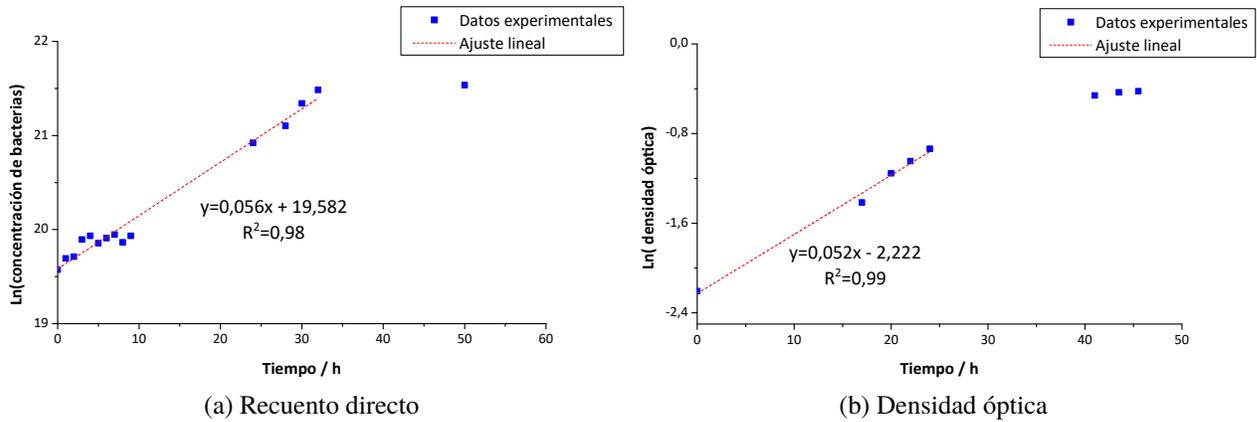


Figura 5.4: Curvas de crecimiento de *Ac. cryptum* utilizando: (a) recuento directo, y (b) densidad óptica

la cubeta del espectrofotómetro. Cabe destacar que la medición de densidad óptica hace referencia al peso seco de la muestra, pero cuando se trabaja con una baja concentración de microorganismos y todos estos son del mismo tamaño, ésta puede ser asociada a la cantidad de microorganismos presentes en la muestra. Viendo la similitud entre ambos resultados, se decidió continuar utilizando la densidad óptica como método de cuantificación de bacterias.

Debido a que el microorganismo fue utilizado en la celda con un medio de cultivo que tenía presente un mediador (ion férrico), se realizó una curva de crecimiento con esta solución para estudiar si el mediador tenía algún efecto sobre el desarrollo del cultivo. En la Figura 5.5 se ve la comparación entre las curvas de crecimiento con y sin el mediador.

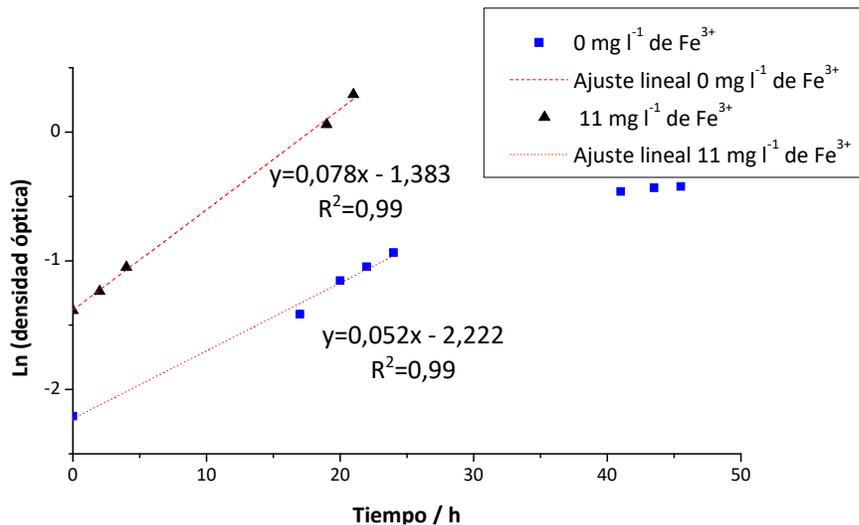


Figura 5.5: Curvas de crecimiento de *Ac. cryptum* con y sin mediador determinadas utilizando el método de densidad óptica

Al comparar ambas curvas, se pudo ver claramente que el ion férrico tuvo un efecto sobre la velocidad específica de crecimiento, ya que ésta llegó a un valor de  $0,078 \text{ h}^{-1}$  (1,5 veces su valor sin el mediador). La principal razón de este incremento es que la bacteria tiene la capacidad de

reducir el ion férrico [27], por lo que el mediador actuó como otro receptor de los electrones de su metabolismo (aparte del oxígeno), lo que finalmente aceleró su crecimiento. Otro resultado que se encontró al realizar la curva es que, al igual que en el caso sin mediador, se observó que la bacteria iniciaba rápidamente su fase de crecimiento exponencial; por esto último y considerando el Gráfico 5.5, se decidió realizar las pruebas en la celda con inóculos del microorganismo que tuvieran menos de 30 horas de crecimiento, ya que en estos tiempos la bacteria todavía se encontraría en su fase exponencial.

## 5.4. Determinación de parámetros para voltametrías cíclicas

Para realizar los experimentos electroquímicos del estudio, lo primero que se debió hacer fue determinar el rango de potenciales que sería barrido en las voltametrías cíclicas. Para esto, se llevaron a cabo voltametrías entre potenciales de -0,5 y 1,5 V (durante todo el estudio se utilizó como referencia el electrodo de Ag|AgCl, KCl 3 M, por lo que todos los potenciales mencionados son en referencia a éste). Se decidió comenzar con estos valores debido a que en este rango de potenciales no deberían ocurrir las reacciones de evolución de hidrógeno u oxígeno (las que se muestran en las Reacciones 5.1 y 5.2, respectivamente [18]), o éstas no tendrían una influencia significativa en el voltamograma obtenido. En la Figura 5.6 se muestra un voltamograma que resume las voltametrías cíclicas realizadas con inóculos de bacterias a distintos tiempos de crecimiento (la celda fue preparada como se muestra en el protocolo presentado en la Sección 4.4.4).

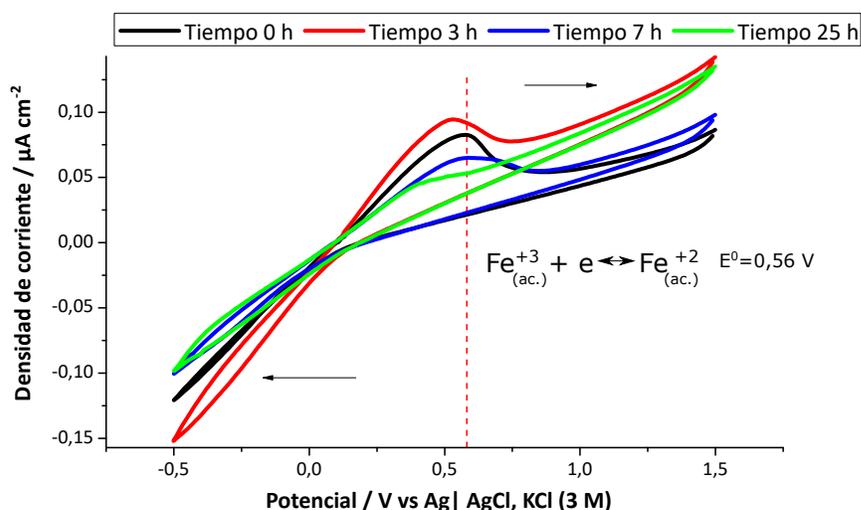
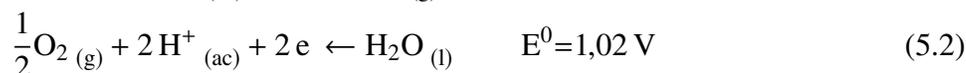
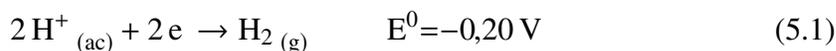


Figura 5.6: Voltamograma con inóculo de bacterias a distintos tiempos de crecimiento

En el voltamograma se puede ver que no hay una tendencia clara entre cada una de las curvas, sin embargo, todas coinciden en tener un pico cercano a los 0,5 V. Como se mencionó en la Sección

3.1, el microorganismo utilizado tiene la capacidad de producir el ion ferroso (al reducir férrico), por lo que la presencia de este elemento puede ser la principal causa de la aparición de este pico, ya que el potencial en el que se registra es cercano al potencial estándar de la oxidación de este ion (0,56 V).

Sin embargo, en las curvas se puede notar que ocurrieron reacciones catódicas a potenciales bajo 0,1 V, donde se podrían haber generado otras especies electroactivas (entre ellos ferroso, generado de forma electroquímica) que posteriormente reaccionaron a potenciales más anódicos. Esto también puede ser la causa de que los ciclos de cada una de las voltametrías haya sido distinto, como se puede ver en la Figura 5.7 que corresponde al voltamograma del experimento realizado con un inóculo de 7 horas de crecimiento.

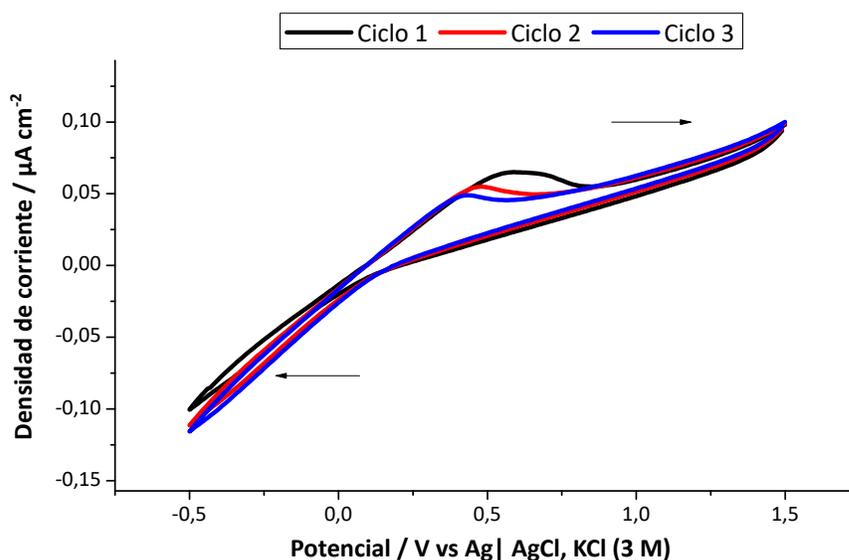


Figura 5.7: Voltamograma con inóculo de 7 horas de crecimiento

En el Anexo A se pueden ver los resultados de las voltametrías realizadas con los inóculos de 0, 3 y 25 horas, donde se observa el mismo comportamiento descrito para el experimento de 7 horas. Con el fin de evitar que ocurran estas reacciones no deseadas, se decidió realizar los barridos de las voltametrías cíclicas entre los potenciales de 0,1 y 1 V.

Una vez definido el nuevo rango a utilizar se llevaron a cabo dos series de voltametrías cíclicas, en la primera se utilizaron inóculos de un cultivo en sus primeras horas de crecimiento y en la segunda los inóculos para la celda fueron tomados de otro cultivo, a partir de las 13 horas de crecimiento. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 5.8a y 5.8b, respectivamente.

