

Screening de materiales e inóculos para su aplicación en celdas de combustible microbianas (Microbial Fuel Cells – MFC)

Sotres, A.^{1*}, Bonmatí A.¹, Viñas, M.¹

¹GIRO Centro Tecnológico. Rambla Pompeu Fabra, 1. 08100 – Mollet del Vallés. Barcelona

*Autor de contacto: ana.sotres@giroct.irta.cat

Resumen

Una celda de biocombustible (MFC) es un sistema bioelectroquímico que utiliza microorganismos exoelectrógenos, capaces de catalizar reacciones de oxidación en el ánodo a partir de la materia orgánica biodegradable. Estos microorganismos tienen la capacidad de transferir los electrones liberados durante el proceso de oxidación hacia un aceptor de electrones sólido (electrodo), generando un flujo de electrones que puede ser aprovechado en forma de corriente eléctrica. Uno de los elementos claves para el desarrollo de esta tecnología es el estudio de las poblaciones microbianas involucradas, así como su interacción con los diferentes materiales que se pueden utilizar. En este trabajo se estudiaron diferentes inóculos y diferentes tipos de membranas de intercambio de protones (PEM), en MFC de doble celda, con el objetivo final de relacionar la variación en los parámetros electroquímicos respecto a cambios en las poblaciones microbianas.

Se detectaron cambios significativos en la diversidad de la comunidad microbiana en los reactores MFC en relación al inóculo original lo que indicaría la existencia de un proceso de adaptación de las poblaciones en los reactores MFC. Los ensayos realizados con 3 tipos diferentes de membrana (PEM) utilizando el mismo inóculo, mostraron que la estructura de la población microbiana (eubacterias) cambiaba de forma similar a lo largo del tiempo. Sin embargo, se detectaron cambios, tanto en las poblaciones de arqueas como en el comportamiento electroquímico, en función de cada tipo de PEM utilizada. La MFC con Nafion N-117 fue la que mostró el mejor comportamiento electroquímico alcanzando una densidad de potencia máxima de 71 mW/m².

Los resultados obtenidos indican la importancia de estudiar de forma combinada, tanto las poblaciones microbianas de eubacterias como la de arqueas para tener una mayor comprensión del funcionamiento de MFC en diferentes condiciones y materiales.

Palabras clave

MFC, biocelda de combustible, bioelectricidad, membranas de intercambio de protones (PEM), DGGE.

INTRODUCCIÓN

Una celda de combustible microbiana (MFC) es un reactor bioelectroquímico, que mediante la actividad metabólica, convierte la energía química de la materia orgánica biodegradable en electricidad. La generación de electricidad es directa y sin la formación de gases intermediarios, tales como metano, por lo que la eficiencia de conversión energética es potencialmente superior que la de un reactor de digestión anaerobia metanogénico (Kim et al., 2007; Pham et al., 2006).

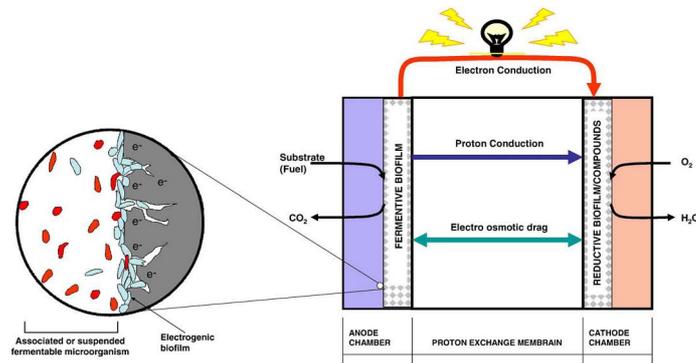


Figura 1. Esquema de una MFC y los procesos que ocurren en ella.

Ciertos microorganismos son capaces de generar corriente eléctrica, transfiriendo electrones desde un dador de electrones (compuestos orgánicos/inorgánicos reducidos) hacia un aceptor final, gracias al potencial electroquímico existente entre ellos. Las estrategias biológicas de transferencia de electrones al ánodo pueden ser de contacto directo, o mediante la utilización de *shuttles* electrónicos (Logan, 2009). Los electrones captados en el ánodo se transfieren a través de un circuito externo hacia la cámara catódica donde reducen el aceptor final de electrones, típicamente el oxígeno (Figura 1).

