



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

FACULTAD DE MINAS

ESCUELA DE PROCESOS Y ENERGIA

TESIS DE MAESTRÍA:

**MODELO DE ÁNODO Y VALIDACIÓN  
EXPERIMENTAL PARA UNA CELDA DE  
COMBUSTIBLE MICROBIANA**

Tesis presentada por Juan Esteban Velez Alvarez. Para optar al título de

Magíster en Ingeniería Química.

---

Dirigida por:

Carlos Ignacio Sanchez Saenz



# Tabla de Contenido

DESCRIPCIÓN	I
Agradecimientos	V
Listado de Variables	IX
Introducción	XI
<b>1 OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo General . . . . .	1
1.1.1 Objetivos Específicos . . . . .	1
<b>2 MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
2.1 Transporte de Electrones y Mecanismo de Adhesión . . . . .	3
2.2 Transporte de electrones . . . . .	4
2.2.1 Células Procarióticas . . . . .	5
2.2.2 Células Eucariotas . . . . .	8

2.3	Mecanismos de Adhesión y Formación de Biopelícula . . . . .	13
2.4	Termodinámica de Procesos Irreversibles . . . . .	16
2.5	Balances de Materia, Energía y Entropía . . . . .	21
2.5.0.1	Balances de Entropía y Segunda Ley . . . . .	26
2.6	Relaciones y Coeficientes Fenomenológicos de Onsager . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>33</b>
3.1	Curva de Crecimiento y Consumo de Glucosa . . . . .	33
3.2	Montaje de Celdas Microbianas . . . . .	36
3.2.1	Celdas en Erlenmeyers . . . . .	36
3.2.2	Celdas Diseñadas . . . . .	38
3.3	Técnicas Electroquímicas . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Resultados Y Discusión</b>	<b>45</b>
4.1	Resultados Experimentales . . . . .	45
4.1.1	Curva de Crecimiento y Azúcares Reductores . . . . .	47
4.1.2	Ensayos Electroquímicos . . . . .	52
4.1.3	Voltametría Cíclica Y Electrodo de Disco Rotatorio . . . . .	60
4.2	Simulación . . . . .	66
4.2.1	Supuestos del modelo . . . . .	66
4.2.2	Descripción del Modelo . . . . .	68
4.2.3	Resultados de la Simulación . . . . .	75

<i>TABLA DE CONTENIDO</i>	5
4.3 Modelo Termodinámico Lineal de No equilibrio . . . . .	88
4.3.1 Supuestos del modelo . . . . .	88
4.3.2 Descripción del Modelo . . . . .	89
<b>5 Conclusiones</b>	<b>101</b>
<b>6 Recomendaciones</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>111</b>
6.1 SCRIPTS EN SCILAB . . . . .	111
6.1.0.1 Captura de archivos .csv . . . . .	111
6.1.0.2 Depuración de Matriz . . . . .	114
<b>Bibliografía</b>	<b>115</b>



# DESCRIPCIÓN

## MODELO ÁNODICO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

### Resumen:

El presente trabajo, aborda el modelamiento matemático y termodinámico de un ánodo para una celda de combustible microbiana empleando la cepa *E.coli* así como su validación experimental mediante el desarrollo de una metodología, esta con el fin de determinar algunos parámetros necesarios para alimentar el modelo (p.ej Electrodo de disco rotatorio) y establecer el grado de validez de la representación matemática del ánodo.

Este modelo incluye el abordaje desde dos perspectivas, la primera enmarcada en los fenómenos de transporte, la cual incluye el modelamiento mediante la herramienta computacional FreeFem++, la segunda, consiste en la presentación de este modelo pero empleando la termodinámica de procesos irreversibles, con el fin de mostrar la importancia de los fenómenos cruzados en la descripción matemática de las celdas de combustible microbianas, al final se concluye cual de las dos aproximaciones fue mas importante a la

hora de determinar la densidad de corriente en estos dispositivos.

**Palabras Clave:** ánodo, modelo, termodinámica irreversible, FreeFem++, simulación, celdas de combustible microbianas, validación experimental.

## DESCRIPTION

### ANODIC MODEL OF A MICROBIAL FUEL CELL

This paper addresses the mathematical and thermodynamic modeling of an anode for a microbial fuel cell using the strain *E. coli* and its experimental validation by developing a methodology in order to determine some parameters needed to feed the model (i.e. the rotatory disk electrode) and establish the degree of validity of the mathematical representation of the anode.

This model includes the approach from two perspectives, the first framed in transport phenomena, which includes modeling by the computational tool FreeFem++, the second, is the presentation of this model but using the thermodynamics of irreversible processes, in order to show the importance of the crossed phenomena in the mathematical description of microbial fuel cells, finally it follows which of the two approaches was more important in determining the current density in these devices.

**Keywords :** anode, model, irreversible thermodynamics, FreeFem++, simulation, microbial fuel cells, experimental validation.



# AGRADECIMIENTOS

En lo académico, agradezco a los grupos GRIEQUI y PROBIOM por todas las ayudas, asesorías y apoyo brindados.

En cuanto a la componente biotecnológica y de aguas de este trabajo, destaco las asesorías y consejos por parte de la profesora Amanda Lucia Mora, quien puso a mi disposición parte de su tiempo a pesar de sus múltiples obligaciones, cosa que agradezco enormemente.

Juliana Soler y Eliana Zapata, no solo fueron mi soporte en lo concerniente a lo microbiológico (Algunos Medios de cultivo empleados en este trabajo son de su autoría) y técnicas de laboratorio de este trabajo, sino también un gran grupo de trabajo en el que se conjuga el colegaje y la amistad, a ellas dos gratitud infinita.

A todos los miembros del grupo que de una u otra forma participaron de este proyecto mil gracias, en especial Ledys, Elizabeth y Maria Clara.

Para el final, destaco enormemente a la profesora Maria Yepes, sus asesorías, su ética de trabajo y apoyo incondicional la convirtieron en conjunto con el profesor Carlos Sanchez

en mis mayores mentores académicos, todo lo que logre de aquí en adelante sera especialmente gracias a sus enseñanzas tanto en lo personal como en lo profesional, debido a ellos aprendí a caminar solo en el mundo de la ciencia, no hay palabras que pueden expresar mi gratitud.

Concerniente a la electroquímica, destaco el apoyo del grupo GRIEQUI, por facilitarme las instalaciones de su laboratorio, sin embargo el mayor aporte a parte del aprendizaje fue la oportunidad de trabajar con una de las personas con mas conocimiento en el área que se pueda encontrar en el país, me refiero al profesor Carlos Ignacio Sanchez, que como señale en un párrafo anterior, mas allá de un guía académico, se convirtió en un ejemplo a seguir en el campo personal.

También destaco la ayuda y el compañerismo de Sebastian Gonzalez, cuyo labor contribuyo enormemente en el montaje de los experimentos.

Gracias también a los profesores Javier Gonzalez y Rafael Ribadeneira, por sus aportes a este trabajo y a mi formación.

A los profesores que tuve durante mi etapa formativa en la maestría solo gratitud, destacando principalmente a Daniel Barragan y Juan Pablo Hernandez, quienes influenciaron tanto este trabajo, como a mi personalmente, sin su guía, esto hubiera sido imposible.

En lo personal mi familia siempre ha sido un grandisimo apoyo, en un país donde la ciencia es un paria, la familia se transforma en el principal mecenas. A mis padres, hermano, abuelos, tios y tias, espero algún día retribuirles aunque sea un poco, mas que eso, es

humanamente imposible.

Lina Maria Preciado, mi musa y compañera de la vida, sin tu ejemplo, apoyo y afecto, no habría terminado jamás este trabajo, mas que agradecerte, desearía poder seguir apoyándote y acompañando en este breve camino, continuar complementándonos y seguir el aprendizaje.

Al CIEN-EPM por el apoyo económico, sin el cual nada de esto se hubiera podido realizar, en un país donde no se cree en la ciencia , ni en la educación, son un oasis por apoyar muchas de estas ideas quijotescas.

A la memoria de Tabatha, Alba y Sussy, ustedes marcaron mi destino con su apoyo y fe incondicional en mi.



# Listado de Variables

- ▷  $\mathbf{v}$ : Velocidad ( $\frac{m}{s}$ )
- ▷  $V$ : Volumen ( $m^3$ )
- ▷  $\rho$ : Densidad ( $\frac{kg}{m^3}$ )
- ▷  $\Pi$ : Tensor de esfuerzo viscoso
- ▷  $\mu$ : viscosidad dinámica  $N.s/m^2$
- ▷  $\nu$ : viscosidad cinemática  $m^2/s$
- ▷  $L_{ij}$ : Coeficiente fenomenológico de Onsager, flujo  $i$  fuerza  $j$
- ▷  $w$ : velocidad angular (rpm)
- ▷  $i$ : Corriente eléctrica (A)
- ▷  $j$ : Densidad de corriente eléctrica ( $A/m^2$ )
- ▷  $A$ : Afinidad Química (kJ/mol)

- ▷  $F$ : Constante de Faraday  $96485.34C/mol$
- ▷  $n$ : Numero de electrones
- ▷  $R$ : Constante de gases universal  $8.3144 J/(K.mol)$
- ▷  $\Delta G_r$ : Energía libre de reacción (kJ/mol)
- ▷  $\epsilon$ : Permitividad eléctrica
- ▷  $\mu_i$ : Potencial químico (kJ/mol)
- ▷  $\Pi$ : Tensor de esfuerzo viscoso
- ▷  $E$ : Campo eléctrico (v/m)
- ▷  $R_L$ : Resistencia de Carga  $\Omega$
- ▷  $\gamma_{b/s}$ : Rendimiento biomasa-sustrato.
- ▷  $S$ : Entropía (J/K) Clausius.
- ▷  $U$ : Energía interna (J)
- ▷  $r$ : Velocidad de Reacción (mol/s)
- ▷  $\phi$ : Potencial eléctrico (v)
- ▷  $P$ : Presión (Pa)
- ▷  $\eta$ : Grado de acople

# INTRODUCCIÓN

La intención de reunir en el diseño de un dispositivo o un proceso la solución a una problema técnico de la industria o la sociedad es el objeto de cualquier rama de la ingeniería, si a lo anterior se le puede adicionar otros beneficios hace de dicha solución algo indispensable, en tal sentido este trabajo pretende presentar a las celdas de combustible microbianas como una alternativa en la cual convergen simultáneamente la posibilidad de solución a dos dilemas, la suficiencia energética por un lado y la descontaminación de las fuentes hídricas como valor añadido, en los párrafos a continuación se presentara una breve descripción del proceso acompañado de una justificación para la solución de la problemática planteada por la vía de las celdas de combustible microbianas. Finalmente este trabajo, pretende dar luz respecto de la real potencialidad de estos dispositivos para resolver lo que *a priori* prometen.

El porqué de esta aplicación radica en que uso de combustibles fósiles y nucleares para satisfacer la creciente demanda energética de la humanidad, ha conducido a un deterioro continuado del medio ambiente concretamente la disminución de la calidad del aire, agua

y suelo, evidenciado esto en el aumento de la concentración de  $CO_2$  las cada vez menores reservas de agua y el deterioro de la tierra cultivable respectivamente [1]. De lo anterior se evidencia la importancia de desarrollar tecnologías limpias para la generación eléctrica, si a esto se suma la posibilidad de remediar en algo los daños surgidos de la actividad humana se tendría una solución ideal a la problemática ambiental y energética actual, de allí que la generación eléctrica a partir de la oxidación de sustancias biodegradables empleando celdas de combustible microbianas (MFC), se constituya en un tópico de estudio con renovado interés en la actualidad [2].

Las celdas de combustible microbianas deben constar de un ánodo un cátodo y un electrolito, en donde el sustrato deba ser oxidado en el ánodo y reducido en el cátodo de manera continua, el electrolito permite el paso de iones únicamente y el electrodo el de electrones. El mecanismo mediante el cual se transfieren electrones hacia el ánodo, puede ser mediante mediadores de electrones, es decir sustancias que facilitan el intercambio de electrones (p.ej Antraquinona), transferencia de electrones directa en membrana u otros mecanismos [3].

En la fabricación de las celdas de combustible microbianas, es de interés el tipo o tipos de microorganismos a utilizar dependiendo del sustrato de interés; en este caso concreto agua residual, la cual puede tener una gran variedad de contaminantes según la zona en la que se encuentre la fuente de agua a tratar. Si es el caso de agua con alto contenido de colorantes tipo azo se pueden emplear como microorganismos oxidantes hongos

ligninolíticos o lodos provenientes de plantas de tratamiento [4], estos últimos presentan diferentes cantidades de potencia generada dependiendo del contaminante tratado y de la procedencia del lodo, lo que indica que un resultado exitoso en el diseño de las MFC, es precisamente la elección de los microorganismos apropiados para el área problemática. En este sentido se ha podido corroborar que la generación de potencia eléctrica es superior cuando se trabaja con consorcios microbianos, que cuando se emplean una sola especie de microorganismos, esto se debe a una sinergia entre especies que de cierta forma permite que se produzcan y mantengan condiciones apropiadas para que la comunidad se conserve y mantenga unos índices metabólicos apropiados, que en definitiva mejoran el rendimiento global de la celda a diferencia de si se emplean microorganismos de una sola especie [5].

