



Microbial Fuel Cells para el desarrollo de sistemas de biorremediación y biosensores de zonas contaminadas con arsénico

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERÍA

Javiera Anguita¹, Alumna de sexto año

Ignacio Vargas², Profesor Asistente

¹DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOPROCESOS

²DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA HIDRÁULICA Y AMBIENTAL

INTRODUCCIÓN

En el norte de Chile existen lugares con altas concentraciones de arsénico. Un ejemplo es el río Lluta, en la región de Arica y Parinacota, donde el arsénico proviene, principalmente, de fuentes geotermales, afectando la productividad agrícola de la cuenca y la salud de sus habitantes. Para que las concentraciones se encuentren dentro del límite aceptado por la Organización Mundial de la Salud (WHO), $50 \mu\text{g L}^{-1}$ en agua [1], es necesario monitorear y controlar las fuentes naturales de arsénico y su reactividad con los sedimentos cercanos a las fuentes geotermales.

El arsénico es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, con predominancia en ambientes acuosos de arsenito $[\text{As}(\text{III})]$ y arseniato $[\text{As}(\text{V})]$. Destaca por su toxicidad en humanos y otras formas de vida, pudiendo provocar cáncer e incluso la muerte, siendo más tóxico el

arsenito que el arseniato debido a la estabilidad de sus reacciones. Sin embargo, existen microorganismos capaces de tolerar altas concentraciones, llegando incluso a utilizarlo en su metabolismo para la obtención de energía, mediante reacciones redox.

Microbial Fuel Cells (MFC) emerge como una nueva alternativa para estudiar microorganismos extremófilos y sus interacciones con los ciclos geoquímicos de elementos o contaminantes de interés, en particular aquellos que participan en la química del arsénico. Una MFC es un reactor electroquímico-biológico que actúa como una batería, transformando energía química, presente en desechos orgánicos, en energía eléctrica. Los microorganismos capaces de catalizar estas reacciones son denominados “electroquímicamente activos” [2]. Actualmente esta técnica puede ser aplicada para la producción de energía, el desarrollo de biosensores [3] o, incluso, la biorremediación de aguas contaminadas al cambiar, in situ, la especiación de un contaminante [4].

METODOLOGÍA

Se utilizaron sedimentos de la parte alta del río Lluta, en la región de Arica y Parinacota, sector cercano al volcán Tacora. Estos sedimentos poseen pH ácido y altas concentraciones de arsénico, hierro y materia orgánica. Análisis previos realizados sobre estos sedimentos revelan la presencia de microorganismos capaces de oxidar As(III), mecanismo que puede ocurrir intra o extracelularmente [5]. Para determinar la naturaleza de esta oxidación se utilizó un dispositivo MFC (kit MudWatt™ - MFC, Keego Technologies®) utilizando 0,3 L de sedimentos extraídos desde el sitio de estudio (Figura 1). Los electrodos utilizados como ánodo y cátodo en el reactor MFC son de esponja de carbón, un material poroso y conductor que favorece el crecimiento de biopelículas microbianas y permite la conducción de electrones.