La tecnología de las MFC, así como el conocimiento de las poblaciones microbianas implicadas, está todavía en fase inicial de desarrollo y existen pocos estudios que hayan caracterizado la población microbiana tanto de eubacterias como de arqueas en MFC alimentadas con residuos reales. El conocimiento de estas comunidades microbianas es fundamental para comprender la ecología de las poblaciones anodófilas, así como de los mecanismos de competencia y/o intercambio de electrones entre microorganismos y el ánodo, y/o entre microorganismos, hecho que permitiría diseñar estrategias que mejorarían el proceso de transferencia electrónica (Logan, 2007).

Asimismo, los materiales de construcción de las celdas, como son las membranas de intercambio de protones, son los factores que limitan de manera importante la eficiencia en la generación de energía (eficiencia Coulómbica), y por su alto coste limitan el proceso de escalado de la tecnología. Es por tanto necesario encontrar nuevos materiales que permitan maximizar la producción eléctrica, a la vez permitan reducir los costes.

El enfoque multidisciplinar del estudio puede facilitar una mejora en el conocimiento del proceso de adaptación de la comunidad microbiana en un reactor MFC, así como facilitar la elección del material de membrana y/o electrodos, con una mayor eficiencia y producción de electricidad, para su posterior escalado.

MATERIALES Y METODOS

Reactores MFC

Las celdas de biocombustibles utilizadas fueron MFC de dos compartimentos de 10 ml/celda con los dos electrodos (ánodo y cátodo) de fibra de grafito conectados por un circuito externo con una resistencia de 1000 Ω . Los dos compartimentos estaban separados por una membrana permeable a los protones (PEM). Las membranas ensayadas fueron: Nafion N-117 (DuPont, Co., Delaware, USA) y Ultrex CMI-7000 y AMI-7000 (Membrane International, USA).

Las MFC fueron inoculadas con tres inóculos procedentes de diferentes bioreactores: i) constructed Wetlands funcionando con agua residual urbana (WET), ii) digestor anaerobio con elevada carga de nitrógeno (DA), iii) inóculo procedente de una MFC que opera con purines vacunos (CM). El ánodo se alimentó de manera discontinua con pulsos de acetato (50 mM) cada vez que disminuía el voltaje a valores basales, mientras que el cátodo contenía ferrocianato potásico en buffer fosfato.

Caracterización electroquímica de las celdas

La caracterización electroquímica se realizó mediante un seguimiento del voltaje (mV) mediante un multímetro Agilent 34970 y la realización de distintas curvas de polarización. Las curvas de polarización se realizaron, después de dejar cada MFC 1h en circuito abierto, variando la resistencia externa en un rango de 0 a 30.000 Ω . Se determinó la densidad de potencia máxima normalizada a área de electrodo, intensidad y voltaje máximo.

Caracterización molecular de poblaciones microbianas del compartimento anódico

Se han estudiado las comunidades microbianas de eubacterias presentes en los inóculos iniciales y en diferentes momentos de producción de electricidad, mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) del gen 16S rRNA. Las extracciones de ADN se han realizado siguiendo un

protocolo de extracción físico-químico de tipo bead-beating utilizando el kit comercial PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, USA).

Para el estudio de la población de eubacterias se han utilizado los cebadores universales F341-GC y R907 que amplifican la región hipervariable V3-V5 del gen 16S rRNA (Viñas et al., 2005). Las reacciones de PCR se han realizado en un termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf).

Los amplicones de PCR obtenidos anteriormente (20 μ l), se cargaron en geles de poliacrilamida al 8% (p/v) y 0,75 mm de grosor, con un gradiente químico de formamida-urea del 30-70% para bacterias y arqueas. Los geles se corrieron en un equipo DGGE-4001 System (CBS Scientific, del Mar, CA, USA) a 100 V y 60 °C, durante 16 horas en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetato sódico, 1 mM de EDTA, pH 7.4). Para el análisis de imágenes de cada DGGE, los geles se tiñeron en SybrGold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y se visualizaron bajo luz azul mediante la utilización de una placa Visi-Blue converter Plate (UV Products, USA) acoplada a un transiluminador UV Syngene (GelVue Transilluminator & GenFlash).