Respecto del tipo o tipos de reactores, en las MFC se trabajan fundamentalmente dos clases, de cámara sencilla y de cámara doble. El primero consiste en ánodo, cátodo y electrolito, este último es el mismo sustrato, normalmente ambos electrodos están fabricados de carbón grafito, telas de carbón o papel carbón, de estos el ánodo es colonizado por microorganismos, y permanece en contacto con el sustrato; por su parte el cátodo, puede ser, recubierto de microorganismos, de platino impregnado en grafito o dióxidos de magnesio en grafito, debiéndose garantizar el contacto con un aceptor final de electrones como ferrocianida, oxígeno molecular o aire, para llevar a cabo el proceso de reducción, cerrando de esta forma el circuito. En el caso de las celdas de combustibles microbianas de cámara doble, el ánodo es de igual forma colonizado por microorganismos, el cátodo

debe ser similar al caso anterior, con la diferencia que ánodo y cátodo están separados por una membrana polimérica, generalmente NAFION<sup>®</sup> [6].

La razón de ser de este trabajo, se fundamenta en la necesidad de entender un poco mas algunos de los procesos asociados al funcionamiento de las celdas de combustible microbianas, las cuales presentan unas particularidades que las diferencia de dispositivos similares, como las celdas de combustible de hidrógeno-oxígeno, dado que los microorganismos hacen las veces de catalizador, con las implicaciones que esto tiene, ya que el rendimiento esta sujeto a las necesidades metabólicas de estos individuos quienes realizan sus funciones vitales anclados a la superficie de un soporte de carbono. Para contribuir a la comprensión de estos dispositivos este trabajo busca encontrar una relación que describa el comportamiento del ánodo microbiano asociado a la concentración de materia orgánica disuelta en el agua, para ello se plantean dos metodologías diferentes, en primer lugar empleando ecuaciones de balance clásicas de los fenómenos de transporte, para resolver el perfil de concentración. De otro lado se tiene una estrategia basada en la termodinámica de los procesos irreversibles, en la cual partiendo de la primera y segunda ley de la termodinámica se busca establecer los flujos y fuerzas que existen teóricamente bajo este esquema, dando explicación al observable elegido, es decir, cuales leyes fenomenológicas predominan en el electrodo donde se aglutinan los microorganismos. Este desarrollo teórico debe ser acompañado de una validación experimental, basada en el montaje de una celda de combustible microbiana de cámara sencilla y como combustible, agua resid-

ual artificial.



# 1

## OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Desarrollar un modelo de ánodo para una celda de combustible microbiana que permita establecer la relación entre el flujo eléctrico producido (corriente) y el metabolismo de una cepa bacteriana.

#### 1.1.1 Objetivos Específicos

1. Plantear ecuaciones de balance para los flujos y fuerzas que intervienen en el proceso de generación eléctrica.
2. Establecer una metodología experimental para el desarrollo de celdas de combustible microbianas.

3. Simular el comportamiento del ánodo microbiano en una configuración de celda de combustible microbiana.
4. Determinar la validez del modelo mediante comparación con el montaje experimental.

## 2

# MARCO TEÓRICO

## 2.1 Transporte de Electrones y Mecanismo de Adhesión

En este capítulo se abordara el tema de los mecanismos de transferencia de electrones, adhesión al electrodo y características de los microorganismos que potencialmente pueden ser empleados en el diseño de celdas de combustible microbianas (MFC de aquí en adelante). Esto ultimó con el fin de dar una base teórica y conceptual acerca del objeto de este trabajo y permitir al lector una mejor comprensión del modelo planteado.

Así mismo se plasmaran algunas de las hipótesis empleadas a lo largo de este estudio desde el punto de vista del metabolismo microbiano.

Muchos de los supuestos y simplificaciones que se emplearan en el desarrollo del modelo,

se mencionaran en esta sección, cabe aclarar que el empleo de gradientes y no diferenciales, obedece a la necesidad de darle la mayor generalidad posible a la descripción matemática del sistema, con el fin que posteriores trabajos dentro del grupo GRIEQUI puedan modificarlo y simplificarlo según la necesidad.

## 2.2 Transporte de electrones

El centro de las celdas de combustible en general, es la generación electrónica o el suministro constante de electrones mediante una reacción llevada a cabo en uno de los electrodos, en concreto el ánodo. En ese orden de ideas las celdas de combustible microbianas (MFC) no son la excepción y cuya única diferencia respecto de otros dispositivos similares es la naturaleza de el catalizador de la reacción anteriormente mencionada, el cual generalmente consiste en una red cristalina conformada por algún metal o aleación en donde se favorece la oxidación de algún combustible, las MFC en cambio poseen una colonia de microorganismos que realizan una labor similar siempre que el combustible alimentado sea apto para efectuar sus funciones metabólicas, por lo que el electrodo constituye un receptor de aquel flujo de electrones generado en el proceso global de dicho metabolismo, lo cual añade cierta complejidad a estos dispositivos ya que es necesario añadir el factor biótico con todo lo que ello implica, a continuación se expondrá a grandes rasgos lo relacionado con este fenómeno de generación de electrones y su transferencia al electrodo.

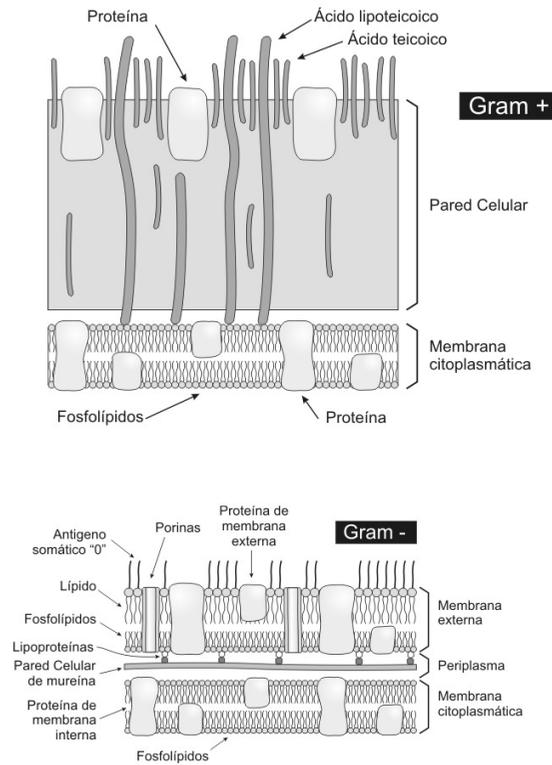
### 2.2.1 Células Procarióticas

La generación de electrones en estas células parte del hecho de la existencia de cadenas transportadoras de estos, es decir, ciclos de oxidación reducción alternante en los acarreadores de electrones, que para este caso son NADH y FADH<sub>2</sub> [7]. También se ha encontrado que este flujo está asociado a sustancias solubles excretadas por la célula, en el caso concreto de la especie de bacteria *E. coli*, (la cual en un principio se pensó que no podría emplearse para celdas de combustible sin la respectiva modificación genética) mediante un proceso de activación electroquímico ha sido posible emplearla en celdas de combustible microbianas, que al parecer induce la producción de tres compuestos claves en el transporte de electrones hacia el electrodo, estos son: etil 2-aminoacetimidato, metil 4-etoxybutanoato, 3-isobutilhexahidropirrol [1,2-a]pirazina-1,4-diona [8]. Este hallazgo permite especular acerca de la posibilidad de que cualquier microorganismo pueda ser empleado en las celdas de combustible microbianas, así estos en un principio presenten una actividad baja o nula, todo depende del estímulo inicial apropiado, este argumento ya había sido expuesto por Potter en 1911, quien mencionara por primera vez la posibilidad de generar electricidad mediante celdas de combustible empleando *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* [9] [5].

Cabe aclarar que dicha modificación electroquímica, la cual consiste en aplicar una diferencia de potencial a la celda de unos cuantos milivoltios y de la cual muchas veces se menciona como un mecanismo "desconocido", quizás no sea más que un simple fenómeno

electrostático ocasionado por la carga negativa presente en las células procariotas, en el caso de las gram positivas, a la presencia de ácidos teicoicos en la pared celular, cuya función es la de enlazar las moléculas de peptidoglicano a la membrana plasmática, esto a razón de los enlaces fosfodiéster en las unidades monoméricas del ácido. En el caso de las células gram negativas, la carga se debe a la naturaleza de los lipopolisacáridos de la membrana externa, los cuales son los que confieren la propiedad en mención a estos organismos [15] ver figura 2.1.

En algunas ocasiones es necesario emplear mediadores químicos para mejorar la transferencia de electrones hacia el electrodo, por esta razón no se explica el hecho de que Potter pudiese obtener estos resultados con una levadura y una bacteria que hasta 2005 no se consideraba que pudiera emplearse en celdas microbianas sin la adición de este tipo de sustancias, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por T. Zhang y otros, se hace necesario replantearse esta necesidad y tratar de encontrar la manera de inducir este fenómeno como ya se cuestiona en párrafos anteriores, sin embargo, cabe mencionar los desarrollos de algunos autores, quienes emplean mediadores exógenos tales como, rojo neutral, antraquinona-2,6, disulfonato, tionina, ferrocianida de potasio, metil viologen. Así mismo se pueden mencionar algunos mediadores producidos por las bacterias, como la piocianina, producida por *Pseudomonas aeruginosa*, de cualquier forma el hecho de agregar estas sustancias incrementan el costo de producción de estos dispositivos a unos



**Figura 2.1:** En la parte superior la estructura del ácido Teicoico de las Gram (+). Abajo la representación de los lipopolisacaridos en las Gram(-) [27]

niveles no admisibles con miras a una aplicación comercial [10] [11] [12].

Otro aspecto importante en la transferencia de electrones es la existencia de bacterias con pili modificado, también llamados nano-cables microbianos los cuales tienen la función de transportarlos hacia aceptores terminales o en el caso de consorcios microbianos, desde la parte anaeróbica, hacia las bacterias con exposición al oxígeno. Estos apéndices han sido encontrados principalmente en las especies del género *Shewanella spp* y *Geobacter spp* y estudiados mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido, generalmente AFM y STM, el mecanismo mediante el cual se da esta transferencia aun es poco claro [13] [14].

### 2.2.2 Células Eucariotas

En el caso de las células eucariotas el mecanismo es mucho más complejo dados sus diferentes mecanismos de generación de energía, siendo la mitocondria el lugar donde se llevan a cabo los procesos más importantes, sin embargo, desde el punto de vista de las MFC esta multiplicidad de vías para la generación energética no son del todo aprovechables y por tanto han sido hasta ahora poco exploradas, las razones, van desde la inaccesibilidad de la mitocondria por parte del electrodo, hasta la competencia con el  $O_2$  por los electrones. De otro lado existe una opción hasta ahora inédita y consiste en el aprovechamiento de los eucariotas pero mediante un mecanismo diferente e indirecto, como lo es la secreción

de enzimas oxidorreductasas al medio y dadas las características de porosidad de los diferentes electrodos de carbono en sus formas mas empleadas (Tela de Carbón, Grafito, Papel Carbón, etc) en las cuales el fenómeno de adsorción es bastante común es posible que dicho sistema Electrodo-Enzima si pueda ser electroquímicamente activo, dada la alta conductividad de estos.

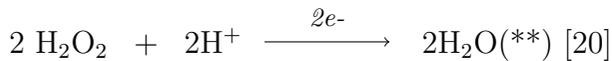
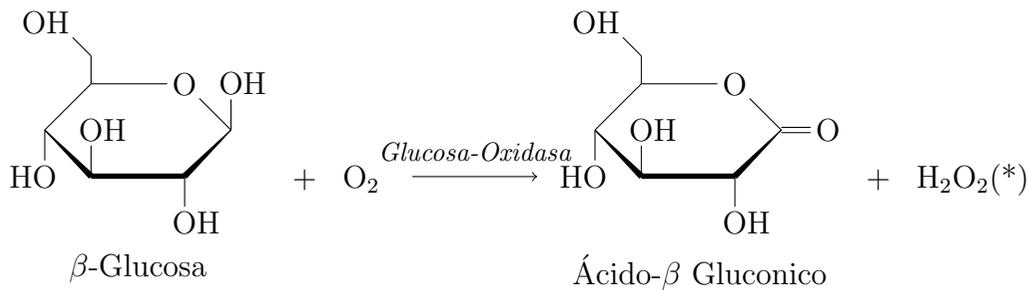
Algunas de estas enzimas son producidas por hongos ligninolíticos, muchos de ellos asociados a la podredumbre blanca de la madera o a otras especies. En este trabajo se realizaron algunos ensayos con hongos de la colección del grupo PROBIOM, principalmente con Ascomicetos filamentosos. Como aclaración, el termino inédito anteriormente empleado se refiere al hecho de que en la literatura se reporta actividad con estos microorganismos, pero empleados como bio-cátodos ver [5], sin embargo en varios ensayos realizados, se pudo comprobar su funcionamiento como ánodos.