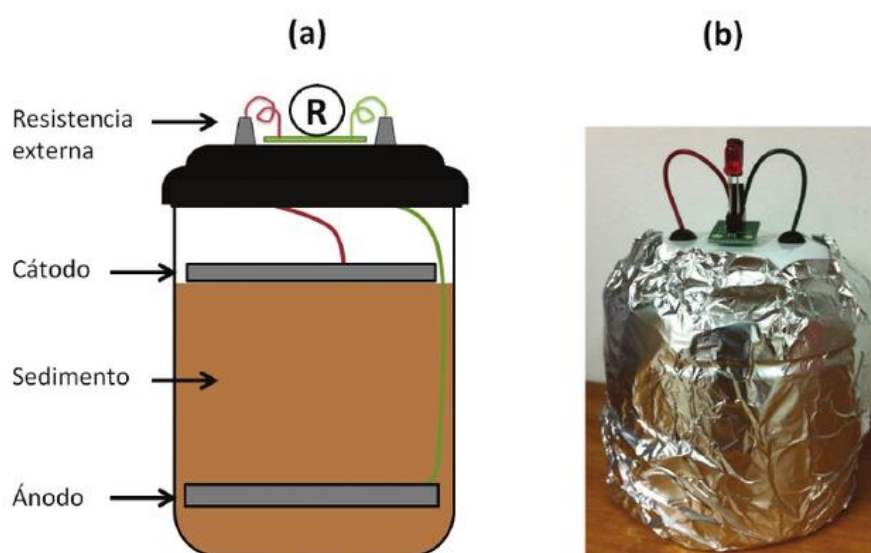


Figura 1: Microbial Fuel Cell utilizando sedimentos: a) esquema de MFC destacando el ánodo y el cátodo, b) fotografía de MFC cubierto con papel metálico.

Para caracterizar una MFC se utilizan principalmente 2 técnicas: curvas de polarización y curvas de potencia. Mediante ambas técnicas se puede: (i) determinar si el sedimento posee microorganismos electroquímicamente activos y (ii) caracterizar la MFC determinando las condiciones óptimas de funcionamiento (máxima potencia generada) y su resistencia interna. Ambos test se realizan simultáneamente conectando una resistencia externa y realizando un barrido desde resistencias externas bajas hacia resistencias externas altas [6], midiendo el voltaje generado y calculando la corriente a través de la ley de Ohm, Ecuación (1). Las curvas se realizaron en un intervalo de resistencias externas desde 1.000 Ω hasta 200.000 Ω , utilizando saltos de 1.000 Ω entre [1.000, 50.000], saltos de 5.000 Ω entre [50.000, 100.000] y saltos de 20.000 Ω entre [100.000, 200.000]. El voltaje fue registrado utilizando un datalogger modelo ADC-22 (Pico Technology Limited). Este test fue realizado ocho semanas después de la construcción de la MFC para permitir que los microorganismos se adaptaran a los electrodos.

$$\text{Intensidad de corriente (Ampere)} = \frac{\text{Voltaje (Volt)}}{\text{Resistencia (Ohm)}} \quad (1)$$

Para testear la hipótesis que microorganismos **electrotróficos** (capaces de tomar electrones como fuente de energía) utilizan la oxidación de arsénico como mecanismo extracelular de transporte de electrones desde la célula al cátodo, éste fue extraído y analizado (Figura 2). Se desarrollaron dos test para observar el crecimiento de microorganismos sobre el cátodo y cuantificar su efecto catalizador en la transferencia de electrones: (i) un test electroquímico (voltametría de barrido lineal) y (ii) microscopía epifluorescente.



Figura 2: Cátodo de Microbial Fuel Cells.

La voltametría de barrido lineal (LSV: acrónimo de su nombre en inglés) es utilizada para detectar posibles reacciones que ocurren a un voltaje determinado, realizando un barrido de voltaje y midiendo la corriente. Para realizar este test se utilizó una MFC cúbica (ver Figura 3), un electrodo de referencia de Ag/AgCl ($E^{\circ} = 0,22 \text{ V}$), un contraelectrodo de platino y el cátodo extraído de la MFC como electrodo de trabajo [7] y un potenciostato para controlar los electrodos. Se realizaron 3 pruebas, utilizando un barrido de voltaje desde $0,2 \text{ V}$ a $-0,8 \text{ V}$, utilizando intervalos de $0,02 \text{ V}$: (i) cátodo nuevo (sin bacterias), utilizando un medio de PBS [8] 50 mM y 2 g/L de acetato, (ii) **biocátodo** (cátodo extraído de MFC con sedimentos) un medio de PBS 50 mM y 2 g/L de acetato, (iii) biocátodo (cátodo extraído de MFC con sedimentos) un medio de PBS 50 mM , 2 g/L de acetato y $0,3 \text{ mg/L}$ de arseniato, As(V) .