Es importante destacar que los resultados cuantitativos de los experimentos realizados a partir de cultivos distintos no son comparables entre sí, ya que al comenzar los cultivos con distinta cantidad de microorganismos, a un determinado tiempo ambos no tendrán la misma concentración bacteriana, por lo que el efecto catalítico no será el mismo. Lo que sí se puede comparar es la tendencia entre las curvas obtenidas con inóculos provenientes del mismo cultivo.

Al analizar las curvas obtenidas con los inóculos de un cultivo en sus primeras horas de crecimiento, se puede ver cómo la corriente obtenida disminuye al aumentar la concentración de

microorganismos en la celda, aunque las corrientes son mayores al caso del tiempo de crecimiento de 0 horas. Una de las causas de este comportamiento de la corriente puede ser que las bacterias, además de actuar como un catalizador, también se depositen sobre el electrodo de trabajo y de esta forma disminuyan la superficie del carbón utilizado, lo que finalmente causa que la corriente sea mayor a la inicial, pero al aumentar la concentración de bacterias, ésta vaya disminuyendo.

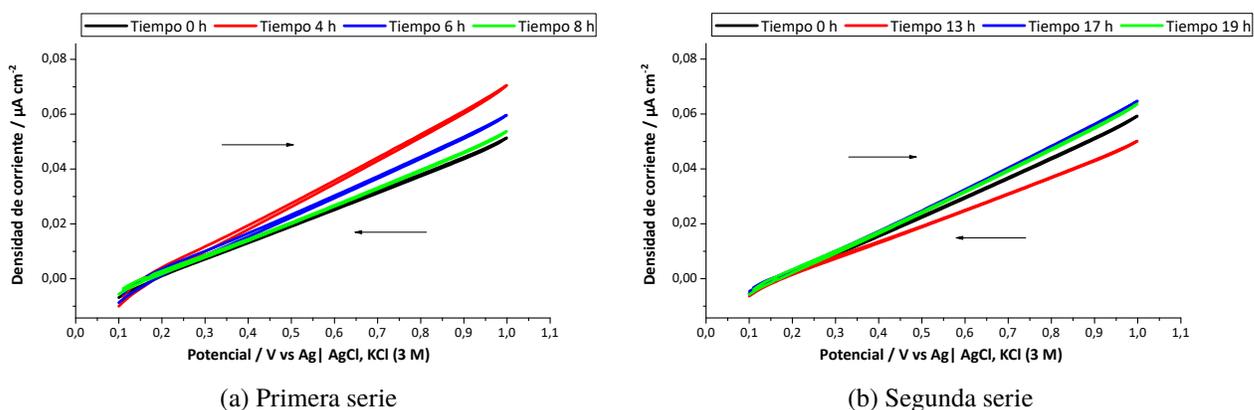


Figura 5.8: Voltametrías realizadas con el nuevo rango de potenciales

Cuando se analizó la segunda serie de experimentos, el comportamiento observado fue distinto al primero. En estas voltametrías no se puede observar una clara tendencia en los resultados, ya que la corriente obtenida con el inóculo de 13 horas de crecimiento es menor que la corriente inicial, pero al utilizar un inóculo de mayor tiempo de crecimiento, la corriente es mayor. Este comportamiento se puede deber a que las bacterias dentro de la celda precipiten al fondo de ésta a causa de la falta de agitación; lo que finalmente podría causar que, a pesar de que el inóculo utilizado tenga una mayor concentración de bacterias, los microorganismos en la celda no aumenten de un experimento a otro y, por ende, no se vea el efecto catalítico.

La precipitación de bacterias también puede haber sido la causa del comportamiento visto en el primer caso. La diferencia con el segundo se puede deber a la formación de cúmulos de bacterias en las mediciones con un mayor tiempo de crecimiento. Estos cúmulos pueden tener distintos tamaños en cada caso, lo que podría explicar que las curvas obtenidas no sigan una tendencia clara, ya que cúmulos de mayor tamaño precipitarán más rápido que los de un tamaño menor. Para evitar que esto ocurra, se decidió llevar a cabo los experimentos posteriores con agitación a velocidad media, realizando ésta con un agitador magnético.

## 5.5. Mediciones electroquímicas con bacterias en solución

Una vez que se determinaron los parámetros a utilizar en las voltametrías cíclicas, éstas se llevaron a cabo, en primer lugar, inoculando la celda utilizada. En base a los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento y las primeras voltametrías realizadas, se decidió utilizar inóculos de un cultivo con tiempos de crecimiento de 0, 4, 6 y 8 h, debido a que a estos tiempos la bacteria ya se encuentra en su etapa de crecimiento exponencial y, además, es posible apreciar diferencias en los resultados obtenidos en cada caso. En la Figura 5.9 se puede ver el resumen de los voltamogramas

obtenidos con los inóculos antes mencionados.

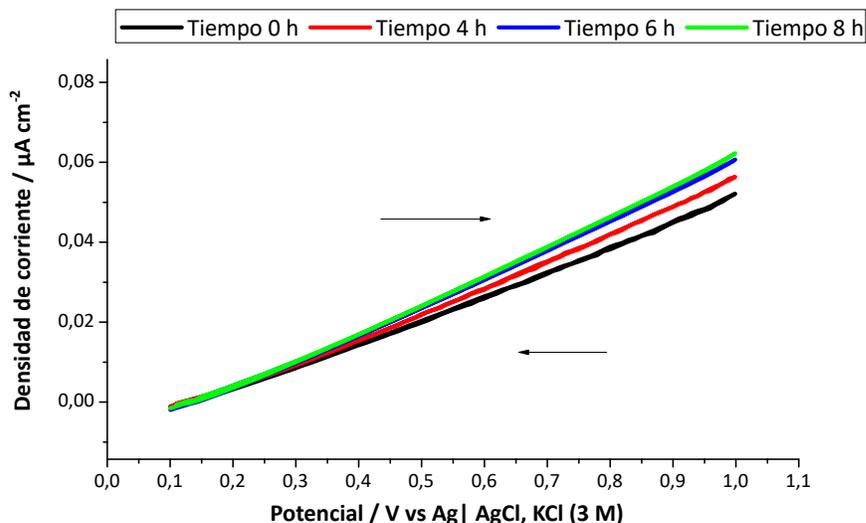


Figura 5.9: Voltametrías cíclicas con inóculos a distintos tiempos de crecimiento

En el gráfico se puede apreciar claramente una tendencia entre las curvas obtenidas, donde la corriente aumentó cuando la concentración de microorganismos en el medio era mayor. La corriente anódica generada se debió a la oxidación de las moléculas de glucosa presentes en la celda, ya que el potencial estándar de esta reacción es  $-0,119$  V, por otro lado, el aumento de corriente entre las curvas ocurrió por la acción de las bacterias, ya que éstas actuaron como un catalizador en la oxidación del orgánico y generaron un mayor flujo de electrones, ya sea transfiriendo los electrones de forma directa al electrodo, o generando otras especies electroactivas (ion ferroso) que fueran oxidadas en los potenciales a lo que se trabajó.

Con el fin de complementar estos resultados, se llevaron a cabo espectroscopías de impedancia electroquímica (EIE) —previas a la voltametría cíclica— para evaluar el efecto de los microorganismos en la electroactividad del electrodo de trabajo. En la Figura 5.10 se muestra el gráfico de Nyquist resultante de la EIE realizada a la celda con un inóculo de 4 horas de crecimiento.

Para poder interpretar los resultados obtenidos se planteó un circuito equivalente, el cual fue adaptado desde un modelo planteado por el fabricante del potenciostato para una celda de combustible, y se denominó como modelo 1 (ver Figura 5.11). Este modelo cuenta, en primer lugar, con una inductancia, la cual puede modelar todo problema de conexión que pueda existir en el sistema. Luego viene una resistencia, la que está relacionada con la resistencia del electrolito utilizado en las pruebas y, finalmente, se tiene una resistencia en paralelo con un elemento de fase constante, los que modelan la resistencia a la transferencia de carga y el fenómeno de doble capa eléctrica, respectivamente.

En la Figura 5.12 se aprecia el resultado del ajuste del circuito planteado a los datos experimentales mostrados en la Figura 5.10, mientras que en el Anexo B se encuentran los datos experimentales para los casos con inóculos de 0, 6 y 8 horas de crecimiento, con su respectivo ajuste al modelo 1<sup>11</sup>. Se puede ver que el modelo se ajusta bien a los datos experimentales, teniendo un coeficiente

<sup>11</sup>El ajuste se realizó mediante el programa *Gamry Echem Analyst*, programa complementario del potenciostato utilizado.

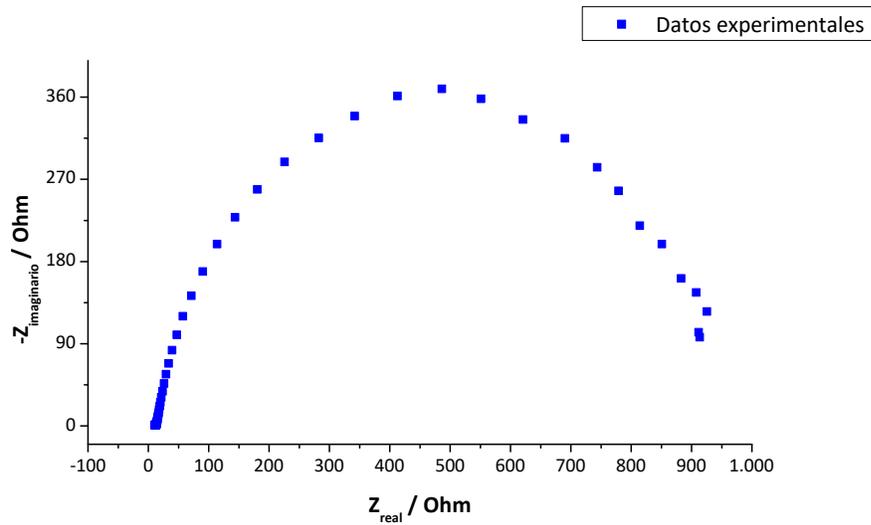


Figura 5.10: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 4 horas de crecimiento

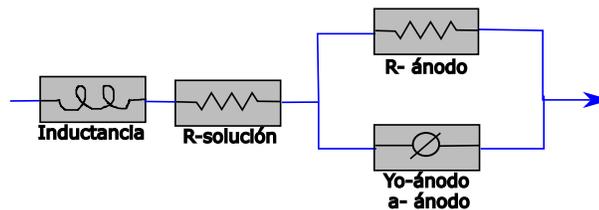


Figura 5.11: Circuito equivalente modelo 1

de determinación de 0,99, por lo que, en primera instancia, se utilizó este modelo para analizar los resultados de las EIE realizadas a la celda con los inóculos a distintos tiempos de crecimiento. En la Tabla 5.1 se pueden ver los valores de las constantes asociadas a cada elemento del circuito planteado para los experimentos realizados con inóculos de 0, 4, 6 y 8 horas de crecimiento.