Las bandas predominantes de los geles de DGGE fueron cortadas bajo luz azul. El DNA de las bandas, una vez eluido O/N a 4°C en agua MilliQ, fue reamplificado por PCR y secuenciado utilizando el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (version 3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron: desnaturalización inicial a 96°C/1 minuto, seguido de 25 ciclos de: 96°C/10 segundos, 55°C/5 segundos, 60°C/4 minutos. La lectura de la reacción de secuenciación se realizó en un secuenciador automático capilar modelo ABI PRISM 3700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron analizadas y procesadas utilizando el software BioEdit (versión 7.0). Se compararon y alinearon las secuencias existentes en el GenBank, a partir del BLASTN (BLAST Search Alignment Tool) y mediante el Ribosomal Database Project (RDP) versión 10, se comprobó a qué grupo filogenético pertenecían las secuencias encontradas.

Con el objetivo de analizar estadísticamente los cambios en la diversidad de eubacterias en las diferentes muestras tomadas de la MFC, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) basado en la distribución e intensidad relativa de las bandas de DGGE presentes en los perfiles de los geles de DGGE previamente digitalizados.

RESULTADOS

Caracterización electroquímica

La caracterización electroquímica de los diferentes reactores MFC, mostró diferentes comportamientos según el origen del inóculo inicial y el tipo de membrana utilizada (Tabla 1). Las densidades de potencia más elevadas se obtuvieron con el inóculo procedente del digestor anaerobio (DA), obteniendo valores similares a los descritos en la literatura para MFC de pequeña escala (Sun et al., 2008).

El inóculo DA se probó con distintos tipos de membranas PEM, obteniéndose en este caso los mejores resultados con la MFC equipada con Nafion N-117 (Tabla 1 y Figura 2.)

Tabla 1. Valores de rendimiento máximo obtenido en los reactores

	<i>V</i> (mV)	<i>P</i> (mW/m ²)	Ω interna
WET	171	11	2.200
CM (purín vacuno)	140	16	1000
D.A (CMI-7000)	340	44	2.200
D.A (AMI-7000)	201	15	2.200
D.A (Nafion)	433	71	2.200

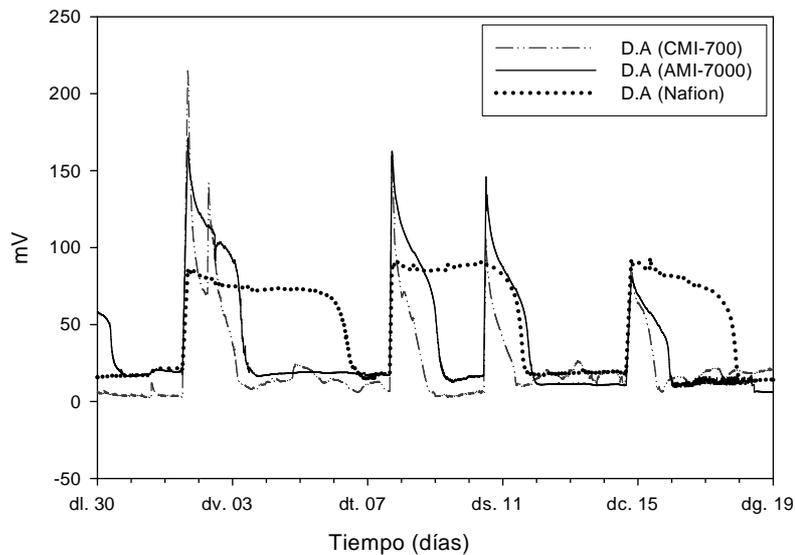


Figura 2. Datos del voltaje (mV) en función del tiempo, de tres MFC montadas con tres membranas PEM.

Caracterización microbiológica

Los resultados obtenidos para el DGGE de la población total de eubacterias, en los diferentes inóculos al inicio, y en distintos momentos de producción de electricidad, y con el inóculo DA utilizando diferentes membranas PEM, se presentan en las Figuras 3 y 4.

El perfil de DGGE obtenido para la población de eubacterias a partir de los tres tipos de inóculos utilizados (Figura 3), muestra por una parte la diferente diversidad microbiana existente de forma inicial en los tres inóculos, y por otra parte se observa que existe un proceso de adaptación de la comunidad microbiana en las MFC en funcionamiento, mostrando un cambio poblacional gradual a lo largo del proceso de producción de electricidad en el reactor MFC.