Algunas de estas oxidorreductasas son, lignina peroxidasa, lacasa, manganeso peroxidasa y manganeso peroxidasa versátil, también es factible una interacción sinérgica entre ellas, es decir la capacidad de actuar dos o mas en simultaneo con el fin de degradar un compuesto tan recalcitrante como la lignina, dicha propiedad (falta de especificidad por el sustrato) es de interés desde el punto de vista ambiental dado que compuestos de composición química similar, pueden ser degradados como es el caso de algunos colorantes industriales (Negro Remazol, Naranja ácido 7, azul-negro Naftol, etc), plaguicidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, los cuales representan un problema ambiental y de salud

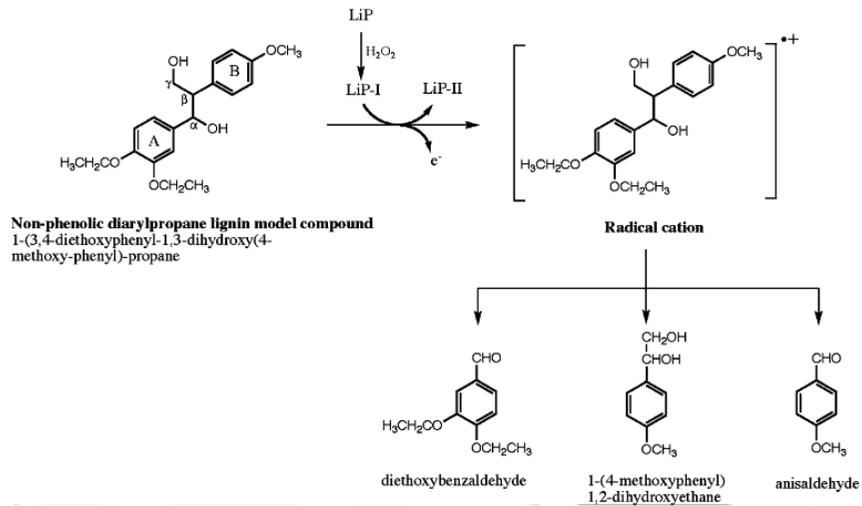
serio. [18] [19]

Así mismo, es posible encontrar actividad electroquímica asociada a otras oxidoreduc-tasas, por ejemplo, glucosa oxidasa la cual se reporta es producida por algunos hongos filamentosos y en particular en *Aspergillus niger*, es precisamente con este ultimo que se realizaron los ensayos mencionados en los cuales fue posible identificar actividad elec-troquímica como ánodo, de allí la evidencia para lanzar la hipótesis de la adsorción de enzimas extracelulares en el electrodo de grafito.

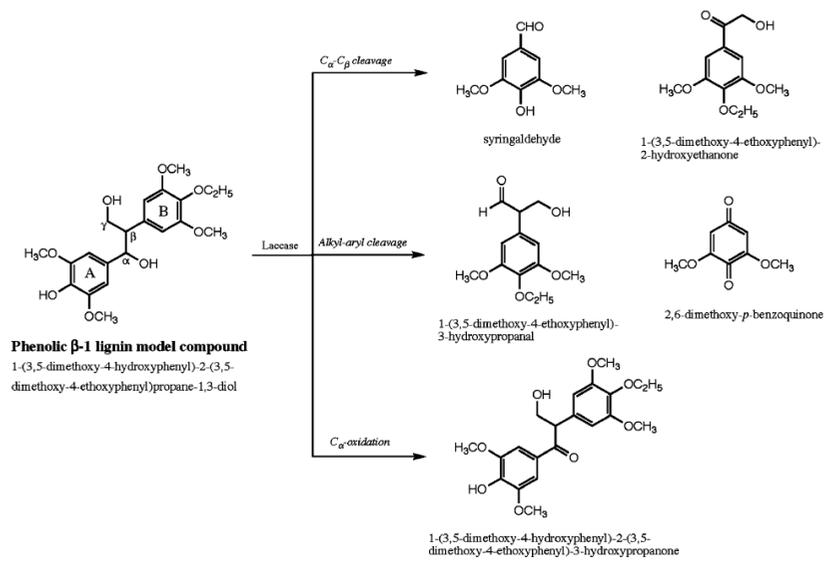
El mecanismo de reacción para glucosa-oxidasa consiste en dos etapas, primero la oxi-dación de la  $\beta$ -Glucosa, seguido de la reducción del peróxido de hidrógeno, de la siguiente forma



Con respecto a las enzimas de la degradación ligninolítica en la figura 2.2 se muestra un esquema general de reacción.



(a) Lignina Peroxidasa



(b) Lacasa

Figura 2.2: Mecanismos de Reacción Enzimas Ligninolíticas [22] [36]

En cuanto a la dependencia de estas enzimas con el  $O_2$  es factible pensar que si bien este es un buen receptor de electrones, también lo es el grafito, por lo cual e hipotéticamente hablando es factible que dada la alta conductividad de este ultimo sea posible el transporte de los electrones libres ubicados en el citocromo. Basados en la experimentación llevada a cabo, consideraremos que el mecanismo de transporte es función del contacto electrodo microorganismo; si bien esta documentado por los estudios de (Wang et al. 2007) y (Zhang et al. 2008) que *Escherichia Coli* produce mediadores redox solubles en una atmósfera anaeróbica, fue posible evidenciar en los montajes realizados la generación de corriente eléctrica en presencia de oxígeno, por lo cual se considera que el principal medio de transporte de electrones en este caso es por contacto directo, cabe resaltar que hasta el año 2007 se consideraba que la bacteria mencionada anteriormente no era electrogenica, el estudio de Zhang logro comprobar la producción de los mediadores etil 2-acetimidato, metil-4-etoxibutanoato y 3-isobutil-hexahidropirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona en ausencia de oxígeno. La documentación de los montajes junto con los resultados de los mismos se pueden consultar en la sección de metodología y validación experimental dentro de este mismo documento[28].

## 2.3 Mecanismos de Adhesión y Formación de Biopelícula

Este aspecto puntual, es la piedra angular para las MFC orientadas al tratamiento de aguas residuales, es aquí, donde se lleva a cabo el proceso de catálisis, es decir, el consumo de materia orgánica y la producción de electricidad y biomasa. La definición de biopelícula puede ser ambigua, sin embargo, Wimpeny [23] lo define de la siguiente forma: una biopelícula puede ser diferenciado de otros agregados microbianos ya que siempre forma una interfase con el medio en que se encuentre, acompañado de una gran área superficial, así mismo, pueden emerger propiedades que cada uno de los individuos que lo componen no las poseen de manera individual. Por ejemplo la aparición de barreras difusionales, que pueden causar cambios significativos en la biología de los microorganismos que lo integran. Normalmente la biopelícula se presenta en una interfaz liquido-sólido. El mecanismo de aparición de esta, parte de la impregnación de una superficie limpia, por moléculas orgánicas, las cuales preceden la aparición de las bacterias, es decir, estas partículas orgánicas, acondicionan el lugar donde posteriormente se dará la proliferación microbiana, la cual se da por difusión turbulenta o Eddy a través de la capa viscosa formada en la superficie; una vez difundidas, interacciones débiles de largo alcance tipo van der Waals, permiten la fijación inicial, la cual se transforma en irreversible debido a las interacciones altamente específicas y de corto alcance, las cuales pueden ser, dipolo-dipolo, iónicas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas [24]. Este último fenómeno, se da por la excreción de exopolisacáridos y el despliegue de estructuras fibrilares como la

fimbria, que en algunos casos poseen proteínas adhesinas, permitiendo la fijación en superficies complejas, como por ejemplo, la cavidad bucal [25]. Una vez las células están fijadas comienzan a crecer y segregar más exopolisacáridos, al final se obtiene una superficie más o menos porosa dependiendo de las características del medio y que dependiendo de esto puede ser colonizado por otras especies. La estructura tridimensional de la biopelícula se debe a factores fisicoquímicos, esfuerzos cortantes, gradientes difusionales y a la genética misma de los organismos que lo componen [23].

Una vez definido lo que es una biopelícula y su mecanismo de formación, es necesario establecer los parámetros necesarios para modelar su cinética, tales como la velocidad de consumo de oxígeno, formación de biofilm y consumo de sustrato, las ecuaciones cinéticas para estos están dados por:

$$(1) r_0 = -\frac{kC}{K+C}X$$

$$(2) r_g = -Yr_0 - k_dX = (Y\frac{kC}{K+C} - k_d)X$$

$$(3) r_{O_2} = r_0 + \gamma r_g = r_0 - \gamma(Yr_0 + k_dX) = r_0(1 - \gamma Y) - \gamma k_d X$$

ro: Velocidad de remoción de materia orgánica ( $g/m^3d$ )<sup>1</sup>

rg: Velocidad de producción de biomasa ( $g/m^3d$ )

ro2: Velocidad de uso de oxígeno ( $g/m^3d$ )

k: Coeficiente de remoción ( $d^{-1}$ )

C: Concentración orgánica, medida en DBO o DQO ( $g/m^3$ )

X: Biomasa, medida como sólidos suspendidos o volátiles ( $g/m^3$ )

---

<sup>1</sup> d: hace referencia a la variable tiempo en este caso días.

### 2.3. MECANISMOS DE ADHESIÓN Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA<sup>15</sup>

K: Coeficiente de saturación (g DBO/ $m^3$ )

Y: Coeficiente de rendimiento másico (solidos producidos(g) /DBO removidos(g))

kd: Coeficiente de mantenimiento de energía ( $d^{-1}$ )

$\gamma$ =Coeficiente de unidades de DBO removidas contra masa celular total (g/g) [26]

Lo anterior, permite un modelado y diseño de un reactor cuya función única es remover una porción de carga orgánica, en el caso que nos atañe, la situación requiere necesariamente tratar con el hecho de la generación eléctrica, por lo cual un balance de carga se hace necesario, esto implica adicionalmente relacionar términos de consumo de materia orgánica con corriente eléctrica, dicho esto, es evidente el vacío que existe en la literatura para el diseño de celdas de combustible microbianas, esto lleva a la necesidad de ingeniar nuevas formas de acercarse al problema, en este trabajo se proponen fundamentalmente dos, la primera empleando termodinámica de procesos irreversibles, ya que dadas las características del problema, claramente irreversible en virtud de los flujos y fuerzas presentes en el electrodo microbiano es necesaria una descripción que tenga en cuenta los fenómenos cruzados acaecidos allí. En segundo lugar, se plantea una solución al problema, a partir de un modelo basado en la metodología de los balances de materia y energía o comúnmente conocido como fenómenos de transporte en la jerga de la ingeniería química, la idea es comparar ambas aproximaciones con respecto a un montaje experimental y concluir sobre la incidencia de los coeficientes cruzados en el caso de una celda de combustible microbiana.

## 2.4 Termodinámica de Procesos Irreversibles

La termodinámica de procesos irreversibles o del no equilibrio surge como una necesidad de expandir la ya exitosa, termodinámica de sistemas en equilibrio, la cual fue exhaustivamente explorada, estudiada y mejorada durante el siglo XIX, por eminentes pensadores como J.W Gibbs, S Carnot, J.C Maxwell, L Boltzmann, entre muchos otros. Esta emergente disciplina, se debe principalmente al trabajo seminal de Onsager "Reciprocal Relations in Irreversible Process, I & II" (1931) [32] por el cual recibe el premio nobel de química en 1968 y mas adelante a los aportes de Ilya Prigogine [44], también galardonado con el nobel en 1977, S.R de Groot, P.Mazur, Meixner etc, quienes lograron extender el campo de aplicación de esta teoría a múltiples sistemas, cabe resaltar el aporte a la teoría cinética de gases y la demostración de que la irreversibilidad es inherente a la ecuación integro diferencial de Boltzmann desarrollada por Prigogine [31]. No obstante el hecho de probar su validez hizo que dicha nueva disciplina no fuera objeto de dudas y del escrutinio de la comunidad científica de la época, por ejemplo Truesdell, Coleman y Knoll desarrollaron un nuevo esquema con el fin de aumentar el dominio de validez de la termodinámica del no equilibrio, llamada termodinámica racional, con la cual buscaban incluir aquellos fenómenos en donde los gradientes eran enormes y que aparentemente no podían ser descritos en el marco de la termodinámica irreversible [29]. Recientemente, alrededor del año 1997 Hans Christian Öttinger y en conjunto con Grmela, creo un nuevo formalismo denominado Ecuación General para el Acople Reversible Irreversible en No Equilibrio o

GENERICs por sus siglas en inglés, que ha sido empleado para la descripción matemática de las propiedades de los fluidos[30].

Desde el punto de vista de la electroquímica, cabe resaltar los aportes de Kontturi, Murtomaki y Manzanares, en el cual plantean las ecuaciones de transporte de carga en el formalismo de la termodinámica de procesos irreversibles [34], es interesante señalar también el aporte de Bedeaux y Kjelstrup, en cuanto a las aplicaciones de esta teoría particularmente en la industria metalúrgica y electroquímica [33].