Para la microscopía epifluorescente se utilizó el **fluoróforo** naranja de acridina al 1% , el que se une a las cadenas de ADN o ARN, dando muestra de la existencia de microorganismos en el electrodo. El fluoróforo se dejó actuar por 10 minutos para, luego, lavar con agua y observar al microscopio epifluorescente.

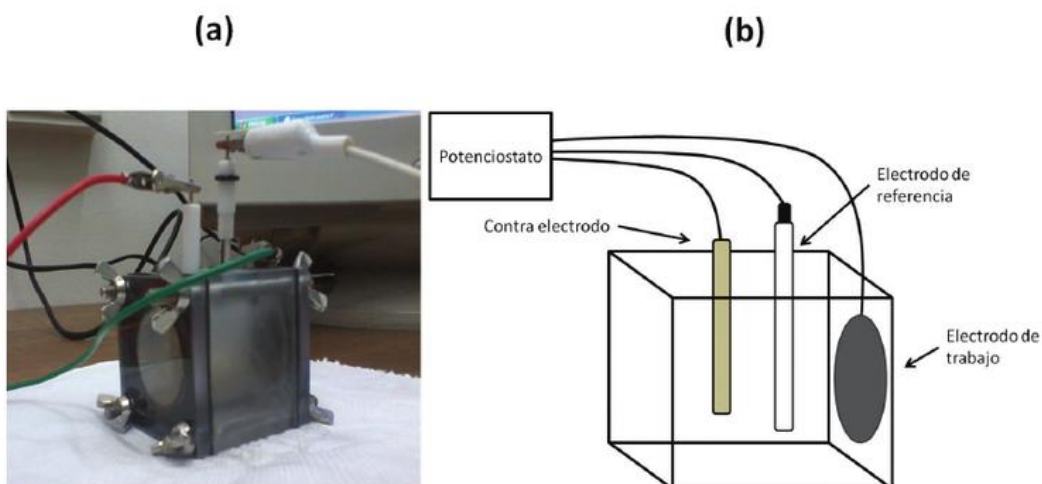


Figura 3: Celda electroquímica utilizada en las mediciones de voltametría lineal de barrido (LSV): a) Fotografía montaje utilizado en el laboratorio; b) Esquema de celda electroquímica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de polarización y potencia de la MFC, utilizando sedimentos, indican que la máxima potencia que puede generar la MFC es $0,22 \text{ mW/m}^2$ y que posee una resistencia interna de 15.000Ω (Figura 4). La potencia máxima es menor a los 18 mW/m^2 reportados para sedimentos con arsénico provenientes de Mono Lake, California [9]. Esto se puede deber a la alta resistencia interna del reactor, por lo tanto, si se logra reducir la resistencia interna de los sedimentos o aislar los microorganismos y utilizarlos en sedimentos con menor resistencia interna, la energía producida por unidad de área podría ser mayor. Además, esta capacidad de generar corriente eléctrica, aunque no sea de manera competitiva, posiciona a las MFCs como una herramienta para el estudio in situ de las reacciones redox que están ocurriendo en estos sedimentos.

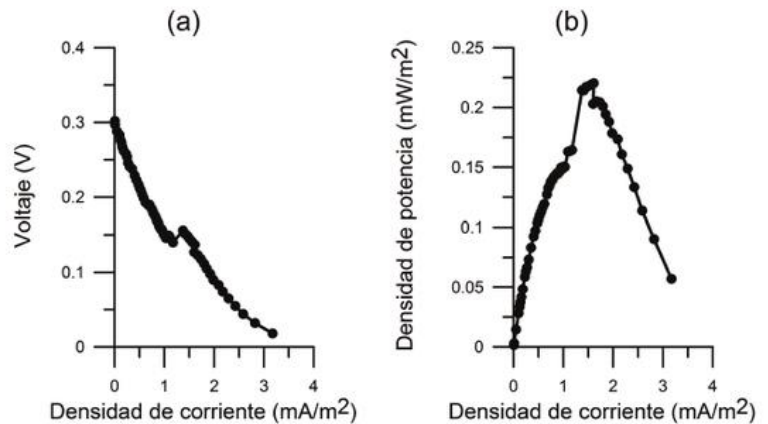


Figura 4: Curvas de polarización (a) y potencia (b).