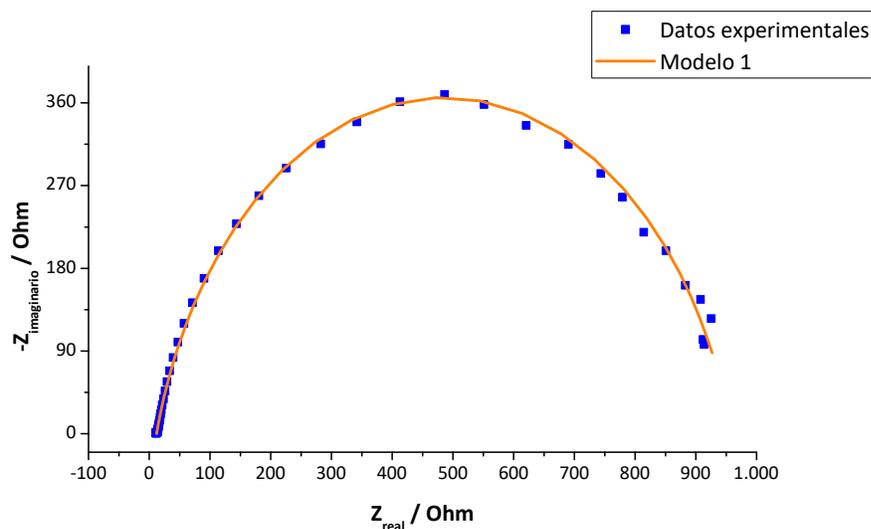


Figura 5.12: Ajuste del modelo 1 a los datos experimentales

Lo primero que se notó en estos resultados es el bajo valor que tenía la inductancia, lo que

Tabla 5.1: Resultados del ajuste al modelo 1

Tiempo de crecimiento /h	Inductancia /H	R-solución /Ohm	R-ánodo /Ohm	Y <sub>0</sub> -ánodo /S·s <sup>a</sup>	a-ánodo	R <sup>2</sup>
0	$6,89 \cdot 10^{-11}$	$1,17 \cdot 10^1$	$6,46 \cdot 10^2$	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$8,14 \cdot 10^{-1}$	0,99
4	$8,96 \cdot 10^{-12}$	$1,20 \cdot 10^1$	$9,47 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$8,37 \cdot 10^{-1}$	0,99
6	$1,69 \cdot 10^{-11}$	$1,26 \cdot 10^1$	$8,25 \cdot 10^2$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$8,48 \cdot 10^{-1}$	0,99
8	$2,72 \cdot 10^{-11}$	$1,30 \cdot 10^1$	$8,54 \cdot 10^2$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$8,41 \cdot 10^{-1}$	0,96

podría significar que los problemas de conexión fueron despreciables. Por esto, antes de analizar los demás resultados, se planteó un nuevo circuito equivalente similar al anterior, pero retirando la inductancia, a éste se le llamó modelo 2 (ver Figura 5.13). En la Figura 5.14 se puede ver el ajuste de este nuevo modelo sobre los datos experimentales mostrados en la Figura 5.10 y el ajuste al modelo 1.

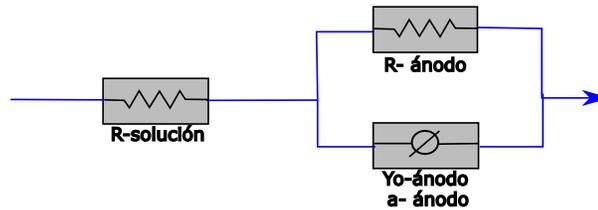


Figura 5.13: Circuito equivalente modelo 2

En el gráfico de Nyquist se aprecia que el modelo 2 se ajustó de igual manera a los datos experimentales que el modelo 1. En base a esto, se decidió utilizar el modelo 2 para llevar a cabo el análisis de las EIE realizadas a lo largo del estudio. Cabe mencionar que el modelo elegido es bastante similar al de Randles, sin embargo, el modelo planteado tiene un elemento de fase constante en vez de la capacitancia asociada por Randles al fenómeno de doble capa eléctrica [47]. En este caso este cambio puede ser asociado a 2 razones principales; en primer lugar, está la estructura porosa del electrodo de trabajo utilizado, ya que la capacitancia es utilizada en el caso de que el electrodo sea plano; el otro motivo está relacionado con el diseño del electrodo, ya que al colocar el cable de cobre por la parte superior, se pudo generar una distribución de corriente no homogénea en la superficie del electrodo, lo que finalmente puede causar que la doble capa eléctrica generada en el CVR no sea igual en toda su superficie y no pueda ser modelada por una capacitancia.

En el anexo C se muestran los gráficos obtenidos con los inóculos de 0, 6 y 8 horas y su respectivo ajuste al modelo 2. Para analizar los resultados de las EIE se obtuvieron los valores asociados a cada elemento del modelo 2, los que se muestran en la Tabla 5.2.

Al observar los parámetros asociados al elemento de fase constante (Y<sub>0</sub>-ánodo y a-ánodo), se puede ver que estos no tuvieron mayores variaciones entre un experimento y otro. Con este resultado se pudo comprender que el fenómeno de doble capa eléctrica puede ser modelado por un elemento de fase constante, y no por una capacitancia, debido a la estructura porosa del electrodo de trabajo y no debido a una distribución de carga no homogénea en éste, ya que si éste hubiera sido el caso, en cada experimento la distribución de carga podría haber sido distinta, y con esto, los parámetros del elemento de fase constante habrían variado [55].

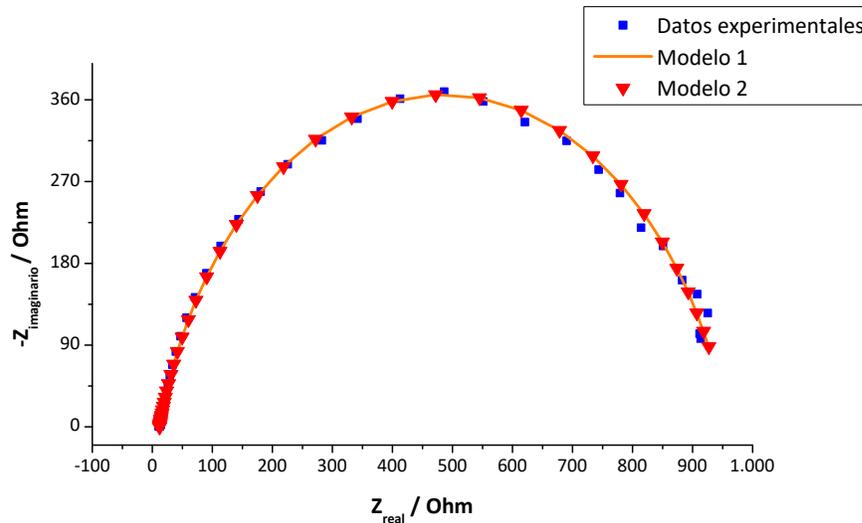


Figura 5.14: Ajuste de los modelos 1 y 2 a los datos experimentales obtenidos con un inóculo de 4 horas

Tabla 5.2: Resultados del ajuste al modelo 2

Tiempo de crecimiento /h	R-solución /Ohm	R-ánodo /Ohm	$Y_0$ -ánodo /S·s <sup>a</sup>	a-ánodo	R <sup>2</sup>
0	$1,17 \cdot 10^1$	$6,46 \cdot 10^2$	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$8,14 \cdot 10^{-1}$	0,99
4	$1,20 \cdot 10^1$	$9,47 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$8,37 \cdot 10^{-1}$	0,99
6	$1,26 \cdot 10^1$	$8,25 \cdot 10^2$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$8,48 \cdot 10^{-1}$	0,99
8	$1,30 \cdot 10^1$	$8,54 \cdot 10^2$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$8,41 \cdot 10^{-1}$	0,96

Los valores que sí tuvieron variaciones entre los experimentos fueron las resistencias, tanto de la solución como del electrodo de trabajo, lo que se puede deber a la variación en la concentración de bacterias en la celda. Con respecto a la resistencia del electrolito, se pudo ver que ésta aumentó a medida que la concentración de microorganismos era mayor, lo que se debería a que los microorganismos en solución dificultan la transferencia de iones en ésta.

Similar es el caso de la resistencia a la transferencia de carga en el electrodo, donde ésta aumenta cuando la concentración de microorganismos lo hace. La razón de este aumento está relacionada con la adherencia de los microorganismos al CVR (como se puede observar en las micrografías discutidas en la Sección 5.7), ya que al estar en la superficie del electrodo (y no ser conductoras como el electrodo) éstas dificultan la transferencia de electrones en él. Es importante notar que la resistencia del cultivo de 4 horas de crecimiento, si bien aumenta con respecto al tiempo 0 horas, no sigue la tendencia de los demás puntos, ya que es mayor a la de los cultivos con más tiempo de crecimiento; esto se pudo deber a una mayor adherencia de bacterias sobre la superficie del electrodo, pero al ver que el valor de la resistencia en el fluido sigue la tendencia de éstas, finalmente, se asoció este punto a un error en la medición que pudo deberse a una mala limpieza del electrodo de trabajo utilizado.

En resumen, la EIE arrojó que las bacterias aumentaron las resistencias en el sistema, sin embargo, la voltametría cíclica mostró que a mayor concentración de bacterias las corrientes obtenidas fueron aumentando. Estos resultados parecieron contradictorios en un principio, ya que al aumentar la

resistencia debería disminuir la corriente, sin embargo, el efecto catalítico de las bacterias tiene una influencia mayor (sobre la corriente generada) que el aumento de las resistencias, por lo que el flujo de electrones es mayor al tener una mayor concentración de microorganismos.

## 5.6. Mediciones electroquímicas con bacterias adheridas al electrodo de trabajo

Luego de realizar los experimentos con bacterias en solución, se llevaron a cabo las mediciones con los microorganismos adheridos al electrodo de trabajo. Para esto, se utilizaron los mismos parámetros de los experimentos electroquímicos discutidos en la Sección 5.5 y los mismos tiempos de cultivo de los microorganismos.

Durante estos experimentos se observaron dos casos distintos. En la Figura 5.15 se muestra el voltamograma que resume los experimentos realizados con electrodos de trabajo extraídos desde cultivos con distintos tiempos de crecimiento, pero que fueron inoculados tomando una alícuota desde el mismo cultivo, como se muestra en el protocolo descrito en la Sección 4.4.5. Es importante mencionar que el electrodo con tiempo de crecimiento de 0 horas corresponde a un electrodo sin bacterias, debido a que se asumió que a ese tiempo no existió adherencia de las bacterias a la superficie.

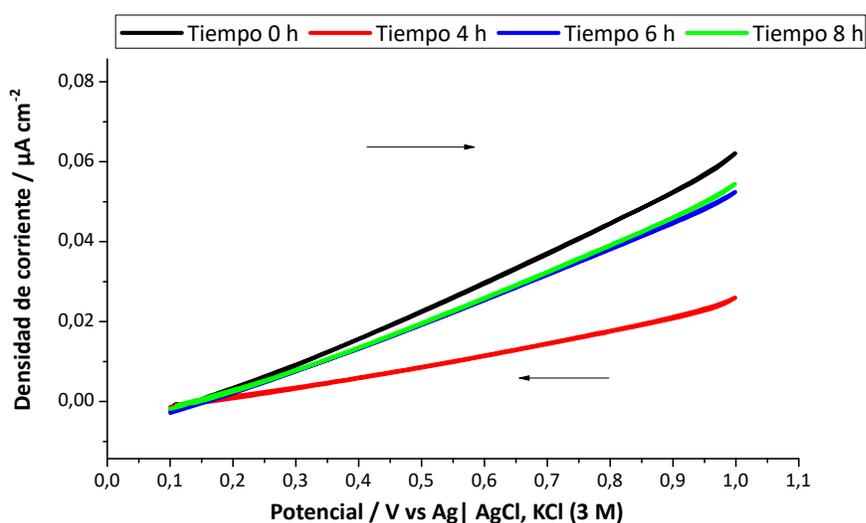


Figura 5.15: Voltametrías cíclicas utilizando electrodos de trabajo con bacterias adheridas, primer caso

Lo primero que se notó en el gráfico es que las corrientes obtenidas con electrodos de trabajo con bacterias son menores al caso sin bacterias, sin embargo, se siguió la tendencia del caso visto en la Sección 5.5, donde la corriente aumentó cuando la concentración de microorganismos era mayor. Al igual que en el caso con bacterias en solución, estas voltametrías fueron complementadas con impedancias de espectroscopía electroquímica para estudiar los fenómenos ocurridos en el electrodo y el efecto de las bacterias en estos. Para interpretar los resultados de las EIE se utilizó el modelo 2 (ver Figura 5.13). En la Tabla 5.3 se listan los parámetros obtenidos del ajuste de los

datos experimentales a este modelo (en el Anexo D se adjuntan los gráficos de Nyquist de las EIE y su respectivo ajuste al modelo utilizado).