Con relación a las celdas de combustible microbiana, la situación no es alentadora, solo muy pocos trabajos en esta área han sido orientados a las ramas de la biología, por tal razón surge la necesidad de explorar todo el conjunto de posibilidades que ofrece la Termodinámica del no equilibrio, para la descripción, en este caso de un ánodo microbiano que hasta donde se ha podido explorar en la literatura especializada es un trabajo inédito. Lo más cercano es el modelo para la medición del potencial redox (ORP), el cual se basa en el desempeño global metabólico de los microorganismos, discriminando el potencial electroquímico anabólico y catabólico, a partir de allí se determinan un conjunto de ecuaciones que pretenden describir esta situación, este modelo denominado MIRROR I, fue desarrollado por Chen, Kumar y Lin [37]; la relación entre el flujo catabólico y metabólico, basado en la teoría quimiosmótica enunciada por Peter Mitchell, la cual consiste en describir el transporte de  $H^+$  y la posterior generación de un potencial eléctrico en la membrana externa permite la generación de ATP [38], dicho postulado también será

el punto de partida en este escrito. Es de aclarar, que en el artículo de (Chen, et al. 2007) no se especifica el hecho de que la teoría de Mitchell, hace referencia a los flujos metabólicos en la mitocondria, lo cual es exclusivo de los organismos eucariotas, dicha organela se ubica al interior de la célula y la detección de su potencial redox (ORP) a menos que se introduzcan los electrodos (micro electrodos) en el interior de la misma, hace que su aplicación practica sea poco plausible, sin embargo en el caso de bacterias Gram (-) no es tan complejo, dado que muchos de sus citocromos están expuesto en su membrana externa como fue detectado por (Itagaki, et al. 1968)[39] [40], dicho sea de paso, también es poco aplicable a bacterias Gram (+), dado que existe una gran brecha caracterizada por la gran pared celular que la separa de la membrana interna donde se encuentran la mayor parte de los citocromos, por las razones señaladas, es que en la experimentación, se empleo un bacilo Gram (-) como lo es la *Escherichia Coli*. El esquema general usado por (Chen, et al) se puede apreciar en la figura 2.3

Usualmente en el tratamiento de aguas residuales, en particular piscinas, es común medir el potencial redox (ORP), sin embargo esto obedece a estudios globales y a una caracterización del comportamiento del agua en presencia de diversos microorganismos y no a un patrón atribuible a un flujo metabólico en particular, su función es la de detectar el potencial de oxígeno del agua en conjunto con el pH de la misma, dichas características hacen posible deducir la probabilidad de aparición de una especie de bacterias en el agua que pudiesen llegar a ser patógenas y por tanto perjudicial al ser humano. En inge-

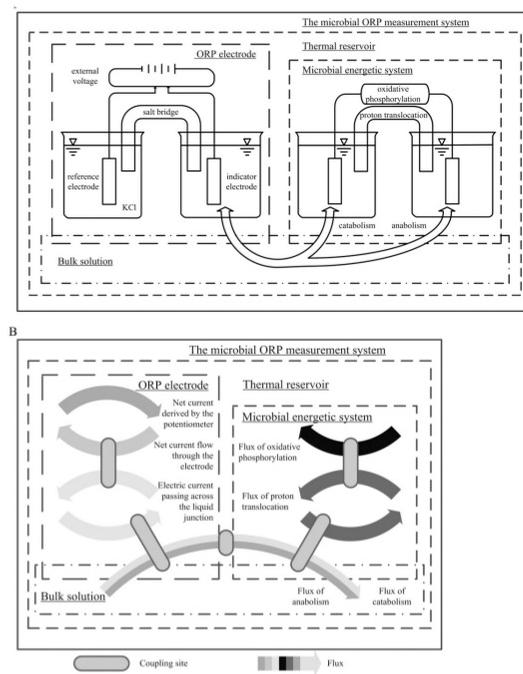


Figura 2.3: Esquema de los Flujos de Materia y Energía empleados por [37]

nería de aguas el calculo del potencial redox se realiza mediante la siguiente ecuación  $E_{ORP} = 1.234 - 0.058pH + 0.0145Log(P_{O_2})$  (4), donde  $P_{O_2}$  es la presión parcial de oxígeno expresada en atmósferas, esta expresión determina si el medio acuoso de interés tiene la tendencia de ganar o perder electrones, si la tendencia es a ganar electrones, se dice que el medio es oxidante, caso contrario se dice que es reductor [41].

La intención de este capítulo es principalmente, justificar la necesidad de emplear termodinámica del no equilibrio para describir el fenómeno de transferencia de carga en un ánodo microbiano, en ese sentido, surge la necesidad de definir lo que se considera en equilibrio o fuera de el. Parafraseando a Ilya Prigogine, "Desde un punto de vista matemático se puede definir que un proceso es reversible o irreversible de acuerdo con el signo algebraico asignado a la variable tiempo, esto es, si el sistema es invariable independiente del signo del tiempo, se dice que este es reversible, caso contrario se considera irreversible", ejemplo de lo anterior, seria un sistema descrito por la ecuación de onda  $\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2}$  cuya derivada temporal de orden 2, hace que el signo de la variable tiempo no altere la misma, por lo cual se considera un sistema en equilibrio, caso contrario seria la ley de Fourier [44]; en particular los sistemas biológicos poseen la característica de estar cerca del equilibrio o mejor, ligeramente fuera de el; (Galimov, 2004) presenta un estudio basado en la distribución del carbono  $\beta^{13}C - \delta^{13}C$  en donde  $\delta$  y  $\beta$  son factores isotópicos termodinámicos, que dependiendo de su distribución pueden determinar la cercanía al equilibrio o el equilibrio mismo. Debido a la alta preservación de

la composición isotópica en los compuestos orgánicos se ha encontrado experimentalmente que las reacciones bioquímicas tienen hasta cierto punto un componente de reversibilidad, lo que indica que no están en equilibrio, sin embargo tampoco se encuentran lejos de el [45]. Estos argumentos cimientan la elección de este esquema de trabajo en la solución del problema de la generación eléctrica en un ánodo de una MFC; en el apartado de resultados y discusión, se deducirá un conjunto de ecuaciones a partir de la Termodinámica del no equilibrio, que tratan de darle un explicación a este fenómeno poco explorado desde este punto de vista.

## 2.5 Balances de Materia, Energía y Entropía

La idea general aquí, es probar mediante el formalismo de la termodinámica del no equilibrio, la posibilidad de generar ecuaciones de transporte de manera general, deducciones más rigurosas se pueden consultar en las obras de (de Groot & Mazur, 1984), (Kontturi, 2008) y (Deen, 2011).

Para comenzar, se parte de la ecuación de Gibbs y se divide sobre un elemento de volumen por ejemplo  $u = \frac{\partial U}{\partial V}$  por lo cual se tiene entonces

$$g = \sum_i \mu_i c_i = u - Ts + p \quad (2.1)$$

---

<sup>2</sup>Originalmente la ecuación es  $G = \sum_i \mu_i n_i = U - TS + pV$

tomando la derivada sustancial ( $\delta g = (\frac{Dg}{Dt})\delta t$ ) y aplicando las propiedades del producto y función implícita de la derivada se tiene que

$$\delta g = \sum_i \mu_i \delta c_i + \sum_i \delta \mu_i c_i = -T\delta s + \delta u + \delta p - s\delta T \quad (2.2)$$

combinando 2.1 y 2.2 y teniendo en cuenta que  $s = \frac{\sum_i \mu_i c_i - u - p}{-T}$  se tiene:

$$\sum_i c_i \delta \mu_i = -s\delta T + \delta p \quad (2.3)$$

A 2.3 se le conoce como la ecuación de Gibbs-Duhem, sobre esta ultima, se desarrolla todo lo concerniente al modelo propuesto en este trabajo [46], lo cual hace necesario mostrar las grandes posibilidades que ofrece, no en vano el empeño en tratar de sacar a flote este modelo, si bien no ha sido fácil, la motivación o mas bien el por que de emplear termodinámica del no equilibrio para este fin, parte del supuesto que cualquier sistema físico hasta ahora conocido, cumple fundamentalmente dos principios, conservación de la energía e incremento de la irreversibilidad debido a la disipación térmica generada por fluctuaciones aleatorias de las moléculas, esto es mejor conocido como la primera y segunda ley de la termodinámica respectivamente, precisamente esa "ubicuidad" aparente, es la que de cierta forma ilumino un camino al principio oscuro dada la gran complejidad que representan los organismos vivos, de tal suerte que si se toma el comportamiento global del sistema, sin adentrarse mucho en las explicaciones microscópicas que lo producen, constituye un gran punto de partida para tratar de obtener un modelo de transporte en el

ánodo microbiano, específicamente y el principal interés, es el análisis de estos sistemas en cuanto a la generación de carga eléctrica debido a que es precisamente esta la que constituye el principal cuello de botella en la implementación a gran escala de esta tecnología. Dicho lo anterior, la evolución de cualquier sistema hacia el equilibrio debe satisfacer la segunda ley de la termodinámica, esto implica que la entropía del sistema no se conserva y que su ecuación de balance y su velocidad de variación contiene un término positivo describe la producción de entropía debido a los procesos de transporte (irreversibles), es claro en este punto que una condición necesaria para la vida es que existan flujos de entrada (alimento) y salida (desechos), en una bacteria por ejemplo estos procesos se enmarcan en el metabolismo, en el cual se produce energía en forma de ATP (catabolismo) y se gasta parte de esta en la producción de sustancias necesarias para el sustento de las capacidades biológicas, en el caso señalado la duplicación del material genético y síntesis de proteínas principalmente, de allí que sea evidente la irreversibilidad del fenómeno. Una vez dejado claro la naturaleza del fenómeno a estudiar, es necesario señalar que la ecuación de balance de entropía es el punto de partida de cualquier ecuación fenomenológica de transporte, si se toma la variable  $B$  y su elemento de volumen  $dB$  como una cantidad arbitraria extensiva y teniendo en cuenta:

- i*) Las interacciones internas de ese elemento de volumen.
  
- ii*) Las interacciones de este con su entorno

Entonces en el caso ii, se puede evaluar este elemento B en términos de la rapidez con la cual cruza las fronteras de su elemento de volumen.

Las interacciones internas pueden evaluarse acorde con la rapidez de producción de B debido a los procesos internos del elemento de volumen.

El análisis de estos dos criterios en  $dB$  lleva a la siguiente ecuación de Balance:

$$\underbrace{\frac{\partial B}{\partial t}}_{\text{Acumulacion}} + \underbrace{\nabla \cdot \vec{J}_b}_{\text{Entradas y Salidas}} = \underbrace{\Pi_b}_{\text{Generación y/o Acumulación}} \quad (2.4)$$

Para cantidades conservativas  $\Pi_b = 0$  (masa, carga eléctrica, etc.) la forma diferencial de Gibbs-Duhem  $T \frac{\partial s}{\partial t} = \frac{\partial s}{\partial t} - \sum_i \tilde{\mu}_i \frac{\partial c_i}{\partial t}$  también llamada hipótesis de equilibrio local es el punto de partida para cualquier ecuación de balance de entropía combinándola con 2.4 [34]

De manera similar se pueden determinar relaciones termodinámicas a partir de ecuaciones de transporte. Partiendo del principio de conservación de la energía, de la única manera que un sistema cambia la energía total de su elemento de volumen V, es si existen flujos de entrada o salida del mismo a través de su frontera  $\Omega$  esto es,

$$\frac{d}{dt} \int_V \rho e dV = \int_V \frac{\partial \rho e}{\partial t} dV = - \int_{\Omega} J_e \cdot d\Omega \quad (2.5)$$

en donde  $e$  es la energía por unidad de masa,  $J_e$  es el flujo de energía por unidad de superficie y tiempo. [31] se refiere a  $e$  como la energía específica total debido a que incluye todas las formas de energía dentro del sistema. Aplicando el teorema de Gauss-Ostrogradski es decir

$\int \int F \cdot \vec{n} dS = \int \int \int \nabla \cdot F dV$  se obtiene la forma diferencial o local de la ley de conservación de la energía,

$$\frac{\partial \rho e}{\partial t} = -\nabla \cdot J_e \quad (2.6)$$

Así mismo

$$e = \frac{1}{2} \mathbf{v}^2 + \psi + u \quad (2.7)$$

en donde los términos a la derecha de 2.7 son la energía cinética específica, energía potencial específica y energía interna específica, respectivamente. Desde un punto de vista macroscópico  $e$  representa lo que conocemos como energía interna, por lo cual  $u$ , hace referencia a las interacciones a nivel microscópico de corto alcance (ej. fuerzas de Van der Wals) y la agitación térmica (ej. movimiento Browniano), de igual forma el flujo de energía incluye términos de advección  $\rho e \mathbf{v}$ , trabajo mecánico efectuado en el sistema  $P \cdot \mathbf{v}$ , energía potencial debido a la difusión de varios componentes en el campo de fuerza  $\sum_i \psi J_i$  y el flujo de calor  $J_q$ ;

$$J_e = \rho e \mathbf{v} + P \cdot \mathbf{v} + \sum_i \psi J_k + J_q \quad (2.8)$$

Si se aplica 2.6 a 2.7 y 2.8, y teniendo en cuenta la definición del producto escalar de Tensores  $T : \mathbf{U} = \sum T_{ij} U_{ji}$  y que el gradiente de un campo vectorial es un Tensor  $(DF)_{ij} = \partial_j F_i$  podemos decir

$$\frac{\partial \rho u}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho u \mathbf{v} + J_q) - P : \nabla \vec{v} + \sum_i J_i \cdot \psi_i \quad (2.9)$$

Si  $\rho \frac{dq}{dt} = -\nabla \cdot J_q$ , y dividiendo a ambos lados de 2.9 por  $\rho$ , entonces se tiene que:

$$\frac{du}{dt} = \frac{dq}{dt} - p \frac{d\rho^{-1}}{dt} - \rho^{-1} P : \nabla \mathbf{v} + \rho^{-1} \sum_i J_i \cdot F_i \quad (2.10)$$

Donde  $\rho^{-1}$  es equivalente al volumen específico, 2.10 es una representación de la primera ley de la termodinámica, lo que permite concluir finalmente, que a partir de la variación de los potenciales termodinámicos es posible obtener ecuaciones de transporte y viceversa, dicho sea de paso justifica el hecho de emplear termodinámica del no equilibrio para la representación del fenómeno de transferencia de carga en un ánodo microbiano. Esta demostración, se puede encontrar de manera mas profunda y precisa en el texto [31], para el fin señalado se siguió la metodología y convenciones de la bibliografía antes citada.