Los resultados de la voltametría lineal de barrido (Figura 5) muestran mejoras en el rendimiento del cátodo a través de un aumento en el valor absoluto de la corriente, al cambiar el electrodo nuevo (abiótico) por el cátodo extraído de la MFC con sedimentos, probablemente debido a la acción microbiana. Sin embargo, al adicionar As(V) se observa una disminución del valor absoluto de la corriente medida, que sugiere la existencia de otros aceptores de electrones más eficientes energéticamente (poseen un mayor potencial de reducción). Un aceptor más eficiente energéticamente es el Fe(III) , el que se encontraba en los sedimentos y puede estar en el cátodo debido a que éste no fue lavado antes de realizar el test para no eliminar los microorganismos que pudiesen estar en la superficie, pero al adicionar As(V) , éste es utilizado en las reacciones catódicas.

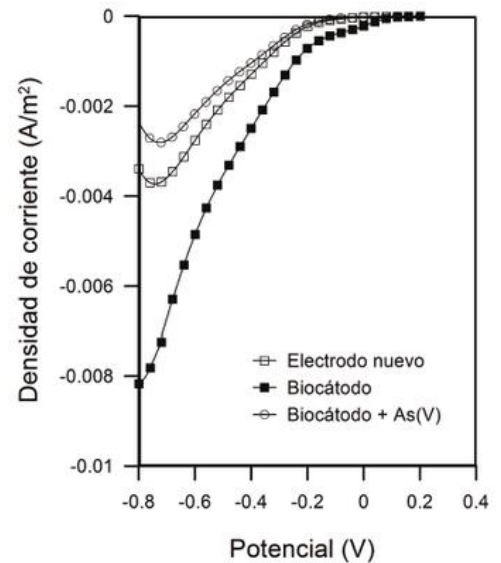


Figura 5: LSV del biocátodo comparado con un control abiótico (electrodo nuevo) en un medio ajustado a pH 5.

Al observar el cátodo en el microscopio epifluorescente se identificaron puntos luminiscentes asociados a la presencia de microorganismos creciendo sobre las fibras del electrodo (Figura 6). La observación de estos microorganismos y los resultados de LSV sugieren la ocurrencia de una catálisis biológica para la transferencia de electrones, probablemente a través de reacciones de oxidación y reducción de arsénico o hierro. Esta hipótesis debe ser comprobada con análisis más específicos que permitan saber si estos microorganismos poseen la capacidad de oxidar arsénico, para recircularlo en el cátodo.