Tabla 5.3: Resultados del ajuste al modelo 2, primer caso

Tiempo de crecimiento /h	R-solución /Ohm	R-ánodo /Ohm	$Y_0$ -ánodo /S·s <sup>a</sup>	a-ánodo	Error
0	$1,23 \cdot 10^1$	$1,52 \cdot 10^3$	$7,99 \cdot 10^{-4}$	$8,71 \cdot 10^{-1}$	0,46 %
4	$8,54 \cdot 10^0$	$2,36 \cdot 10^3$	$6,01 \cdot 10^{-4}$	$9,04 \cdot 10^{-1}$	0,15 %
6	$9,14 \cdot 10^0$	$3,19 \cdot 10^3$	$7,08 \cdot 10^{-4}$	$8,54 \cdot 10^{-1}$	0,16 %
8	$1,29 \cdot 10^1$	$2,52 \cdot 10^3$	$7,25 \cdot 10^{-4}$	$8,78 \cdot 10^{-1}$	0,29 %

Al analizar los valores asociados a la resistencia en la solución, se notó que ésta se vio influenciada por las bacterias en el electrodo de trabajo, lo que pudo ser causado por un desprendimiento de éstas desde la superficie donde estaban adheridas. A medida que aumentan los tiempos de cultivo en el electrodo, mayor será el número de bacterias que podrán adherirse a éste, y por esto, mayor será la cantidad de microorganismos que puedan desprenderse al líquido de la celda, una vez que el electrodo se ponga en ella. Esta puede ser la principal razón del aumento de la resistencia a la transferencia de iones que se observó en los experimentos con 4, 6 y 8 horas de cultivo. También es posible que, por la porosidad del electrodo, se haya arrastrado medio de cultivo con bacterias desde el tubo Falcon, lo que podría haber aumentado la concentración de microorganismos en el medio y, por ende, la resistencia de éste.

Sin embargo, el caso del electrodo sin bacterias no siguió esta tendencia, ya que su resistencia es mayor al caso de 4 y 6 horas de cultivo y levemente menor al caso de 8 horas. Esto pudo ser causado porque la solución utilizada en la celda haya contenido una mayor concentración de especies que intervengan en la transferencia de iones, que el electrodo no haya sido correctamente limpiado y haya contribuido con otras especies, o puede haber ocurrido un error de medición durante el experimento.

Con respecto a la resistencia a la transferencia de carga en el electrodo, se puede ver como ésta aumentó a medida que el tiempo de cultivo del electrodo era mayor, lo que pudo ser causado por las bacterias que se encontraban adheridas al electrodo.

Al analizar la resistencia cuando el cultivo era de 8 horas se puede ver un caso distinto, el valor es menor al caso de 6 horas pero mayor al de 4 horas. Este comportamiento se puede entender al comparar con la resistencia en la solución de la celda, donde se puede apreciar que ésta aumenta levemente en el caso de 6 horas con respecto al de 4, pero a las 8 horas de cultivo tiene un significativo aumento con respecto a las 6 horas. Esto pudo ser causado por un mayor desprendimiento de bacterias desde el electrodo con 8 horas de cultivo; en el electrodo habrían menos bacterias que en el caso de 6 horas, pero habrían mas bacterias en solución, lo que explica el comportamiento de las resistencias.

En la tabla se puede ver que los valores asociados al elemento de fase constante tuvieron pequeñas variaciones, las que no tuvieron una tendencia clara. Estas diferencias pueden haber sido causadas por las bacterias adheridas en la superficie del CVR, ya que éstas pueden haber generado cambios en la estructura de la superficie y, de esta forma, afectar la doble capa eléctrica generada.

Con estos resultados se pudo comprender de mejor manera las curvas obtenidas con las voltametrías cíclicas. En los voltamogramas llamó la atención que las corrientes con bacterias fueran menores al caso sin bacterias, lo que pudo ser causado porque las bacterias adheridas al electrodo solo aumentaron la resistencia del sistema y no generaron especies electroactivas. Por otro lado, a medida que aumentaron las bacterias en solución la corriente fue aumentando, ya que éstas generaron especies electroactivas. Con esto, la proporción entre bacterias que generaban y no generaban especies fue aumentando y pudo causar que la corriente aumentara cuando el electrodo de trabajo tenía más horas de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, en este experimento se observaron dos casos distintos. En la Figura 5.16 se puede ver el gráfico que resume los voltamogramas obtenidos cuando se realizaron las voltametrías cíclicas con electrodos de trabajo inoculados con otro cultivo, distinto al utilizado en el primer caso, pero preparados según el mismo procedimiento.

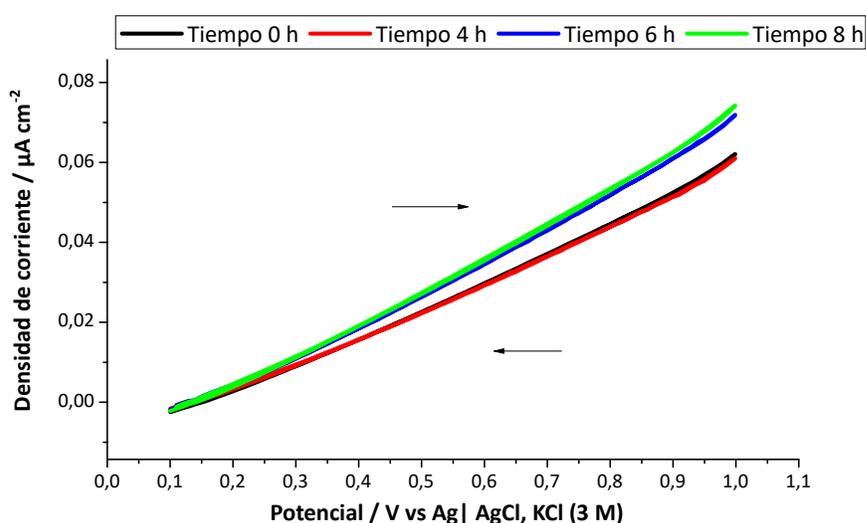


Figura 5.16: Voltametrías cíclicas utilizando electrodos de trabajo con bacterias adheridas, segundo caso

En el voltamograma se puede notar claramente la diferencia con el caso anterior, ya que en el caso de los cultivos de 6 y 8 horas, la corriente es mayor que en el caso sin bacterias (el caso de 4 horas es levemente menor). De igual manera que en los experimentos anteriores, estos resultados fueron complementados con EIE para comprender el efecto que tuvieron las bacterias en la fenomenología del electrodo de trabajo. En el Anexo E se muestran los gráficos de Nyquist de las EIE realizadas, junto con el ajuste del modelo 2, mientras que en la Tabla 5.4 se muestran los parámetros asociados a cada elemento del modelo.

En la tabla se pueden apreciar las mismas tendencias mencionadas y explicadas anteriormente, donde las resistencias de la solución y del electrodo aumentan a medida que la cantidad de microorganismos en estos es mayor. En los parámetros asociados al elemento de fase constante también se observó el mismo efecto del experimento anterior, donde los microorganismos alteraron levemente el valor, debido a que en cada electrodo utilizado la adherencia de las bacterias no es similar.

Al comparar estos resultados con los de la Tabla 5.3, se notó que las resistencias a la transferencia de iones en la solución son mayores en el segundo caso, mientras que la resistencia a la transferencia

Tabla 5.4: Resultados del ajuste al modelo 2, segundo caso

Tiempo de crecimiento /h	R-solución /Ohm	R-ánodo /Ohm	Y <sub>0</sub> -ánodo /S·s <sup>a</sup>	a-ánodo	Error
0	1,23·10 <sup>1</sup>	1,52·10 <sup>3</sup>	7,99·10 <sup>-4</sup>	8,71·10 <sup>-1</sup>	0,46 %
4	1,12·10 <sup>1</sup>	1,58·10 <sup>3</sup>	7,75·10 <sup>-4</sup>	8,83·10 <sup>-1</sup>	0 %
6	1,16·10 <sup>1</sup>	1,87·10 <sup>3</sup>	8·10 <sup>-4</sup>	8,73·10 <sup>-1</sup>	0 %
8	1,31·10 <sup>1</sup>	1,96·10 <sup>3</sup>	8,56·10 <sup>-4</sup>	8,56·10 <sup>-1</sup>	0,01 %

de carga es mayor en el primero. Como se mencionó antes, el número de bacterias tiene un efecto en las resistencias del sistema, por lo que las diferencias entre los experimentos se explicarían porque en el primero se tenía una mayor cantidad de bacterias adheridas al electrodo, mientras que el segundo tenía la mayoría en solución.

El comportamiento observado en ambos casos coincide con lo visto en literatura, donde se menciona que esta bacteria no tendría la capacidad de transferir electrones directamente al electrodo. Ésta podría ser la principal causa de la baja corriente generada (en relación al experimento sin bacterias) en el caso en que se tiene una mayor concentración de bacterias en el electrodo, ya que éstas no tendrán la capacidad de generar corriente y aumentarán la resistencia del sistema; mientras que las bacterias que estén en solución aumentarán la resistencia de ésta, pero a su vez estarán generando especies electroactivas, las cuales podrán aumentar la corriente generada en el sistema.

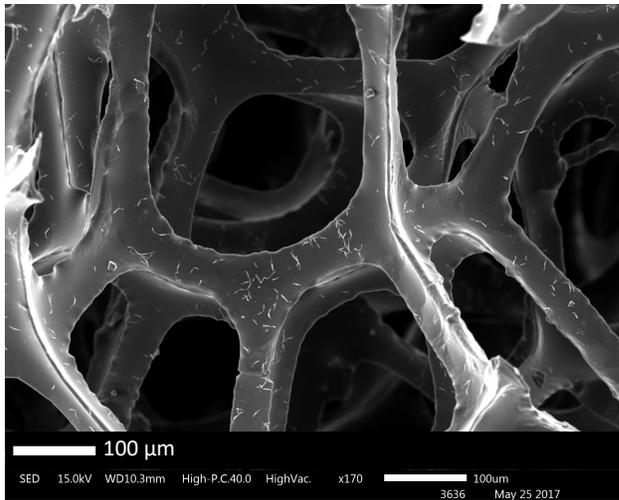
## 5.7. Micrografías a electrodos con bacterias adheridas

Con el fin de observar si las bacterias se adherían al electrodo de trabajo utilizado, se realizaron microscopías electrónicas de barrido (MEB) a electrodos con 4, 6 y 8 horas de crecimiento microbiano, los que fueron preparados según el protocolo descrito en la Sección 4.4.5. En la Figura 5.17a se puede ver una imagen de MEB con un aumento de 170x de un electrodo con 4 horas de cultivo, mientras que en la Figura 5.17b se muestra un zoom de 4.000x al mismo electrodo.