Se han encontrado secuencias predominantes que pertenecen al grupo de Bacteroidetes, principalmente en el inóculo procedente de una MFC que opera con purines vacunos (CM) (Tabla 2). El grupo de las Beta-proteobacterias se encuentra bien representado en las tres MFC en funcionamiento, coincidente con estudios recientes los cuáles revelan la alta diversidad de este grupo en microbial fuel cells (Lefebvre et al., 2010), y que podría tener una función importante de intercambio electrónico. Dentro de este grupo se encuentran secuencias pertenecientes a la familia de las Alcaligenaceae, Hydrogenophilaceae y destacan las bandas 25/36 (Figura. 3) relacionadas con la familia de las Comamonadaceae.

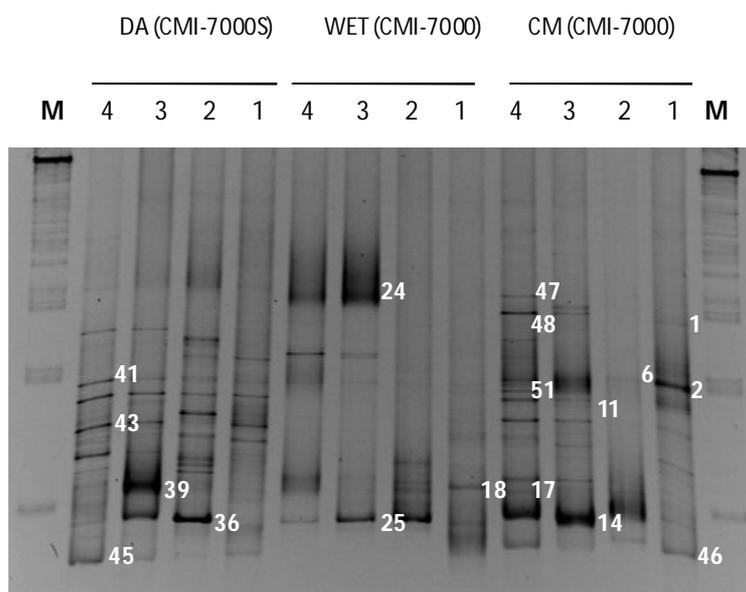


Figura 3: Gel de DGGE de genes 16SrRNA para la población total de eubacterias, de los tres inóculos, en MFC operando con la membrana catiónica (CMI-7000). Se indican las bandas cortadas y secuenciadas. M: marcador. 1: inóculo inicial; 2, 3, 4: diferentes puntos de producción de electricidad en los reactores.

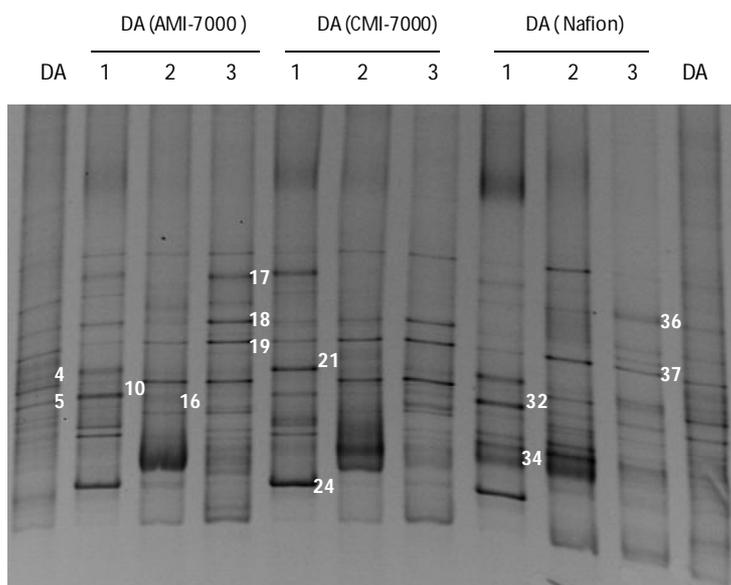


Figura 4: Gel de DGGE de genes 16SrRNA población total de eubacterias, de los reactores que operaban con el inóculo procedente de un digestor anaerobio y los tres tipos de membranas. Se indican las bandas cortadas y secuenciadas. DA: inóculo inicial procedente de un digestor anaerobio. 1, 2 y 3: diferentes puntos de producción de electricidad en los reactores.