### 2.5.0.1 Balances de Entropía y Segunda Ley

Cualquier sistema que evoluciona en el tiempo esta sujeto a fenómenos de transformación, no importando lo aparentemente estable que este se vea, siempre existe un cambio muchas veces en una escala tan pequeña, que el tiempo necesario para percibir una variación macroscópica puede ser enorme, esta transformación se debe fundamentalmente a la continua y discreta acumulación de irreversibilidades, entendidas estas como una serie de eventos que hace a las trayectorias del observable, no conservativas. En su obra de carácter divulgativo "El fin de las certidumbres" Ilya Prigogine aborda el tema asociando la dirección del tiempo con la generación de entropía [47], en tal sentido es necesario una

ecuación que permita obtener este termino, por tanto y si se parte de:

$$dS = dS_e + dS_i \quad (2.11)$$

donde  $dS_e$  es la entropía suministrada por los alrededores y  $dS_i$  la entropía interna del sistema, en el primer caso, dependiendo de la interacción con los alrededores, este termino puede ser, positivo, negativo o cero, mientras que en el segundo, las únicas posibilidades son o monótonamente positivo o cero en equilibrio, de acuerdo a la segunda ley de la termodinámica.

Para determinar la entropía de un sistema se puede recurrir a :

$$S = \int \int \int_V \rho s dV \quad (2.12)$$

$$\frac{dS_e}{dt} = - \int_{\Omega} J_{s,total} \cdot d\Omega \quad (2.13)$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \int \int \int \sigma dV \quad (2.14)$$

Donde  $s$ , es la entropía por unidad de masa,  $J_{s,total}$  es el flujo de entropía por unidad de área, tiempo y  $\sigma$  es la producción de entropía también por unidad de área y tiempo.

Si se reemplaza 2.12, 2.13 y 2.14 en 2.11, se tiene que:

$$\int \int \int_V \left[ \frac{\partial \rho s}{\partial t} + \nabla \cdot J_{s,total} - \sigma \right] dV = 0 \quad (2.15)$$

Por lo tanto:

$$\frac{\partial \rho s}{\partial t} = -\nabla \cdot J_{s,total} + \sigma \quad \text{Con } \sigma \geq 0 \quad (2.16)$$

esta ecuación es conocida como forma local de la segunda ley de la termodinámica, la cual sera esencial en el desarrollo del problema del comportamiento del ánodo en una celda

de combustible microbiana. Otra forma de escribir 2.16 es teniendo en cuenta el termino convectivo:

$$\rho \frac{ds}{dt} = -\nabla \cdot (J_{s,total} - \rho s \mathbf{v}) + \sigma \quad (2.17)$$

Así mismo, el cambio en la entropía debido a interacciones con el exterior se puede determinar mediante;

$$dS_e = \frac{1}{T} dU + \frac{P}{T} dV \quad (2.18)$$

Otra forma mas general de representar la ecuación de Gibbs-Duhem teniendo en cuenta todos los aspectos en cuanto al transporte, puede encontrarse en [31] y tiene la forma

$$\rho \frac{ds}{dt} = -\nabla \cdot \nabla \left( \frac{J_q - \sum_k \mu_k J_k}{T} \right) - \frac{1}{T^2} J_q \cdot \nabla T - \frac{1}{T} \sum J_k \cdot \left( T \nabla \frac{\mu_k}{T} - F_k + \frac{d(v_f - v)}{dt} \right) - \frac{1}{T} \Pi : \nabla \mathbf{v} - \frac{1}{T} \sum_j J_j A_j \quad (2.19)$$

Esta ultima ecuación reúne las interacciones flujo fuerza posibles, por ejemplo el termino  $F_k$  esta relacionado con fuerzas conservativas, en este caso puntual de transporte de cantidad de movimiento por aquello de la agitación y electrostática debido a la carga en el electrodo. De igual forma 2.19 se puede relacionar con 2.17, en el sentido de identificar las cantidades asociadas al flujo de entropía o a la generación de esta.

Hasta aquí se reunieron una serie de postulados, conceptos y ecuaciones necesarias para abordar cualquier problema de transporte, usando el formalismo de la termodinámica del no equilibrio, dejando un tanto de lado el esquema mas pragmático planteado por autores como Byrd y Deen [43][48], con la ventaja de obtener información mas detallada de los llamados fenómenos acoplados.

## 2.6 Relaciones y Coeficientes Fenomenológicos de Onsager

Suponiendo que el término de velocidad de producción de entropía, en el caso de equilibrio local, se compone de relaciones lineales de flujos y fuerzas, así como de la existencia de equilibrio a nivel microscópico, se pueden obtener las relaciones de Onsager a partir de los coeficientes de acople. En general, para una fase arbitraria se tiene que:

$$J_i = \sum_{k=0}^n L_{ik} X_k \text{ Para } i = 1, 2, 3, \dots, n \quad (2.20)$$

[33] Esto último significa que todos los coeficientes son función de las variables de estado locales del sistema, es decir que 2.20 se supone válida localmente lo que permite decir que las conductividades  $L_{ik}$  no dependen de las fuerzas  $X_k$ , esto significa por ejemplo que la conductividad eléctrica depende del potencial pero no de su gradiente, cabe recalcar, que a pesar de llamarse termodinámica lineal del no equilibrio, esta permite describir sistemas altamente no lineales, simplemente el término obedece al hecho de que los flujos se pueden escribir como combinación lineal de las fuerzas, de allí el nombre. Para el caso puntual de la generación de entropía se tiene;

$$\sigma = X_i J_i \quad (2.21)$$

en donde  $X$  es la fuerza impulsora del flujo  $J$ , eso implica que la generación de entropía está asociada a cualquier proceso de transporte o en otras palabras, si existe transporte, entonces habrá generación de entropía, si hay generación de entropía, entonces el sistema

esta fuera del equilibrio. De nuevo es claro que cualquier sistema biológico requiere flujos de masa y energía para subsistir, de allí que no sea extraño ni ilógico asumir que se encuentran fuera del equilibrio, esto permite interpretar el trabajo de Galimov citado anteriormente, en el cual lo que se busca, no es establecer si están o no en condición de no equilibrio, sino que tan alejados están de este. Por ultimo se debe abordar las relaciones de reciprocidad de Onsager que para algunos autores se considera como la cuarta ley de la termodinámica [35], este concepto fue desarrollado por Lars Onsager en 1931, quien partiendo del hecho que la mecánica Newtoniana es simétrica bajo condiciones de tiempo reversible y asumiendo que las leyes macroscópicas que actúan en las variaciones en torno al equilibrio son las mismas que determinan el tiempo promedio de decaimiento cerca a un estado de equilibrio a nivel microscópico. Partiendo de 2.20 y reemplazando en 2.21,

$$\sigma = \sum_{ik} X_k L_{ik} X_i \geq 0 \wedge L_{ik} = L_{ki} \quad (2.22)$$

A la ultima parte de 4.18 se le conoce como simetría de Onsager y representa el acople entre la fuerza  $i$  y el flujo  $k$ . [49]

El objetivo en este punto es encontrar un modelo para la corriente producida en el ánodo de una celda de combustible microbiana usando como base los coeficientes fenomenológicos de Onsager, esto es representar la corriente como una combinación lineal de flujos y fuerzas, en donde mediante experimentación se encontrara el valor de los coeficientes cruzados.





# 3

## Materiales y Métodos

En esta sección, se explica de forma detallada todos los montajes experimentales realizados, con el fin de establecer relaciones flujo-fuerza, en el comportamiento del electrodo microbiano, la idea fundamental es validar, el modelo termodinámico del no equilibrio obtenido y de esta forma concluir acerca de lo acertado de este esquema de trabajo a la hora de tratar con seres vivos.

### 3.1 Curva de Crecimiento y Consumo de Glucosa

Para el montaje de la curva de crecimiento se empleo una *Escherichia Coli* ATCC (cepa de referencia) en un medio definido modificado, cuya composición se definió con base a la experiencia del grupo PROBIOM <sup>1</sup>. En la tabla 3.1 aparece la composición de dicho

---

<sup>1</sup>Este medio fue diseñado por los miembros del grupo: Juliana Soler, Paola Zapata y Juan Velez

medio, para preparar este medio de cultivo se diluyen los componentes en agua destilada y se esterilizan a  $121^{\circ}C$  y 15psi durante 15 minutos

**Tabla 3.1:** Concentraciones Medio de Cultivo Modificado para *E.Coli* Grupo PROBIOM

Reactivo	Concentración (g/l)
Glucosa	2
$K_2HPO_4$	0.70
$MgSO_4$	0.5
$KH_2PO_4$	0.3
$FeSO_4$	0.01
$MnSO_4$	0.001
$ZnSO_4$	0.001
$(NH_4)_2SO_4$	1

La preparación del inoculó se realizó cultivando la cepa de referencia en tres cajas de Petri con el medio definido modificado solido, al cabo de 48h de incubación a temperatura ambiente, a cada caja de petri se le agrego 5ml de solución salina estéril (NaCl 0.85% p/v), se realizó un raspado de las unidades formadoras de colonias (UFC) con un asa estéril y se homogeneizo el inoculó mediante agitación en un Falcon<sup>TM</sup> estéril. Para conocer la concentración de UFC/ml iniciales, se tomó 1ml del inoculó homogeneizado y se realizaron diluciones sucesivas con factores desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , se platearon 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-5}$  en el medio definido modificado solido, se incubo a temperatura ambiente y se realizó

el conteo de UFC/ml inoculadas para la curva de crecimiento microbiano.

Para la construcción de la curva de crecimiento, se preparo el medio definido modificado liquido y se sirvió 30 ml en tubos Falcon<sup>TM</sup> y a cada tubo se le adiciono 0.3ml de inoculó, todo el trabajo se realizó en un ambiente estéril en una cabina de flujo laminar. Se prepararon 43 Tubos Falcon<sup>TM</sup>, cada hora se tomaron tres muestras abortivas, cada una se centrifugo a 8300rpm<sup>2</sup>, a -5°C por 15 minutos, obteniendo un pélet para determinación de peso seco y un sobrenadante para la determinación de azúcares reductores. además que se contó con tres controles (sin inoculó).

La determinación del peso seco se realizó mediante el secado de los pélets durante 24h a 40°C; previamente se pesaron cada uno de los tubos Falcon<sup>TM</sup> secos y vacíos, con el fin de obtener el peso de la biomasa por la diferencia entre ambas mediciones

$P_{seco}(g) = | PesoConBiomasa - PesoSinBiomasa |$  (5). El peso seco es proporcional al aumento de UFC en el tiempo.

Al sobrenadante se le midieron los azúcares reductores por el método de DNS<sup>3</sup> [42] (ver Anexo), para realizar un seguimiento en el tiempo del consumo del sustrato del medio, en este caso, el consumo de glucosa (única fuente de carbono y azúcar reductor presente en el medio)

Para cada una de las unidades experimentales se emplearon las siguientes condiciones de trabajo, 120rpm (velocidad de agitación) y 35°C (temperatura de trabajo) en un agitador

---

<sup>2</sup>Centrifuga con control de Temperatura *THERMOSCIENTIFIC<sup>TM</sup>* MEGAFUGE 16R

<sup>3</sup>Se empleo un espectrofotómetro UV-VIS Shimdazu<sup>TM</sup> UV-1800

orbital con control de temperatura<sup>4</sup>.

## 3.2 Montaje de Celdas Microbianas

Para este punto se usaron dos tipos de celda, las primeras, en frascos Erlenmeyer en las que el medio de cultivo es el electrolito, las segundas, celdas elaboradas a la medida en las cuales el cátodo esta aislado del ánodo mediante una membrana polimérica de *NAFION<sup>TM</sup>* y expuesto al aire, lo ultimo para garantizar que el cátodo no es el elemento controlante de la reacción.