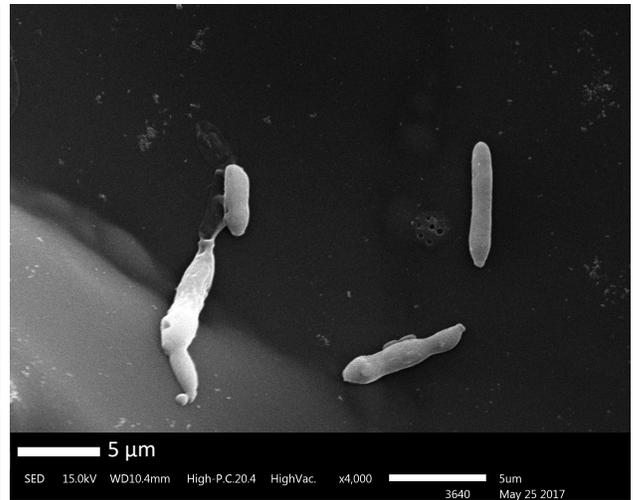
Con estas imágenes se pudo comprobar que la bacteria *Acidiphilium cryptum* se adhirió a la superficie del CVR y que ésta pudo difundir hacia el interior del electrodo, ya que en la imagen se pueden apreciar bacterias en la estructura más profunda. Es importante mencionar que en la imagen con más aumento se pudieron apreciar claramente las bacterias y no se observaron pilis o alguna otra estructura que pudiera ayudar a la transferencia directa de los electrones desde la bacteria al electrodo de trabajo, por lo que se confirma que ésta solo transferirá electrones al electrodo mediante el mediador utilizado (ion férrico).

Para analizar la adherencia de bacterias a distintos tiempos, también se observaron mediante MEB electrodos con tiempos de cultivo de 6 y 8 horas, los que se pueden ver en las Figuras 5.18a y 5.18b, respectivamente.

Al comparar estas imágenes con la Figura 5.17a, pareciera que el electrodo con 4 horas de cultivo tenía una mayor cantidad de microorganismos adheridos que los otros dos casos, lo que puede estar

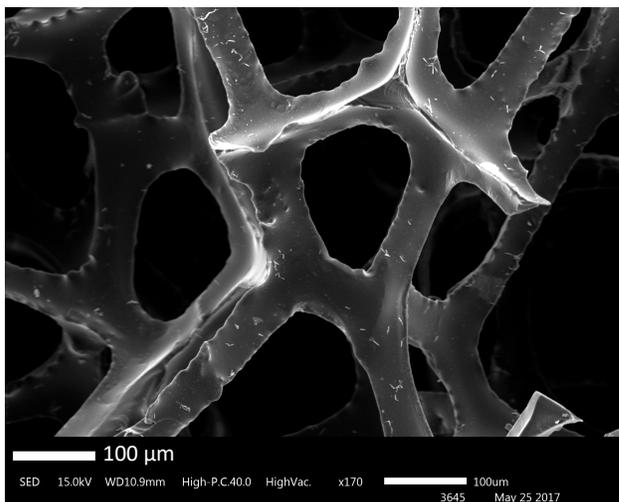


(a) Aumento de 170x

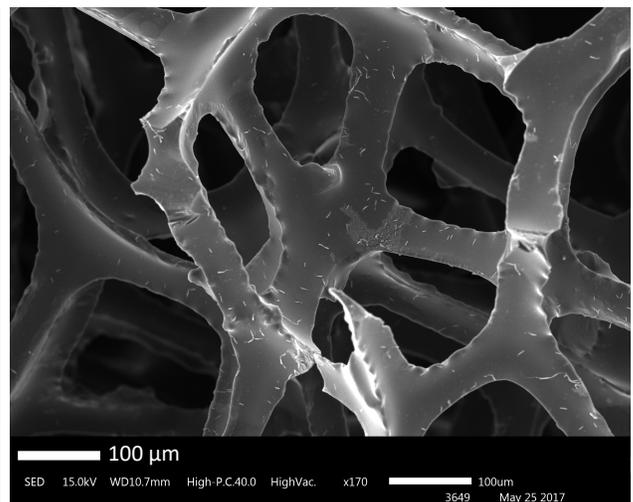


(b) Aumento de 4.000x

Figura 5.17: Imágenes MEB a electrodos de trabajo con 4 horas de crecimiento



(a) 6 horas de crecimiento



(b) 8 horas de crecimiento

Figura 5.18: Imágenes MEB a electrodos de trabajo con 4 y 6 horas de crecimiento

asociado a un desprendimiento de bacterias en los procesos de secado a punto crítico o metalizado, o a la poca área analizada en la micrografía. Sin embargo, es importante destacar que se pudieron observar bacterias adheridas en los tres tiempos analizados, lo que finalmente podría confirmar la idea que éstos microorganismos aumentan la resistencia del electrodo de trabajo utilizado en el sistema, como se observó en las EIE.

# Capítulo 6

## Conclusiones

Se diseñó y construyó una celda de doble cámara con un sello tipo vial en una de ellas, lo que permite mantener un ambiente anóxico sin la necesidad de inyectar nitrógeno constantemente. A pesar de haber sido diseñada para trabajar con *G. sulfurreducens*, la celda se desempeñó de buena forma y permitió realizar los experimentos electroquímicos del trabajo con la bacteria *A. cryptum*.

Como material para el ánodo se usó el carbono vítreo reticular. Al medir su área superficial, ésta resultó ampliamente superior a otros materiales que son utilizados comúnmente como ánodos de CCMs, además, su buena conductividad eléctrica y su estructura porosa hacen que este material sea una buena opción para la construcción de los ánodos utilizados.

Al realizar las curvas de crecimiento del microorganismo utilizado como catalizador, se observó que éste comenzaba inmediatamente su crecimiento y, además, el mediador favorece su metabolismo, aumentando su velocidad específica de crecimiento un 50 % por sobre su valor sin mediador.

Para caracterizar el desempeño del ánodo, se utilizó la voltametría cíclica. A partir de los resultados obtenidos se concluye que las bacterias tuvieron un efecto catalítico sobre la oxidación de la glucosa, ya que al tener una mayor concentración de bacterias en la celda, se obtuvieron densidades de corrientes superiores.

Por otro lado, se utilizó como técnica complementaria la espectroscopía de impedancia electroquímica, con el fin de estudiar la electroactividad del electrodo. Este procedimiento arrojó que las bacterias, presentes tanto en el ánodo como en el anolito, aumentan sus respectivas resistencias. En base a este resultado y los entregados por las voltametrías cíclicas se pudo concluir que el efecto catalítico de las bacterias es mayor al efecto del aumento de las resistencias del sistema.

Mediante la microscopía electrónica de barrido se pudo comprobar que las bacterias se adherían al electrodo utilizado, pero no se observaron elementos extracelulares que pudieran ayudar a la transferencia directa de electrones hacia el electrodo. Esto refuerza la idea de que la bacteria *A. cryptum* necesitaría un mediador para poder transferir los electrones al electrodo, sin embargo, se recomienda realizar estudios para descartar que el microorganismo sea capaz de transferir electrones mediante citocromos c o generando sus propios mediadores.

Con las pruebas realizadas en este estudio se pudo concluir que se podrá utilizar la bacteria

*Acidiphilium cryptum* como catalizador en el ánodo de una celda de combustible microbiológica. Se recomienda continuar la investigación utilizando como anolito aguas residuales sintéticas y/o trabajando con una mayor concentración de microorganismos en el ánodo de la celda. Asimismo, se recomienda comenzar con el estudio del cátodo que se utilizará en el sistema, para así realizar una caracterización general del sistema, y de esta forma, poder evaluar su implementación en una planta de tratamiento de aguas residuales.

# Bibliografía

- [1] Comisión nacional de energía. Reporte mensual sector energético, Marzo 2016. [https://www.cne.cl/wp-content/uploads/2015/06/RMensual\\_2016Marzo.pdf](https://www.cne.cl/wp-content/uploads/2015/06/RMensual_2016Marzo.pdf) [Último acceso: 08-04-2017].
- [2] Ministerio de energía. Energías renovables no convencionales. [http://antiguo.minenergia.cl/minwww/opencms/14\\_portal\\_informacion/la\\_energia/ernc.html](http://antiguo.minenergia.cl/minwww/opencms/14_portal_informacion/la_energia/ernc.html) [Último acceso: 08-04-2017].
- [3] Colleen Spiegel. *Designing and Building Fuel Cells*. McGraw-Hill Education, 2007.
- [4] UN water. Wastewater Management- A UN-Water Analytical Brief, 2015. <http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/275896/> [Último acceso: 15-06-2017].
- [5] Pescod M. B. *Wastewater Treatment and Use in Agriculture (Fao Irrigation and Drainage Paper)*. Food & Agriculture Org, 1992.
- [6] SISS Gobierno de Chile. Informe de Gestión del Sector Sanitario. 2014.
- [7] Gobierno de Chile. *D.S. N°90 NORMA DE EMISION PARA LA REGULACION DE CONTAMINANTES ASOCIADOS A LAS DESCARGAS DE RESIDUOS LIQUIDOS A AGUAS MARINAS Y CONTINENTALES SUPERFICIALES*. 2000.
- [8] R.S. Ramalho. *Tratamiento De Aguas Residuales*. REVERTE, 1990.
- [9] WaterWorld. Wastewater Disinfection – Alternative Methods. <http://www.waterworld.com/index.html> [Último acceso: 7-06-2017].
- [10] Guillermo Romeou Fernandez. El mercado del tratamiento de aguas en Chile. page 64, 2014.
- [11] Veera Gnaneswar Gude. Wastewater Treatment in Microbial Fuel Cells – An Overview. *Journal of Cleaner Production*, 122(Suplemento C):287–307, 2016.
- [12] La Tercera. Consumo energético se cuadruplicó en 20 años, 2015. <http://www.latercera.com/noticia/nacional/2015/08/680-641327-9-consumo-electrico-se-cuadruplico-en-20-anos.shtml> [Último acceso: 23-03-2017].

- [13] S Giddey, S P S Badwal, A Kulkarni, y C Munnings. A comprehensive review of direct carbon fuel cell technology. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(3):360–399, 2012.
- [14] Bruce E. Logan, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schroder, Jurg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete, y Korneel Rabaey. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17):5181–5192, 2006.
- [15] Suman Bajracharya, Mohita Sharma, Gunda Mohanakrishna, Xochitl Dominguez Benetton, David P B T B Strik, Priyangshu M. Sarma, y Deepak Pant. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renewable Energy*, 98(Suplemento C):153–160, 2016.
- [16] Deepak Pant, Gilbert Van Bogaert, Ludo Diels, y Karolien Vanbroekhoven. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*, 101(6):1533–1543, 2010.
- [17] Keith Oldham, Jan Myland, y Alan Bond. *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2011.
- [18] Allen J. Bard. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition*. Wiley, 2001.
- [19] Michael Cox y David Nelson. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Omega, 2009.
- [20] Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl, y David P. Clark. *Brock Biology of Microorganisms (13th Edition)*. Benjamin Cummings, 2010.
- [21] Anand Parkash. Microbial Fuel Cells: A Source of Bioenergy. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 8(3):247–255, 2016.
- [22] Uwe Schröder. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9(21):2619–2629, 2007.
- [23] Nikhil S. Malvankar y Derek R. Lovley. Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 27(Suplemento C):88–95, 2014.
- [24] Carlo Santoro, Catia Arbizzani, Benjamin Erable, y Ioannis Ieropoulos. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356(Suplemento C):225–244, 2017.
- [25] Hanno Richter, Kevin McCarthy, Kelly P. Nevin, Jessica P. Johnson, Vincent M. Rotello, y Derek R. Lovley. Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir*, 24(8):4376–4379, 2008.
- [26] Zhiyong Ren, Thomas E. Ward, y John M. Regan. Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture. *Environmental Science & Technology*, 41(13):4781–4786, 2007.