Tabla 2: Resultados de las secuencias del gel de DGGE (Figura 3) de eubacterias en los distintos inóculos.

Bandas DGGE Eubacterias	Long. (pb)	Seq. Más similar (GenBank)	% Similitud	Grupo Filogenético (RDP)
B1	272	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone (HM443058.1)	98%	Bacteroidaceae (Bacteroidetes)
B2=B6	513	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone (AB547643.1)	100%	Bacteroidaceae (Bacteroidetes)
B11	310	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone (GQ979690.1)	98%	Bacteroidetes
B14	263	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (HQ130335.1)	98%	Pseudomonadaceae (Gammaproteobacteria)
B17	370	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (HM641131.1)	97%	Alcaligenaceae (Betaproteobacteria)
B18	430	<i>Thiobacillus thioparus</i> (HM535226.1)	99%	Hydrogenophilaceae (Betaproteobacteria)
B24	487	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (EF064151.1)	99%	Campylobacteraceae (Epsilonproteobacteria)
B25	474	<i>Comamonas testosteroni</i> (GQ140333.1)	100%	Comamonadaceae (Betaproteobacteria)
B36	470	<i>Comamonas kerstersii</i> (NR_025530.1)	99%	Comamonadaceae (Betaproteobacteria)
B39	474	<i>Alcaligenes faecalis</i> (HM597239.1)	100%	Alcaligenaceae (Betaproteobacteria)
B41	418	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene (AM982611.2)	97%	Bacteroidetes
B43	488	Uncultured Bacteroidetes bacterium (EU586217.1)	99%	Bacteroidetes
B45	472	<i>Spirochaeta sp</i> (AY800103.1)	93%	Spirochaetaceae (Spirochaetes)
B46	471	<i>Spirochaeta sp</i> (AF357916.2)	99%	Spirochaetaceae (Spirochaetes)
B47=B48	490	Uncultured bacterium clone (DQ443965.1)	98%	Porphyromonadaceae (Bacteroidetes)

El estudio de las poblaciones microbianas de eubacterias mediante DGGE a partir de MFC inoculadas con un mismo inóculo (digestor anaerobio), y ensayando tres membranas diferentes PEM (Figura 4, Tabla 3), mostró un proceso de adaptación de la comunidad (cambio de la estructura de la población) a lo largo del tiempo durante la producción de electricidad pero similar en las 3 membranas ensayadas. Sin embargo, es muy destacable que si se observaron diferencias claras en la estructura de la población de arqueas y que fue dependiente tanto del tiempo como del tipo de material de membrana utilizado. Este cambio poblacional podría estar relacionado con una mayor producción de electricidad en la MFC equipada con Nafion N-117, en la cual predominaba *Methaosarcina sp.* (datos no mostrados). La familia de las Methanosarcinaceae, son unas arqueas metanogénicas con capacidad mixta acetoclástica e hidrogenotrófica (Deremil y Scherer, 2008), que podría jugar un papel importante en el funcionamiento del reactor MFC.

Tabla 3. Resultados de las secuencias del gel de DGGE (figura 4) de eubacterias en el inóculo DA en MFC operando tres tipos de membranas PEM .

Bandas DGGE Eubacterias	Long. (pb)	Seq. Más similar (GenBank)	% Similitud	Grupo Filogenético (RDP)
B4	480	Uncultured Bacteroidetes bacterium (GU112204.1)	99%	Bacteroidetes
B5	357	Uncultured bacterium (EF559196.1)	98%	Bacteroidetes
B10=B32	425	<i>Acinetobacter seohaensis</i> (FJ392126.1)	100%	Moraxellaceae (Gammaproteobacteria)
B13	415	<i>Comamonas sp</i> (HM365952.1)	99%	Comamonadaceae (Betaproteobacteria)
B24	361	<i>Comamonas sp</i> (FJ426595.1)		Comamonadaceae (Betaproteobacteria)
B16	270	<i>Tetrathiobacter mimigardefordensis</i> (HM031463.1)	99%	Alcaligenaceae (Betaproteobacteria)
B17	440	Uncultured Bacteroidetes bacterium (CU923099.1)	94%	Porphyromonadaceae ((Bacteroidetes))
B18	499	Uncultured bacterium (AM982611.2)	95%	Bacteroidetes
B19=B37	471	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> (AY742226.1)	97%	Porphyromonadaceae ((Bacteroidetes))
B21	432	<i>Bacteroides coprosuis</i> (AF319778.1)	99%	Bacteroidaceae (Bacteroidetes)
B34	438	<i>Alcaligenes faecalis</i> (HM597239.1)	99%	Alcaligenaceae (Betaproteobacteria)
B36	475	<i>Acholeplasma sp</i> (FN813713.1)	95%	Acholeplasmataceae (Mollicutes)