### 3.2.1 Celdas en Erlenmeyers

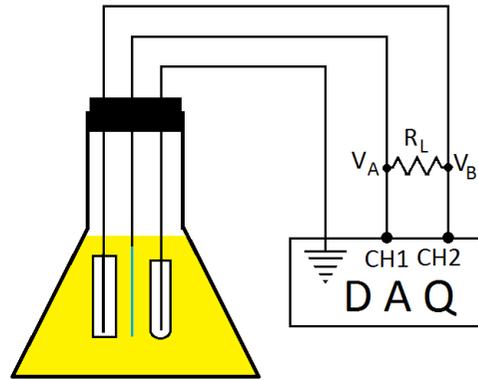
Se emplearon como celdas microbianas Erlenmeyers de 100 mL , acondicionados con ánodos de grafito de 6.5 cm x 1 cm x 0.3 cm, cátodo de platino (alambre de calibre 0.5 mm) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La distancia entre el cátodo y el ánodo fue de 0.5mm (Figura 3). Con el fin de esclarecer si la presencia de los microorganismos en las celdas de combustible microbiana son los responsables de la generación de corriente eléctrica , se esterilizo el medio de cultivo y se evaluó igual que aquellas con inoculó a esto se le denomino control ver figura 3.1.

---

<sup>4</sup>Centricol ltda.



(a) Montaje de celdas en agitador Orbital



(b) Esquema de Una celda Microbiana en Erlenmeyer



(c) Electrodo de Grafito y Platino

**Figura 3.1:** Esquema y Montaje detallado

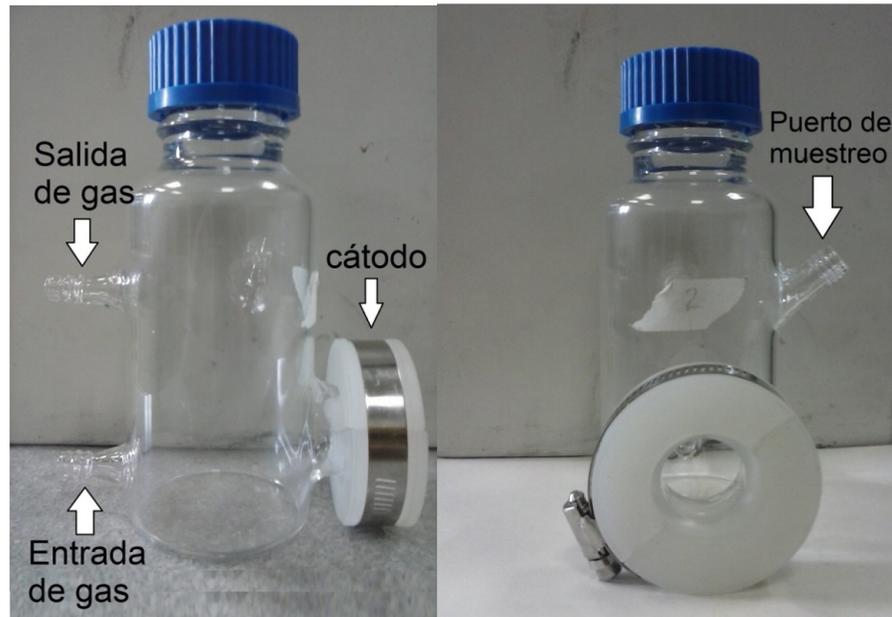
Las celdas se montaron con 75 mL de medio de cultivo definido, tres repeticiones circuito cerrado, con resistencia de carga de  $5.6\text{k}\Omega$ , dos controles y dos repeticiones circuito abierto, lo anterior se implemento en una tarjeta de adquisición de datos de 16 bits de

resolución en una escala de  $\pm 1.25\text{V}$ , lo que otorga una precisión de  $\pm 19\mu\text{V}$ .

Las celdas se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  y 120 rpm. El cable se soldó al electrodo de grafito, al cual previamente se le enrollaron 10cm de alambre de cobre, para evitar las interferencias y el ruido, la distancia entre el electrodo y la tarjeta de adquisición de datos fue de 1.3m, para todos los casos se midió la resistencia entre grafito y entrada de la tarjeta  $0.7\Omega \pm 0.1$ . El medio de cultivo definido sintético se inoculó con 0.75 mL (1% v/v) de la *E.coli* previamente cultivada.

### 3.2.2 Celdas Diseñadas

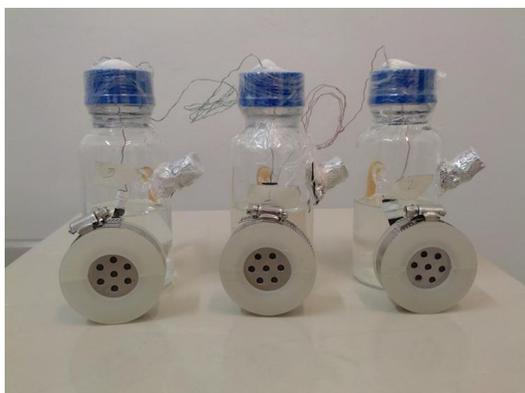
Para la determinación más confiable de la actividad electrogénica de los microorganismos presentes en las aguas residuales se realizó un diseño de celda microbiana 3.2. En ésta se emplea un cátodo externo de aire que no interfiere con el compartimiento interno, el cual queda sólo para el ánodo microbiano ya que el cátodo tiene características cinéticas que permiten su uso simultáneo como electrodo de referencia. La celda tiene un puerto de muestreo inclinado, entrada y salida para gases y en la tapa se puede montar un equipo multiparámetro para la medición de las diferentes variables durante la operación. De acuerdo con lo anterior, los electrodos que se requieren son: un ánodo (objeto de esta investigación) basado en material carbonoso, ya sea grafito, tela de carbón, papel carbón, etc. y un cátodo de aire, típico de una celda de combustible de electrolito polimérico.



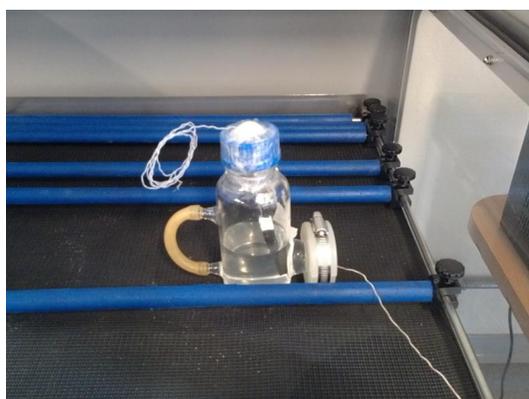
**Figura 3.2:** Esquema general de Celda con Cátodo al aire

Para el montaje de las celdas se empleó una *Escherichia Coli* ATCC (cepa de referencia) en de medio definido modificado, pH 7 ver Tabla 3.1. La preparación del inoculó se realizó cultivando la cepa de referencia en tres cajas de Petri con el medio definido modificado sólido, al cabo de 48h de incubación a temperatura ambiente, a cada caja de petri se le agregó 5ml de solución salina estéril (NaCl 0.85% p/v), se realizó un raspado de las unidades formadoras de colonias (UFC) con un asa estéril y se homogeneizó todo el inoculó en un falcon estéril. Antes de servir los medios e inocular las celdas, éstas se esterilizaron poniéndolas en luz U.V. durante 35 horas y posteriormente se les adicionó peróxido de

hidrógeno al 5% y se lavaron con agua destilada estéril. Los tapones, el papel aluminio y la barra de grafito con el cable se esterilizaron en autoclave previamente. A cada celda microbiana se le adicionó 230 ml de medio de cultivo (hasta cubrir el cátodo), una celda se utilizó como control (sin inocular) y a las otras dos se les adicionó 2.3 ml de inculó. Las celdas se incubaron a 35 °C y a 120 rpm durante tres días, conectadas a la tarjeta de adquisición de datos.



(a) Celda Con Cátodo al Aire



(b) Montaje en el agitador

**Figura 3.3:** Celda con catodo al aire y montaje

### 3.3 Técnicas Electroquímicas

Respecto de las técnicas electroquímicas aplicadas a las celdas de combustible microbianas, se empleó un potenciostato Bas 100bw de *BASi<sup>TM</sup>*, con el cual se realizaron, tanto voltametrías cíclicas exploratorias como barridos lineales, la primera de ellas con el fin de conocer un poco acerca del comportamiento electroquímico de las celdas y la

segunda para poder determinar parámetros cinéticos con el fin de alimentar el modelo.

Para las voltametrías cíclicas se emplearon los siguientes parámetros con un electrodo de referencia de Ag/AgCl:

- ★ Potencial Inicial: -280mV
- ★ Potencial Final: 1300mV
- ★ Velocidad de Escaneo: 50mV/s
- ★ Numero de segmentos: 20
- ★ Sensibilidad:  $10\mu A/V$

Se usaron como electrodo de trabajo, una barra de grafito de  $7.2cm^2$  de área sumergido en el medio de cultivo mencionado anteriormente previamente inoculado, como electrodo auxiliar se empleo un alambre de platino, previamente esterilizado de forma química con una solución de formol 10%p/v y finalmente un electrodo de referencia de Ag/AgCl. En total se realizaron seis voltametrías cíclicas exploratorias por duplicado para medio de cultivo con *E.coli* y dos controles.

El electrodo de disco rotatorio de carbón vitreo se utilizo para determinar el numero de electrones transferidos para esto se emplearon los siguientes parámetros:

- ★ Potencial Inicial: 0mV
  
- ★ Potencial Final: 600mV
  
- ★ Velocidad de Escaneo: 20mV/s
  
- ★ Sensibilidad:  $10\mu A/V$

Las razones para la elección de estos valores tiene que ver con la naturaleza atípica del catalizador, en este caso microorganismos (complejos enzimáticos mas precisamente), por lo cual se debe ser muy cuidadoso de no llevarlos a extremos que pueden causar la muerte celular, mas adelante se explicara con mayor profundidad esta elección. Los electrodos empleados, fueron nuevamente, alambre de platino como contra electrodo, Ag/AgCl como referencia y disco rotatorio de carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Para la captura de los datos de la tarjeta de adquisición de datos fue necesario desarrollar un script en la herramienta de software libre Scilab<sup>TM</sup> [57] que permitiera procesar la gran cantidad de información recolectada, dado que el software de la tarjeta no permite tomar tiempos superiores a un minuto entre capturas, siendo 10s el intervalo entre toma de datos seleccionado, por tal motivo y dado que el seguimiento en las celdas tomaba alrededor de tres o cuatro días la cantidad de puntos capturados es enorme, excediendo la capacidad de Excel. El script desarrollado permite la depuración y procesamiento de los datos con la ventaja de contar con un gran numero de algoritmos y herramientas informáticas nativas que el software en mención provee, la finalidad de esto, era poder

suministrar una matriz de datos tanto a Excel<sup>TM</sup> como a Statistica<sup>TM</sup> para el análisis gráfico y estadístico respectivamente, el código fuente de este script puede consultarse en el anexo II.



# 4

## Resultados Y Discusión

En esta sección se plantearan los diferentes resultados obtenidos, en el modelo termodinámico del no equilibrio, simulación y experimentación, la idea es presentar cada uno de ellos de manera individual y su respectiva discusión, para posteriormente en las conclusiones ligar cada uno de ellos y dar un veredicto final acerca de cual puede ser una apropiada metodología de trabajo con las celdas de combustible microbianas.

### 4.1 Resultados Experimentales

Con el fin de determinar algunos parámetros del modelo, fue necesario realizar un montaje experimental como el que se describió en el capítulo 3, la idea de las celdas con cátodo al aire, se fundamenta en el hecho de evitar o mejor garantizar que el cuello de botella de la cinética, no este en el cátodo, esto para permitir ahondar en el estudio del com-

plejo electrodo-microorganismos lo cual se puede afirmar ya que los cátodos recubiertos de platino expuestos al aire han sido ampliamente estudiados por diferentes autores desde la misma invención de la pila de combustible.

Añadirle mayor complejidad a este sistema no es lo ideal, ya que es evidente el comportamiento atípico de los microorganismos como catalizadores en estos dispositivos, por ejemplo, el hecho de la aparición de nuevos "catalizadores" cada cierto tiempo y ninguno de ellos igual al otro pese a ser clones, lo que es clara evidencia de el carácter irreversible y no lineal de estos dispositivos, lo cual justifica el hecho de emplear termodinámica del no equilibrio para enfrentar esta situación.

La experimentación fue dirigida para establecer el grado de acople entre las reacciones metabólicas globales y la generación de corriente eléctrica, esto es, determinar el coeficiente fenomenológico  $L_{\phi r}$  y compararlo con los directos. Para evitar los efectos difusivos fue necesario aplicar agitación en este caso 120rpm lo cual e conjunto con el electrodo (Barra de Grafito) permite una cierta turbulencia (lineas de flujo perpendiculares al electrodo), como se ve reflejado en la simulación hidrodinámica que se puede apreciar en la sección de simulación en este mismo capítulo.

También se probaron celdas en Erlenmeyer, en las cuales tanto el electrodo de grafito como de platino estaban sumergidos en el medio de cultivo, la idea de emplearlas, era tener una forma rápida y fácil de determinar si una cepa microbiana era o no electroquímicamente activa, para esto se media el voltaje de celda en circuito abierto (equilibrio) respecto de

una referencia o potencial redox, concluyendo que a mayor voltaje, mayor energía libre y por tanto existe una probabilidad mas alta de que pueda funcionar como generadora de corriente, el signo del potencial eléctrico indica la presencia de oxígeno, de tal forma, que a potenciales redox negativos se tiene presencia de anaeróbicos, mientras que a potenciales redox positivos se tiene presencia de organismos aeróbicos. Posteriormente y después de algunas voltametrías cíclicas fue posible darse cuenta de la presencia de reacciones irreversibles, probablemente asociadas a la adsorción de alguna especie química en el electrodo de platino evitando la reducción con el  $O_2$  y por consiguiente haciendo que la reacción en el metal inerte pudiese ser controlante, lo que impide el estudio del ánodo microbiano que para fines de este trabajo es lo que realmente interesa, de cualquier modo resulta interesante mostrar los resultados asociados a ambas celdas con el fin de corroborar lo que se acaba de plantear.