- [27] Abhijeet P. Borole, Hugh O'Neill, Costas Tsouris, y Scott Cesar. A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Biotechnology Letters*, 8(17):1367–1372, 2008.
- [28] Tunc Catal, Kaichang Li, Hakan Bermek, y Hong Liu. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 175(1):196–200, 2008.
- [29] Sokhee Jung; John M. Regan. Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2):393–402, 11 2007.
- [30] Yufeng Han, Chaoling Yu, y Hong Liu. A microbial fuel cell as power supply for implantable medical devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9):2156–2160, 2010.
- [31] Zhen He, Norbert Wagner, Shelley D. Minteer, y Largus T. Angenent. An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: Assessment of the internal resistance by impedance spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 40(17):5212–5217, 2006.
- [32] Kyu-Jung Chae, Mi-Jin Choi, Jin-Wook Lee, Kyoung-Yeol Kim, y In S. Kim. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 100(14):3518–3525, 2009.
- [33] Hong Liu, Shaoan Cheng, y Bruce E. Logan. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology*, 39(2):658–662, 2005.
- [34] Korneel Rabaey, Geert Lissens, Steven D. Siciliano, y Willy Verstraete. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology Letters*, 25(18):1531–1535, 2003.
- [35] Hyung-Sool Lee, Prathap Parameswaran, Andrew Kato-Marcus, César I. Torres, y Bruce E. Rittmann. Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (mfcs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates. *Water Research*, 42(6-7):1501–1510, 2008.
- [36] M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable, y A. Bergel. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(31):16349–16366, 2014.
- [37] Feng Zhao, Nelli Rahunen, John R. Varcoe, Amreesh Chandra, Claudio Avignone-Rossa, Alfred E. Thumser, y Robert C. T. Slade. Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology*, 42(13):4971–4976, 2008.
- [38] Adam J. Hutchinson, Justin C. Tokash, y Bruce E. Logan. Analysis of carbon fiber brush loading in anodes on startup and performance of microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(22):9213–9219, 2011.
- [39] Guillaume Lepage, Fabio Ovenhausen Albernaz, Gérard Perrier, y Gérard Merlin. Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. *Bioresource Technology*, 124(Suplemento C):199–207, 2012.

- [40] Zejie Wang, Changli Cao, Yue Zheng, Shuiliang Chen, y Feng Zhao. Abiotic oxygen reduction reaction catalysts used in microbial fuel cells. *ChemElectroChem*, 1(11):1813–1821, 2014.
- [41] Liming Dai, Yuhua Xue, Liangti Qu, Hyun-Jung Choi, y Jong-Beom Baek. Metal-free catalysts for oxygen reduction reaction. *Chemical Reviews*, 115(11):4823–4892, 2015.
- [42] Min Lu, Lin Guo, Shailesh Kharkwal, Hua'nán Wu, How Yong Ng, y Sam Fong Yau Li. Manganese–polypyrrole–carbon nanotube, a new oxygen reduction catalyst for air-cathode microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 221(Suplemento C):381–386, 2013.
- [43] The Microbiology network. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. <http://www.microbiol.org/resources/monographwhite-papers/measurement-of-cell-concentration-in-suspension-by-optical-density/> [Último acceso: 31-07-2017].
- [44] Melanie Alejandra Colet Lagrille. *Carbon-Air Fuel Cells with Molten Tin Anodes*. Tesis de doctorado, Imperial College London, 2013.
- [45] Universidad de Buenos Aires. Medida del crecimiento. <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioRecuento.htm> [Último acceso: 24-07-2017].
- [46] Princeton Applied Research. A review of Techniques for Electrochemical Analysis. [http://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download\\_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application\\_note\\_e-4.pdf?la=en](http://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application_note_e-4.pdf?la=en) [Último acceso: 28-07-2017].
- [47] Princeton Applied Research. Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy. [http://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download\\_links/documentations/library/princetonappliedresearch/app\\_note\\_ac-1.pdf?la=en](http://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download_links/documentations/library/princetonappliedresearch/app_note_ac-1.pdf?la=en) [Último acceso: 28-07-2017].
- [48] Gamry Instruments. Introduction to Electrochemical Impedance Spectroscopy. <https://www.gamry.com/assets/Uploads/Basics-of-Electrochemical-Impedance-Spectroscopy.pdf> [Último acceso: 28-07-2017].
- [49] Charles Evans, Richard Brundle, y Wilson. *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films (Materials Characterization Series)*. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [50] María Guadalupe Nieto López. Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. <http://laboratorios.tap-ecosur.edu.mx/LMEB/APUNTES%20MEB%20CURSO%202010.pdf> [Último acceso: 23-08-2017].
- [51] Sigma-Aldrich. Nafion perfluorinated membrane. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274674?lang=es&region=CL&gclid=EAIaIQobChMI2evNhZvc1gIViIGRCh2\\_hQ9QEAAAYASAAEgJQk\\_D\\_BwE](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274674?lang=es&region=CL&gclid=EAIaIQobChMI2evNhZvc1gIViIGRCh2_hQ9QEAAAYASAAEgJQk_D_BwE) [Último acceso: 06-10-2017].

- [52] F. G. Cuevas, J. M. Montes, J. Cintas, y P. Urban. Electrical conductivity and porosity relationship in metal foams. *Journal of Porous Materials*, 16(6):675–681, 2009.
- [53] Hantao Zhou, Huamin Zhang, Ping Zhao, y Baolian Yi. A comparative study of carbon felt and activated carbon based electrodes for sodium polysulfide/bromine redox flow battery. *Electrochimica Acta*, 51(28):6304–6312, 2006.
- [54] DSMZ. Geobacter Medium. [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium826.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium826.pdf) [Último acceso: 06-10-2017].
- [55] Electrochemistry resources. The constant phase element. <http://www.consultrsr.net/resources/index.htm> [Último acceso: 07-11-2017].

## Anexo A

### Voltametrías con barrido entre -0,5 y 1,5 V

En las Figuras A.1, A.2 y A.3 se muestran los voltamogramas correspondientes a las voltametrías cíclicas realizadas con inóculos de *Acidiphilium cryptum* con tiempos de crecimiento de 0, 3 y 25 horas, respectivamente. En los gráficos se observa el mismo comportamiento descrito para la Figura 5.7.

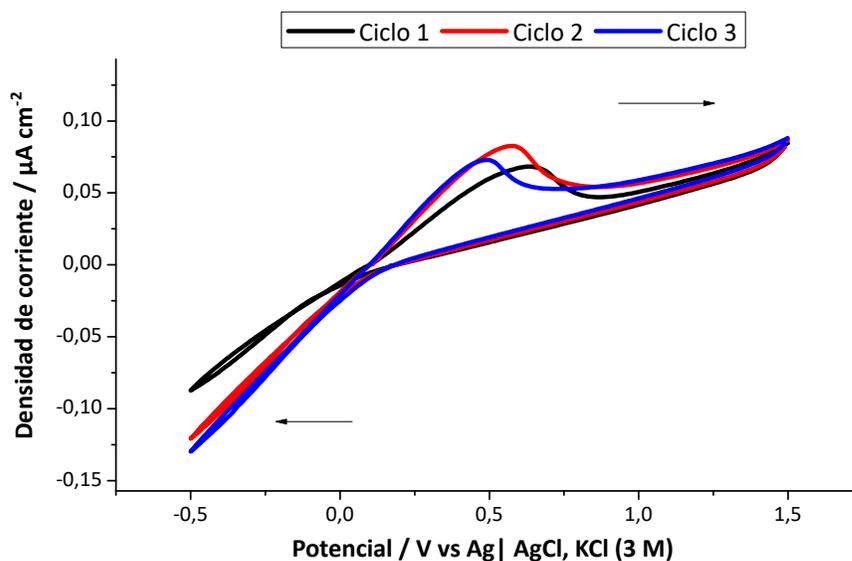


Figura A.1: Voltamograma con inóculo de 0 horas de crecimiento

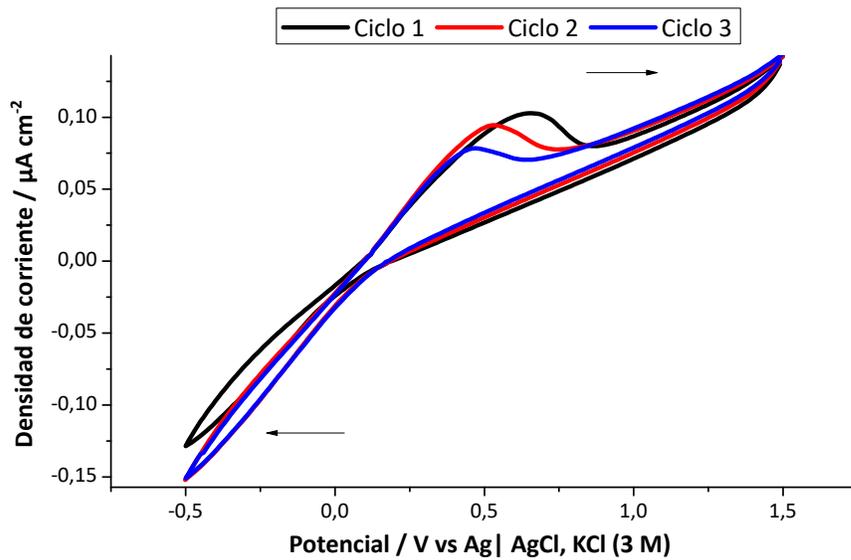


Figura A.2: Voltamograma con inóculo de 3 horas de crecimiento

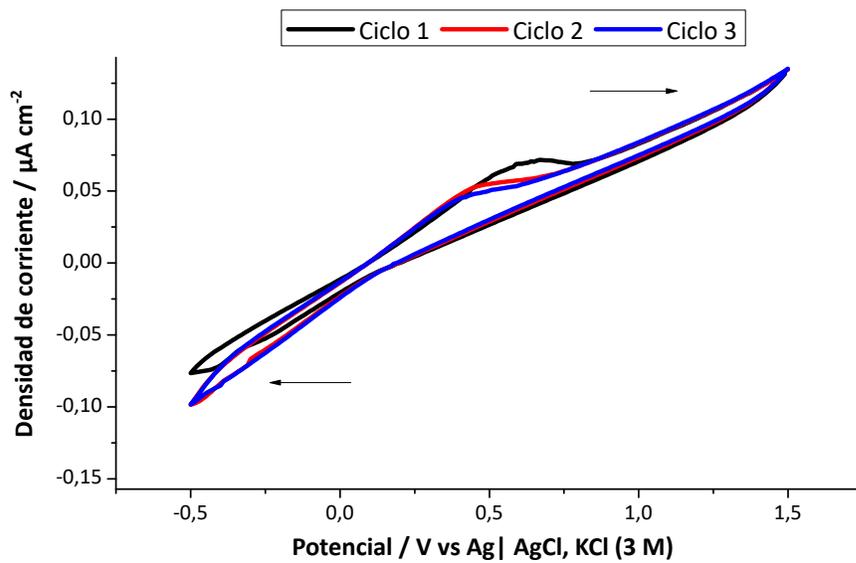


Figura A.3: Voltamograma con inóculo de 25 horas de crecimiento

## Anexo B

# EIE a celda con bacterias en solución, ajuste al modelo 1

En las Figuras B.1, B.2 y B.3 se muestran los resultados de las espectroscopías de impedancia electroquímica realizadas a la celda con inóculos con tiempos de crecimiento de 0, 6 y 8 horas, respectivamente. En los gráficos también se observa como se ajustó el modelo 1 a estos datos experimentales.