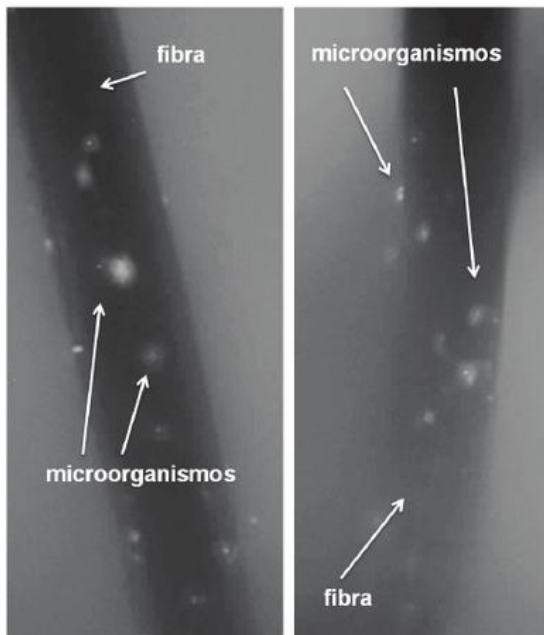


Figura 6: Cátodo observado mediante microscopía epifluorescente. Se pueden apreciar microorganismos (puntos luminiscentes) sobre las fibras del cátodo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la curva de polarización y curva de potencia de la MFC, utilizando sedimentos, muestran que estos poseen la capacidad de actuar como una pila con una alta resistencia interna 15.000Ω y un potencial máximo de $0,22 \text{ mW/m}^2$. Presumiblemente, esto se deba a bacterias exoelectrogénicas que son capaces de ceder electrones al ánodo y, a su vez, a bacterias electrotróficas que sean capaces de captar estos electrones en el cátodo. Además, las variaciones en la corriente, producto de la voltametría lineal de barrido, sugieren que los microorganismos están catalizando reacciones y que el arsénico puede estar envuelto en éstas, lo que concuerda con análisis previos que confirman la presencia del gen arsenito oxidasa en estos sedimentos.

La existencia de microorganismos en el cátodo, que se puede observar mediante la tinción con el fluoróforo que se une a ADN o ARN, confirma la presencia de microorganismos creciendo sobre las fibras del electrodo. Estos resultados refuerzan la hipótesis de una catálisis biológica de las reacciones de óxido-reducción necesarias para generar el potencial medido.

El entender las reacciones que están ocurriendo y quiénes las están catalizando permite preguntarse cómo es posible utilizar estos microorganismos para solucionar las problemáticas de zonas contaminadas con arsénico mediante biorremediación, disminuyendo su grado de movilidad y/o toxicidad, además de utilizar las MFC como biosensores, los que permitirán monitorear la concentración del contaminante mediante la señal eléctrica que está produciendo [3].

PRINCIPIO CIENTÍFICO UTILIZADO

Microbial Fuel Cell es un reactor electroquímico-biológico que transforma energía química en energía eléctrica utilizando microorganismos como catalizadores. La energía química se encuentra en los enlaces de un compuesto, como la materia orgánica, la que es oxidada cediendo electrones al ánodo. Estos electrones fluyen por un cable conductor generando la corriente eléctrica, los que finalmente llegan hasta el cátodo, donde son utilizados para la reducción de un compuesto como As(V) (ver Figura 7a) [2].

Los microorganismos que catalizan las reacciones en una MFC se denominan electroquímicamente activos (EAB) pues poseen la particularidad de exportar electrones, recibiendo el nombre de **exoelectrogénicos**, de aceptar electrones desde el exterior, recibiendo el nombre de **electrotróficos**. La transferencia de electrones, desde el electrodo hacia el microorganismo, puede realizarse mediante tres mecanismos: contacto directo, nanocables y transportadores [10].

Los transportadores son moléculas capaces de transportar los electrones desde el electrodo hacia el microorganismo, el arsénico puede ser un transportador catódico el que se reduce en el cátodo y se oxida por acción del microorganismo que lo utiliza como fuente de energía (ver Figura 7b).

Oxidación biológica en el ánodo: Materia Orgánica \rightarrow CO₂ + e⁻ + H⁺

Reducción química en el cátodo: As(V) + e⁻ \rightarrow As(III)

Recirculación de arsénico por oxidación biológica: As(III) \rightarrow As(V) + e⁻