El estudio de análisis de componentes principales de los perfiles de DGGE obtenidos confirman que la estructura de la población cambió con los primeros picos de producción de voltaje en el reactor, respecto al inóculo inicial (Figura 5), y a su vez la estructura de la comunidad también sufrió un cambio en los diferentes momentos de producción de electricidad en el tiempo.

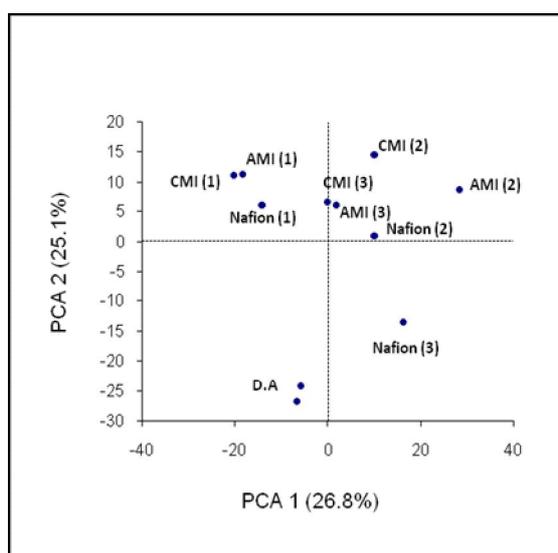


Figura 5: Diagrama 2D del análisis de componentes principales (ACP) realizado a partir de la digitalización de perfiles de bandas del DGGE de la población de eubacterias totales (gen 16SrRNA).

CONCLUSIONES

- El estudio de reactores MFC equipados con la misma membrana PEM pero con diferentes inóculos, mostró que la procedencia del inóculo condiciona el rendimiento máximo obtenido en las MFC.
- El inicio de la producción de electricidad va ligado a un cambio poblacional en los tres inóculos.
- La utilización de diferentes tipos de membranas no provocó un cambio poblacional significativo en las poblaciones de eubacterias, pero sí de arqueas, lo que podría explicar que la producción de electricidad sea superior en MFC con Nafion N-117, alcanzando un voltaje de 433 mV y una densidad de potencia de 71 mW/m².

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado en el marco de la subvención recibida a partir del proyecto del Plan Nacional del MICINN (CTM2009-12632 subprograma TECNO).

REFERENCIAS

- Deremil, B., Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Environmental Science Biotechnology*. 7, 173-190.
- Kim, B.H., Chang, I.S., Gadd, G.M (2007). Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 485-494.
- Lefebvre, O., Ha Nguyen, T.T., Al-Mamun, A., Chang, I.S., Ng H.Y. (2010). T-RFLP reveals high β -Proteobacteria diversity in microbial fuel cells enriched with domestic wastewater. *Journal of Appl. Microbiol.* 109, 839-850.
- Logan, B.E. (2007). *Microbial Fuel Cells*. Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. ISBN: 978-0-470-23948-3.
- Logan, B.E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Microbiology*. 7, 375-381.
- Pham, T.H., Rabaey, K., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schampelaere, L., Boon, N., Verstraete, W. (2006). Microbial Fuel Cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Eng. Life Science*. 6(3), 285-292.
- Sun, Y.J., Zuo, J.E., Cui, L.T., Dang, Y. (2008). Analysis of microbial diversity in microbial fuel cells under different wastewater. *China Environmental Science*. 28(12), 1068-1073.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M. (2005). Bacterial community dynamics and PAHs degradation during bioremediation of a heavily creosote-contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*. 71, 7008-7018.