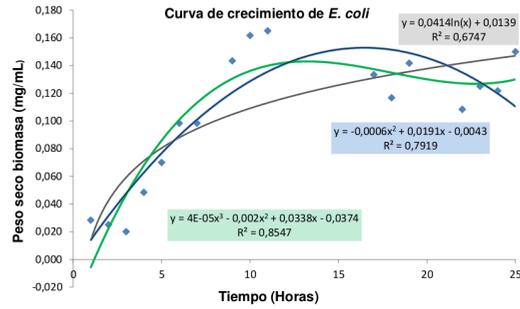
#### 4.1.1 **Curva de Crecimiento y Azúcares Reductores**

En la figura 4.2 se muestran comportamientos ajustados a lo encontrado en la literatura (ver [55]), esto es resultado de un ensayo abortivo en el que se inocularon  $3 \times 10^9 UFC/ml$ , a dichos tubos se les centrifugo durante 15min a  $-5^\circ C$ , con el fin de separar los solidos y al mismo tiempo frenar el metabolismo bacteriano, el sobrenadante posteriormente es depositado en otro tubo y congelado para su posterior análisis espectrofotométrico como

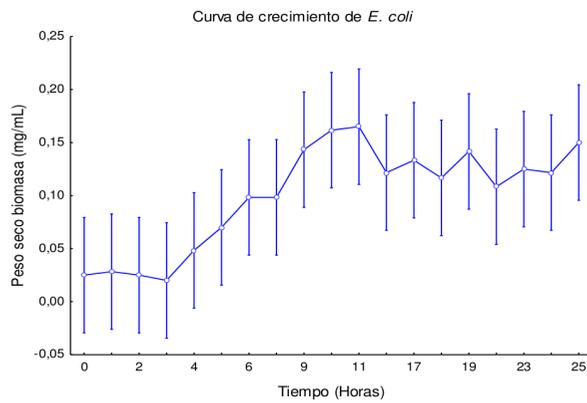
se señalo en el capitulo de materiales y métodos. A los solidos se les somete a secado a 40°C durante 48h, y se pesan, para después comparar este dato con el peso del tubo antes de ser inoculado con *E.coli*, esta diferencia permite establecer el peso de la biomasa con el cual es posible construir la curva de la figura 4.1. En el caso del sobrenadante, una vez se determina la concentración de azucares por el método de Miller se registran y promedian los resultados obteniéndose 4.2 la cual debe poseer una concavidad opuesta, es decir, los tiempos de crecimiento de biomasa deben coincidir exactamente con los tiempos de disminución de glucosa, como en efecto ocurre, lo cual es indicio de un apropiado desarrollo experimental.

De este par de experimentos fue posible obtener una ecuación cinética con la cual alimentar los modelos computacional y termodinámico, para ello se realizo una interpolación polinómica en ambas curvas como se señala en 4.2 b) y en 4.1 a), seleccionándose la de mejor  $R^2$  en ambos casos, la irregularidad en el comportamiento de ambos ensayos reflejado en la magnitud de las barras verticales de la gráfica 4.1 obedece a la dificultad de obtener la misma cantidad de inoculó en los diferentes experimentos, así como en el hecho de no haber podido realizar todos los experimentos de forma simultanea, la carencia de reactivos algunas veces y la falta de infraestructura para procesar al mismo tiempo esta gran cantidad de experimentos, fueron en total 49 tubos por triplicado, de los cuales se descarto una de las repeticiones por diversos problemas, como daños en el pelet o inconsistencia de los resultados por ejemplo tubos que presentaron mayor valor en peso seco que en húmedo.

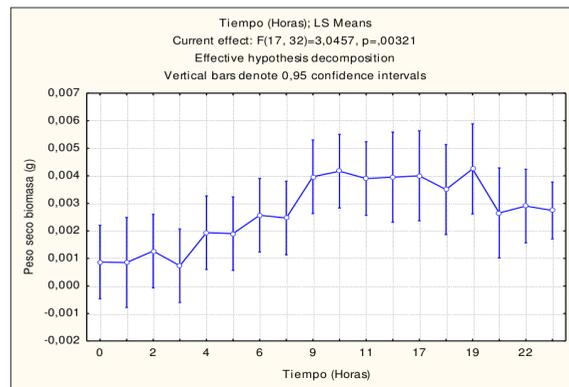




(a) Ajuste de Diferentes Curvas de Crecimiento

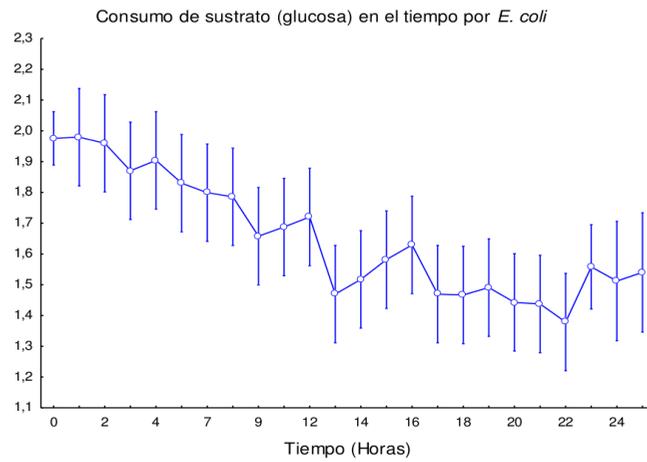


(b) Curvas de Crecimiento con Intervalos de Confianza

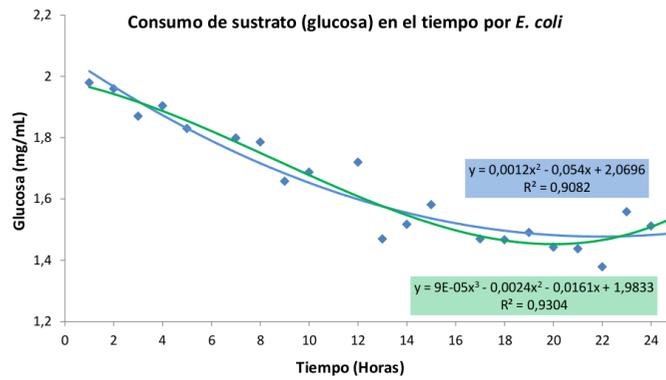


(c) Estadística de Curva de Crecimiento

Figura 4.1: Curva de Crecimiento *E.coli*



(a) Consumo de Glucosa con Desviación Estándar



(b) Curvas de Consumo de Glucosa con Interpolación

**Figura 4.2:** Curva de consumo de Glucosa

Cada una de las gráficas arriba permite determinar exactamente el momento en que

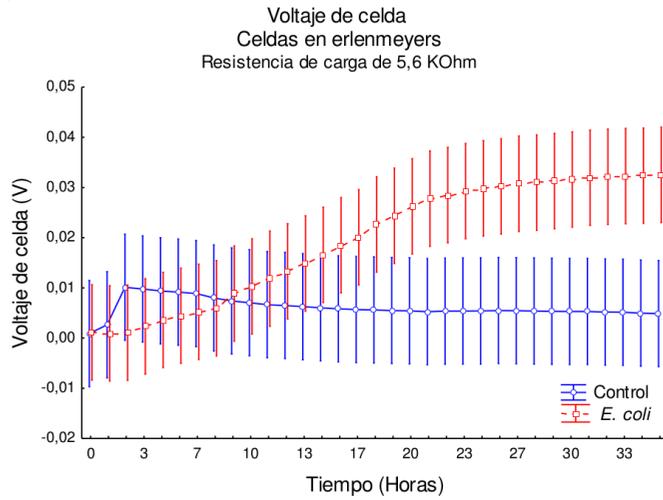
el sistema alcanza el estado estacionario para este caso, alrededor de las 9h el sistema comienza a estabilizarse alcanzando un comportamiento estable en el tiempo, dicha zona es de interés ya que allí es donde el ánodo alcanza su estado de mínima entropía [44]. Como se vera mas adelante los perfiles de estas dos curvas coinciden con los de voltaje de celda Vs tiempo.

### 4.1.2 Ensayos Electroquímicos

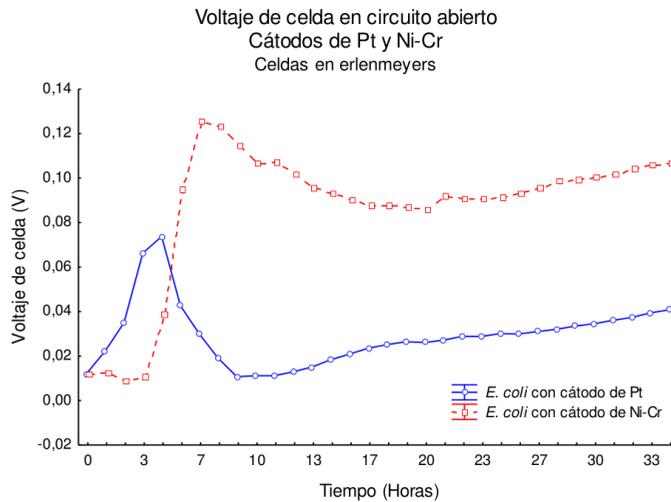
En esta sección, se realizaron varios ensayos tanto en celdas de combustible (Erlenmeyers y reactores) como en potencióstato, en el primer caso se trato de un seguimiento en el tiempo de la respuesta en voltaje tanto en circuito abierto como cerrado, con el fin de observar el comportamiento eléctrico, determinar la densidad de potencia generada por estos dispositivos y establecer el  $\Delta G_r$  con el fin de obtener los coeficientes cruzados de Onsager y de esta forma entender su importancia o no en la fabricación de Celdas de Combustible Microbianas, mas aun, si en el estudio de sistemas bio-electroquímicos es necesario abordarlos enmarcados en el formalismo de la termodinámica del no equilibrio. Para comenzar se mostraran los resultados obtenidos con las celdas fabricadas en frascos Erlenmeyer, como se menciona en el capítulo de materiales y métodos, ambos electrodos (ánodo y cátodo) están unidos mediante correas de plástico y separados uno de otro mediante un tubo perforado. En 4.3 es posible apreciar el seguimiento efectuado a la diferencia de potencial tanto en circuito cerrado como abierto, como se aprecia, los inter-

valos de confianza señalan una diferencia significativa con el control a partir de las 20h, esto permite afirmar que la presencia de microorganismos es la responsable de la generación de corriente eléctrica, si se compara esta gráfica con la de crecimiento microbiano, a las 20h el sistema se encuentra en estado estacionario estable, así mismo, es evidente la similitud entre ambas figuras, lo que permitiría conjeturar que salvo el desfase entre ambas en tiempo, sería posible hacer seguimiento de aparición de biomasa empleando el experimento expuesto en este trabajo, que hasta donde se sabe no tiene un equivalente en la literatura especializada, por lo cual el campo de posibilidades es inmenso dado que no es un método invasivo y aparte bastante económico. El desfase en tiempos, tarda mas en alcanzar el estado estacionario el voltaje de celda que la concentración de biomasa, puede deberse al hecho que en el caso de la determinación de peso seco, este se realiza sobre el total de la muestra homogeneizada, mientras que en el caso del potencial de celda, se debe esperar a que haya colonización del electrodo para poder apreciar cambios en la señal, por tal motivo se sugiere que en experimentos posteriores se deje el electrodo sumergido en el medio de cultivo inoculado por al menos 24h y posteriormente, emplear este a su vez como inculó del reactor o sistema a analizar de tal manera que se garantice un grado de cobertura mínimo en el electrodo, lo que teóricamente reduciría la diferencia temporal entre los dos casos analizados y de esta forma permitiría a este ensayo convertirse en una nueva técnica de hacer seguimiento a bioreactores, obviamente es necesario establecer una relación voltaje de celda, concentración de biomasa lo cual se pudiera hacer de forma ex-

perimental mediante una curva de calibración o abordarlo desde un punto de vista teórico como se vera mas adelante.