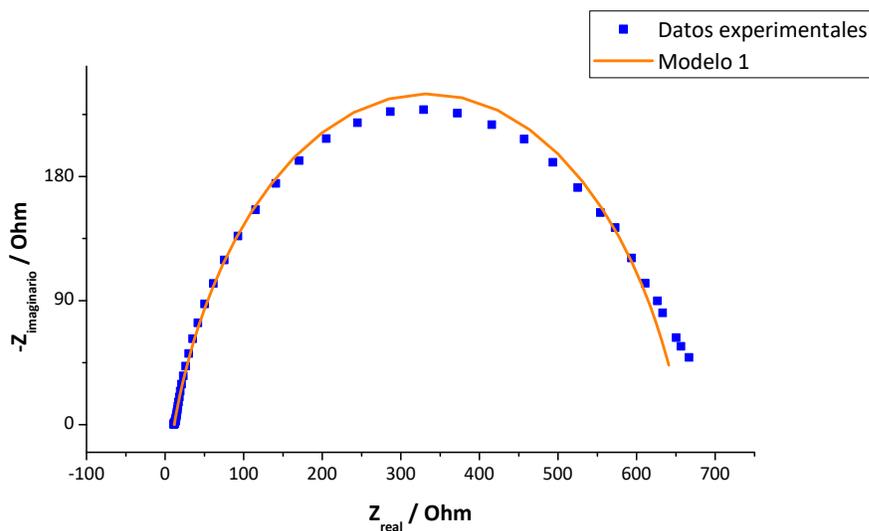


Figura B.1: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 0 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1

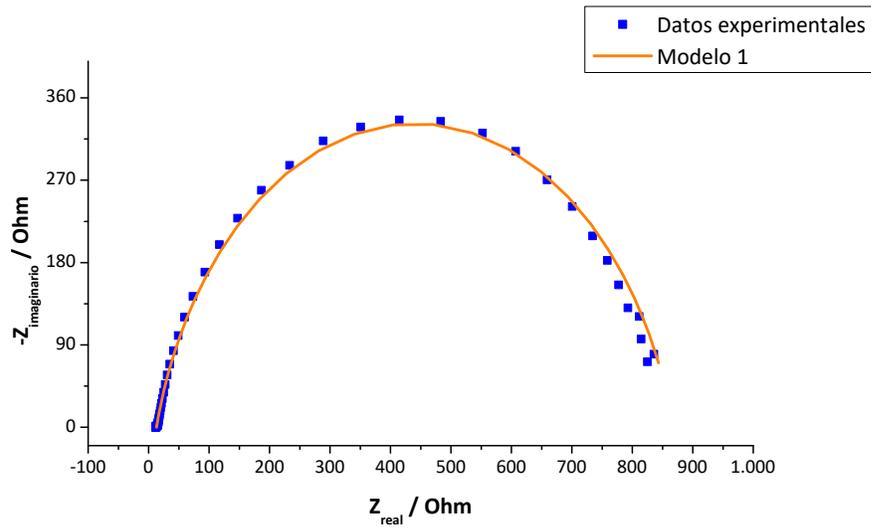


Figura B.2: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 6 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1

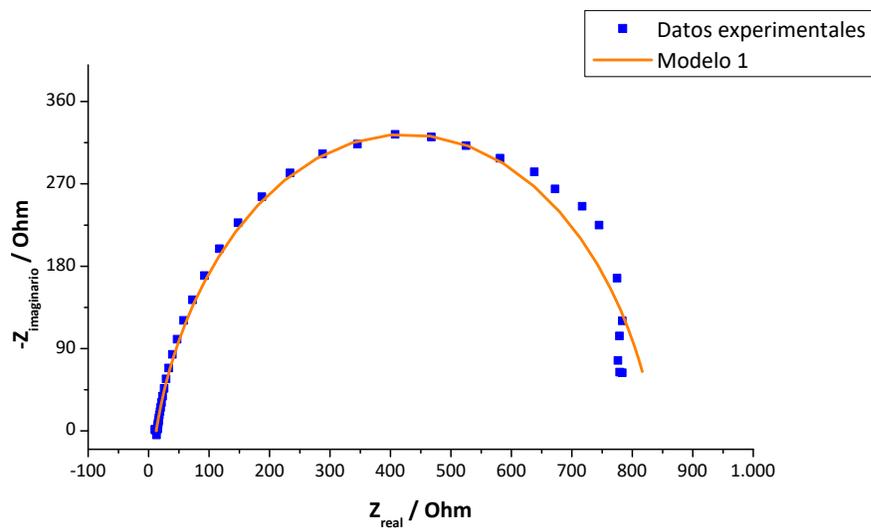


Figura B.3: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 8 horas de crecimiento con ajuste del modelo 1

## Anexo C

# EIE a celda con bacterias en solución, ajuste al modelo 2

En las Figuras C.1, C.2 y C.3 se muestran los resultados de las espectroscopías de impedancia electroquímica realizadas a la celda con inóculos con tiempos de crecimiento de 0, 6 y 8 horas, respectivamente. En los gráficos también se observa como se ajustó el modelo 2 a estos datos experimentales.

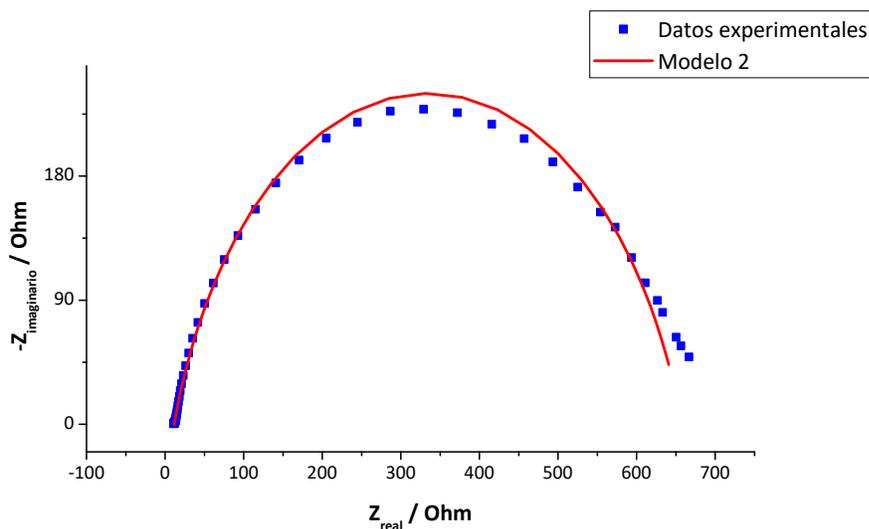


Figura C.1: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 0 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2

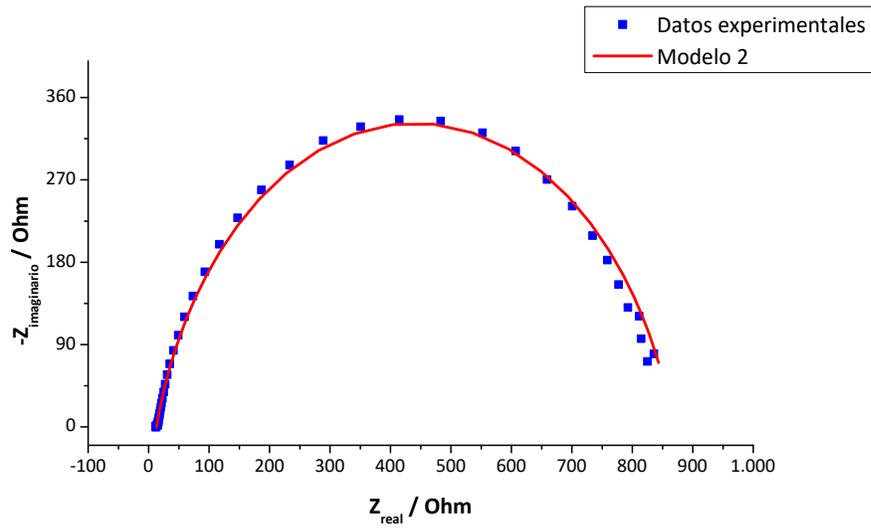


Figura C.2: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 6 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2

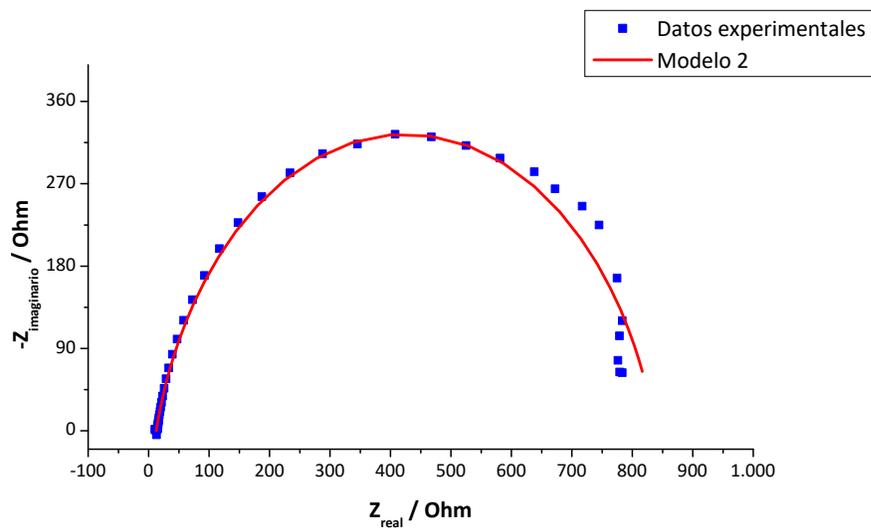


Figura C.3: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con inóculo de 8 horas de crecimiento con ajuste del modelo 2

## Anexo D

# EIE a celda con bacterias adheridas al electrodo, primer caso

En las Figuras D.1, D.2, D.3 y D.4 se muestran los gráficos de Nyquist correspondientes a las EIE realizadas con un electrodo de trabajo sin bacterias, uno extraído de un cultivo con 4 horas de crecimiento, otro con 6 horas de crecimiento y otro con 8 horas, respectivamente. En las imágenes también se ve como se ajusta el modelo 2 a los datos experimentales.