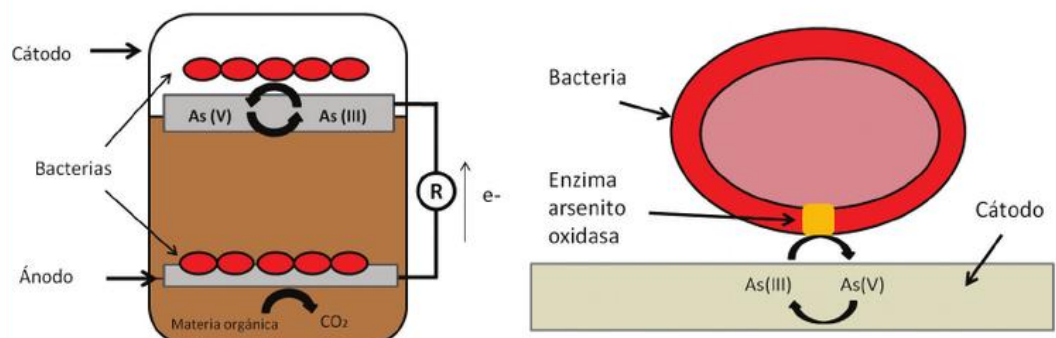


Figura 7: a) Esquema de una MFC que utiliza materia orgánica como dador de electrones en el ánodo, arsénico como aceptador de electrones en el cátodo y recirculación biológica de arsénico. b) Esquema de la reacción propuesta de oxidación biológica de As(III) y reducción química de As(V).

GLOSARIO

Biocátodo: Electrodo en el que, mediante catálisis biológica, se produce una reacción de reducción.

Electrotrófico: Capacidad de algunos microorganismos para captar electrones desde el extracelular.

Exoelectrogénico: Capacidad de algunos microorganismos para ceder parte de los electrones al medio extracelular.

Fluoróforo: Molécula que posee la capacidad fluorescer, debido a que absorbe radiación a una cierta longitud de onda y emite radiación a una longitud de onda menor.

Microbial Fuel Cell: Celda de combustible que utiliza microorganismos como catalizadores de las reacciones de óxido-reducción.

Microscopía de Epifluorescencia: Técnica que utiliza un microscopio óptico, en el que la luz incide en la muestra y, parte de esta luz, es absorbida por el fluoróforo para luego emitir radiación y generar la fluorescencia.

Redox: Reacciones de oxidación y reducción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto FONDECYT 11110112/2011. Agradecimientos a Eduardo Leiva, alumno de doctorado del Departamento de Ingeniería Hidráulica y Ambiental (bajo la supervisión del profesor Pablo Pastén), por entregar información geoquímica del lugar, de gran importancia para la elaboración de este trabajo, y a Max Felis, alumno de pregrado de Ingeniería Civil mención Biotecnología, por su colaboración en la tinción del ADN y ARN.

REFERENCIAS

1. OMS, *Environmental Health Criteria 224: Arsenic and arsenic compounds*. Organización Mundial de la Salud, 1996.
2. LOGAN, B.E., REGAN, J. M. Microbial Fuel Cells Challenges and Applications. *Environmental Science & Technology*, 40(17): pp. 5172-5180, 2006.
3. NAMOUR, P., JAFFREZIC-RENAULT, N. Sensors for measuring biodegradable and total organic matter in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(8): pp. 848-857, 2010.
4. ZHANG, Y., ANGELIDAKI, I. Bioelectrode-based approach for enhancing nitrate and nitrite removal and electricity generation from eutrophic lakes. *Water Research*, 2012(0).
5. Lloyd, J.R., Oremland, R.S. Microbial transformations of arsenic in the environment: From soda lakes to aquifers. *Elements*, pp. 85-90, 2006.
6. LOGAN, B.E., ET AL. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17): pp. 5181-5192, 2006.
7. PISCIOTTA, J.M., ET AL. Enrichment of Microbial Electrolysis Cell Biocathodes from Sediment Microbial Fuel Cell Bioanodes. *Applied and environmental microbiology*, 78(15): pp. 5212-5219, 2012.
8. LOGAN, B., ET AL. Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 41(9): pp. 3341-3346, 2007.
9. MILLER, L., OREMLAND, R. Electricity generation by anaerobic bacteria and anoxic sediments from hypersaline soda lakes. *Extremophiles*, 12(6): pp. 837-848, 2008.
10. LOGAN, B.E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5): pp. 375-381, 2009.

EQUIPO DE INVESTIGADORES

1. Javiera Anguita
2. Profesor Ignacio Vargas