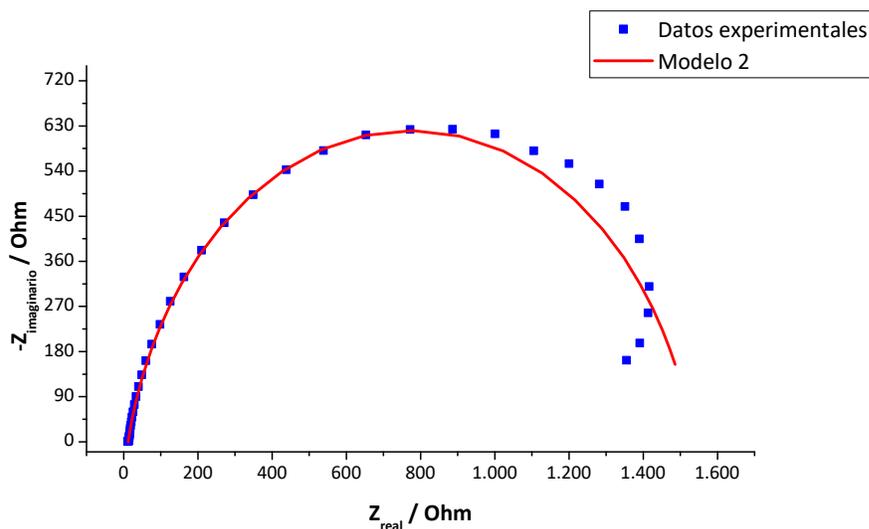


Figura D.1: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo sin bacterias, con ajuste del modelo 2

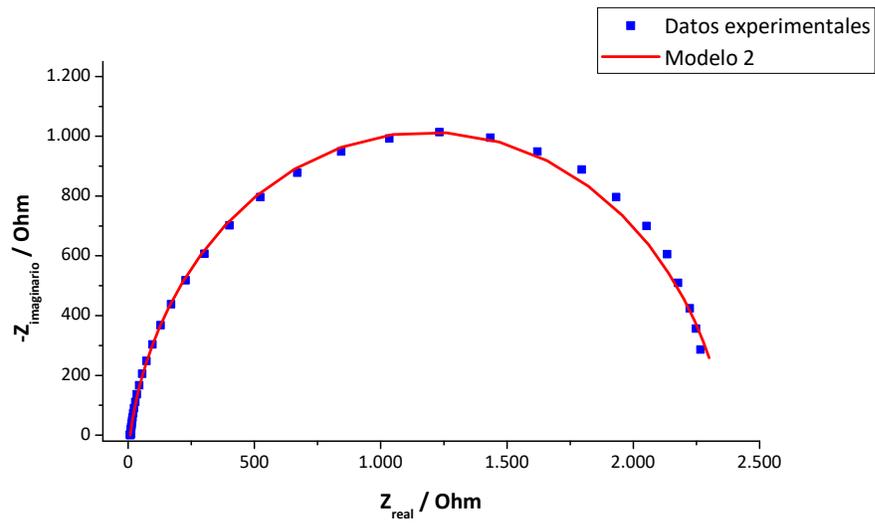


Figura D.2: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 4 horas, con ajuste del modelo 2

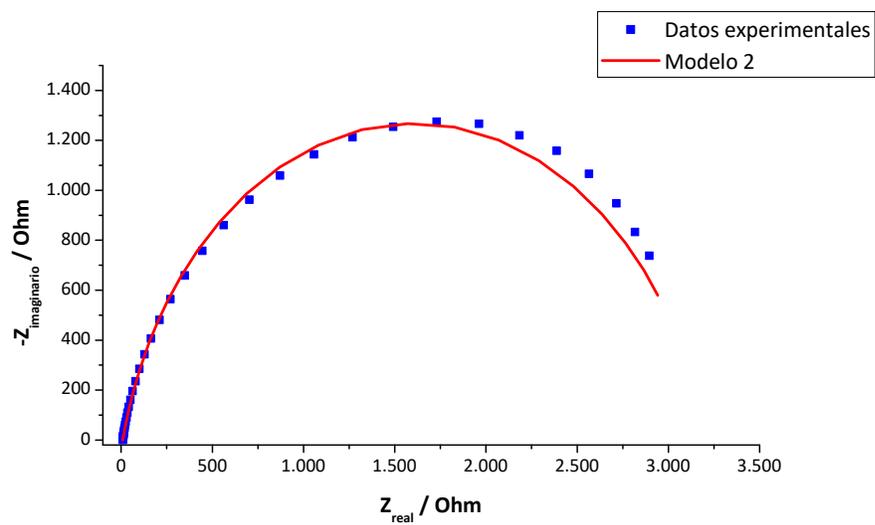


Figura D.3: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 6 horas, con ajuste del modelo 2

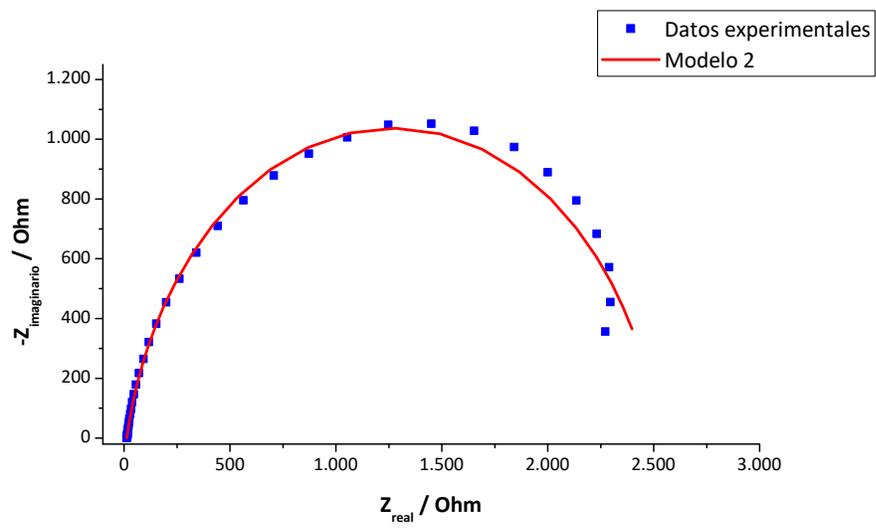


Figura D.4: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 8 horas, con ajuste del modelo 2

## Anexo E

# EIE a celda con bacterias adheridas al electrodo, segundo caso

En las Figuras E.1, E.2, E.3 y E.4 se muestran los gráficos de Nyquist correspondientes a las EIE realizadas con un electrodo de trabajo sin bacterias, uno extraído de un cultivo con 4 horas de crecimiento, otro con 6 horas de crecimiento y otro con 8 horas, respectivamente. En las imágenes también se ve como se ajusta el modelo 2 a los datos experimentales.

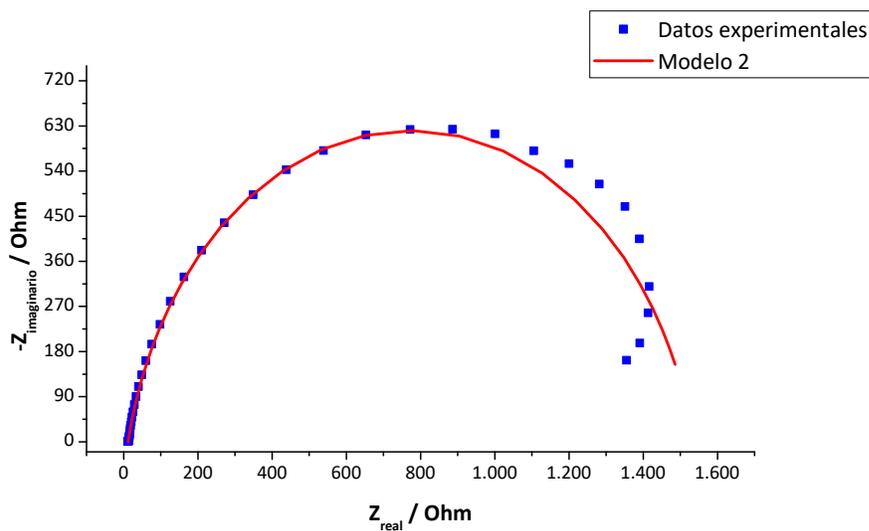


Figura E.1: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo sin bacterias, con ajuste del modelo 2

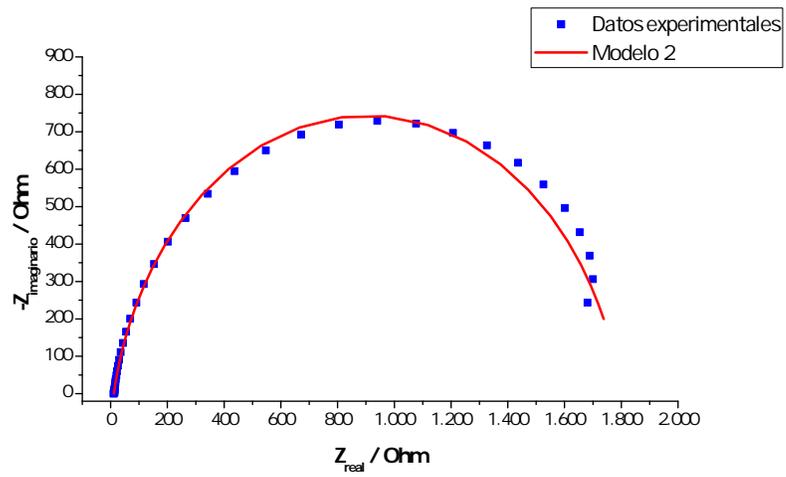


Figura E.2: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 4 horas, con ajuste del modelo 2

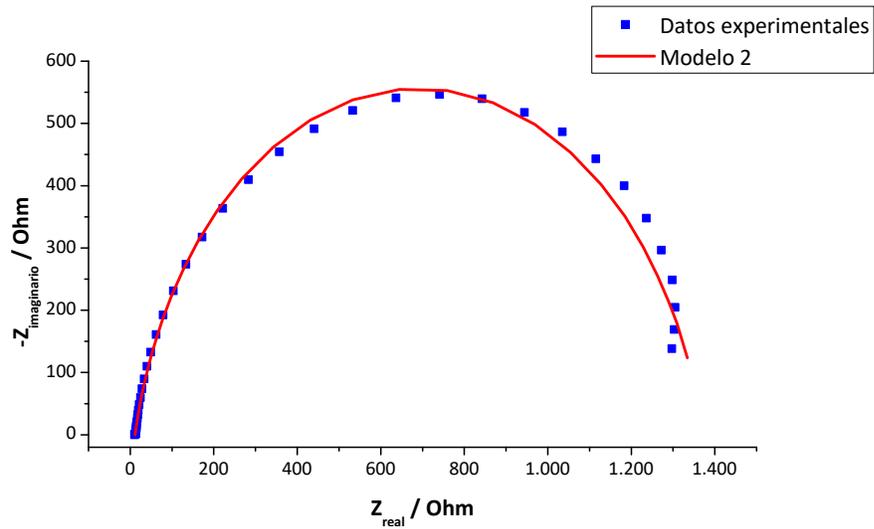


Figura E.3: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 6 horas, con ajuste del modelo 2

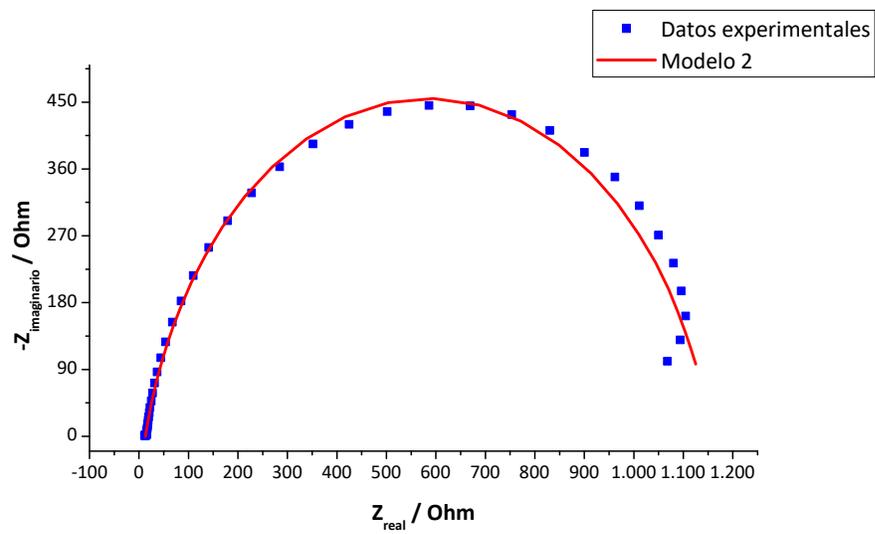


Figura E.4: Gráfico de Nyquist correspondiente a una EIE con electrodo extraído de un cultivo de 8 horas, con ajuste del modelo 2