(a) Curva de Potencial contra tiempo



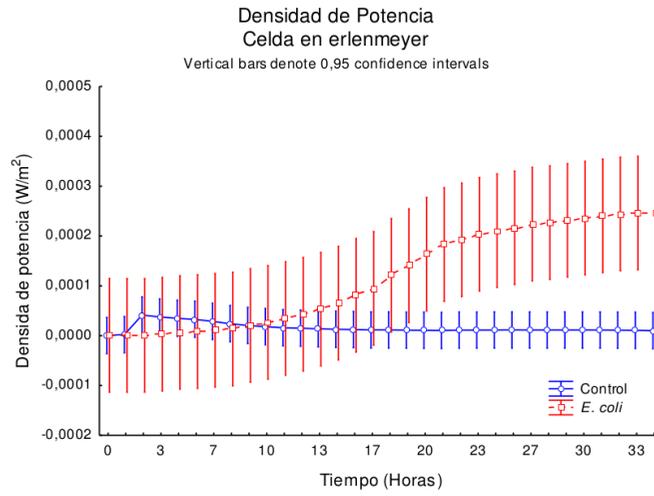
(b) Curvas de Potencial Circuito Abierto Diferentes Cátodos

**Figura 4.3:** Curvas de Potencial

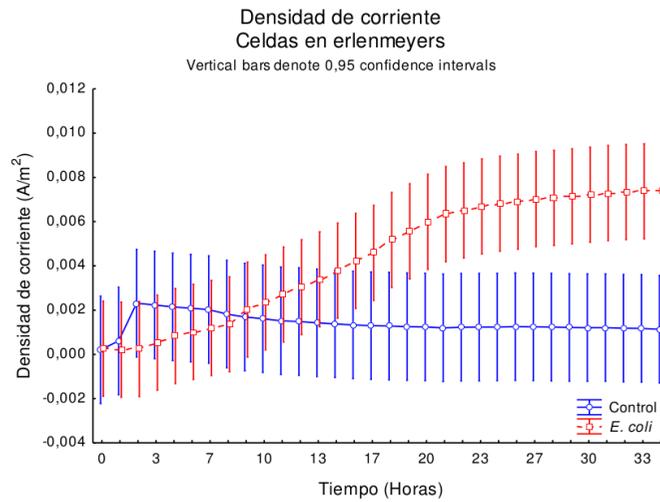
Respecto del comportamiento electroquímico de estos dispositivos, es claro que su trabajo como celdas galvanicas es cuestionable, ya que, a la luz de la teoría es necesario que el ánodo sea el lugar donde se produzca la oxidación, por lo cual tendera a acumular cargas negativas y en este caso el electrodo con potencial positivo es el grafito, lugar que en teoría sería el predilecto para crecer por parte de las bacterias, ya que posee alta porosidad y baja toxicidad en comparación con un metal como lo es el platino, así mismo, como ambos electrodos están sumergidos en el mismo medio es difícil establecer que especies se oxidan y se reducen, en este caso teóricamente el  $O_2$  debería estarse reduciendo en el platino, sin embargo esto parece no estar sucediendo, como se vera mas adelante en las voltametrías cíclicas exploratorias.

En la figura 4.13 se puede apreciar las densidades de corriente y potencia, la importancia de estas variables radica en que finalmente es el flujo de electrones y la potencia lo que permite dimensionar la relevancia energética de las celdas de combustible microbianas, así como la posibilidad de escalar este proceso, para una aplicación industrial o domestica, en este sentido el máximo alcanzado fue de  $0.2\text{mW}/\text{m}^2$  o  $2.1\text{mW}/\text{m}^3$  para un volumen de trabajo de 75ml, comparando esto con algunas celdas que emplean glucosa pero de doble cámara o cátodo al aire, por ejemplo Oliveira [56] reporta una densidad de potencia de  $1.4\text{W}/\text{m}^3$  lo que pone de manifiesto una diferencia marcada debido a que en el caso de los Erlenmeyers la disponibilidad de un agente reductor no es tan clara, mientras que en las celdas con cátodo expuesto al aire este siempre esta presente garantizando que el

cátodo no controle, sin embargo desde un punto de vista económico las celdas de cámara sencilla no requieren Nafion<sup>TM</sup>, lo que reduce enormemente su costo, por lo cual habría la necesidad de realizar un análisis de factibilidad con el fin de establecer la viabilidad económica de uno y otro dispositivo. Esto se sugiere para un trabajo posterior.



(a) Densidad de Potencia

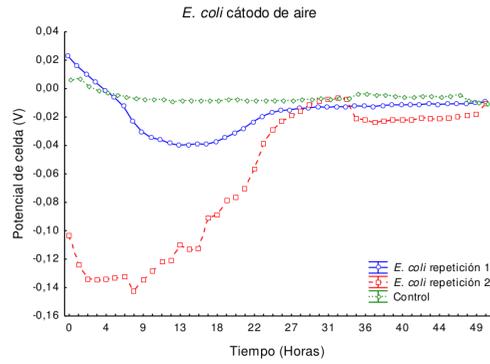


(b) Densidad de Corriente

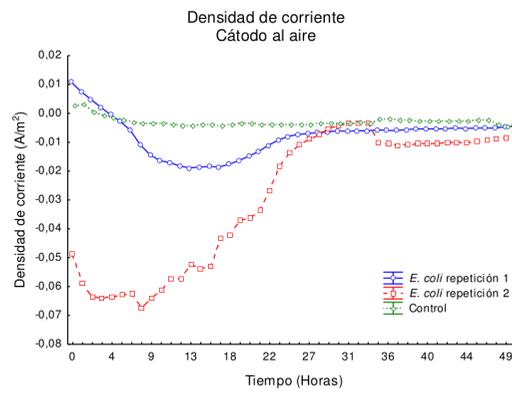
**Figura 4.4:** Curvas de Densidad Corriente y Potencia

En el caso de las celdas de cámara sencilla los resultados pueden apreciarse en la 4.5, allí es evidente un comportamiento completamente distinto, o mas que distinto contrario a lo visto en el caso de los Erlenmeyer, la razón es que aquí la reacción de reducción es mas simple  $O_2 + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ , en donde los  $H^+$ , son transportados por la membrana polimérica de NAFION<sup>TM</sup>.

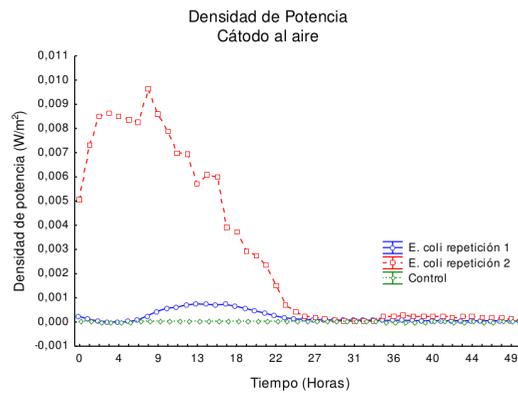
De nuevo comparando con Oliveira, se ve una mejora significativa en la densidad de potencia que para este caso, alcanza un valor pico de  $0.034W/m^3$ , mucho mejor que para el caso del Erlenmeyer, pero aun lejos de los valores pico reportados, parte de esta ultima diferencia radica en que la cepa empleada para los ensayos reportados, es una anaeróbica estricta, que puede ser *Shewanella. spp* o *Geobacter.spp*, lo cual desde un punto de vista practico en aras de tener una aplicación comercial es completamente alejado de la realidad, ya que a parte del hecho que para este tipo de cepas el oxigeno es toxico, el sustrato empleado es altamente complejo y enriquecido con minerales traza tal como lo reportan Lovley [58] y Logan [5] lo cual hace de este tipo de tecnología altamente costosa. Gracias al proyecto CIEN-EPM UNAL, ha sido posible adquirir varios de estos compuestos por lo cual se puede dar fe de esto ultimo.



(a) Voltaje de Celda MFC cátodo al aire



(b) Densidad de Corriente MFC cátodo al aire



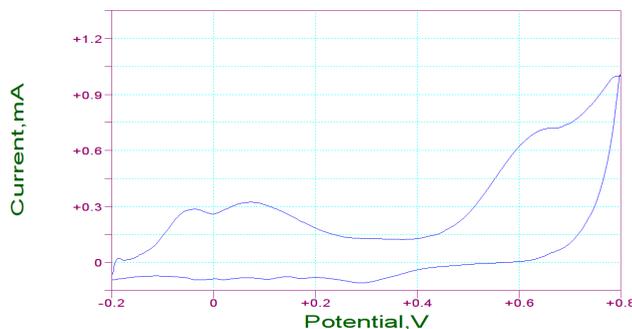
(c) Densidad de Potencia MFC cátodo al aire

Figura 4.5: Comportamiento MFC cámara Sencilla

### 4.1.3 Voltametría Cíclica Y Electrodo de Disco Rotatorio

La voltametría cíclica o voltamperometría, es una técnica diseñada para realizar estudios de oxidación-reducción, mecanismos de reacción asociados a especies redox y para determinar propiedades electroquímicas de un medio, para esto se aplican barridos de potencial tanto de oxidación (hacia potenciales positivos) como de reducción (hacia potenciales negativos) y se observa la respuesta en corriente del sistema, es decir, si un potencial en particular propicia una reacción esto se verá reflejado en un cambio en la corriente y generalmente este tipo de comportamiento es único para cada uno de los elementos químicos. Por esto, idealmente se espera que cuando el barrido cambie de sentido ocurra la reacción opuesta, esto es sinónimo de equilibrio químico.

En el caso de las celdas de combustible microbianas es interesante conocer en que potenciales pudiese haber algún tipo de oxidación, ya que es precisamente este tipo de reacciones las que propiciarán el flujo de electrones requerido para funcionar como generador eléctrico, en la figura 4.6 se aprecia el resultado de una voltametría cíclica aplicada al medio de cultivo inoculado con *E.coli*.



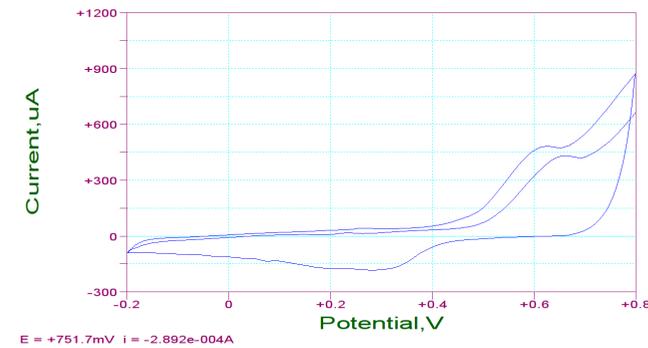
**Figura 4.6:** Voltametría cíclica realizada a *E.coli* Primer barrido

En esta se aprecian picos de oxidación cercanos a  $-0.2\text{V}$  y  $0.2\text{V}$  respecto de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , al aplicar estas técnicas a microorganismos se debe tener cuidado de no sobrepasar los  $0.9\text{V}$  dado que esto podría provocar rupturas en las células [59], mas adelante se mostrara un ejemplo puntual de esto. Este par de potenciales, irreversibles ambos ya que no presentan su contra parte cuando se realiza el escaneo en forma inversa dan a entender la presencia de procesos oxidativos, probablemente metabólicos dado que como se menciona no existe un par redox detectable por el potenciostato, este comportamiento puede deberse en parte a un análogo del complejo Q citocromo c oxidasa <sup>1</sup>. Otra posibilidad tiene que ver con una adsorción de glucosa y su posterior oxidación (gluconolactona) en el electrodo auxiliar que posteriormente evite un segundo proceso oxidativo por apantallamiento (modificación del

---

<sup>1</sup>Esta teoría se debe Maria Yepes, asesor de este trabajo

electrodo), muestra de esto puede ser los posteriores barridos en los cuales desaparecen estos picos ver figura 4.7; en total se realizaron 20 barridos en los cuales solo los dos primeros presentaron este comportamiento.



**Figura 4.7:** Voltametría cíclica realizada a *E.coli* Tercer y Quinto Barrido

Una de las preguntas claves a la hora de modelar este sistema se fundamenta en la pregunta, ¿Cuántos electrones son transferidos al electrodo?, para resolver esto se recurrió al electrodo de disco rotatorio, el cual se fundamenta en el desarrollo de Koutecki - Levich que consiste en la solución de la hidrodinámica del electrodo de trabajo; un disco que rota a muy alta velocidad. Esta técnica es útil para estudiar la cinética y los mecanismos de reacción electroquímicos para una semirreacción, la determinación de los parámetros electroquímicos se realiza mediante las gráficas de Koutecki-Levich, en las cuales se gráfica  $1/i_l$  Vs  $w^{-1/2}$  y posteriormente se reemplazan los datos de la pendiente y el intercepto en

la ecuación:

$$\frac{1}{i_L} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{0.62nFD^{2/3}AC * \nu^{-1/6}w^{1/2}} \quad (4.1)$$

n: Numero de electrones.

A: Área del electrodo (cm<sup>2</sup>).

D: Coeficiente de difusión (cm<sup>2</sup>/s).

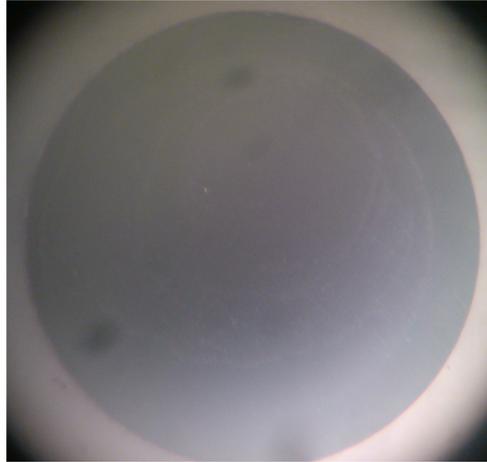
C\*: Concentración en el seno del fluido (mol/ml).

$\nu$ : Viscosidad cinemática (cm<sup>2</sup>/s).

w: Velocidad angular (s<sup>-1</sup>).

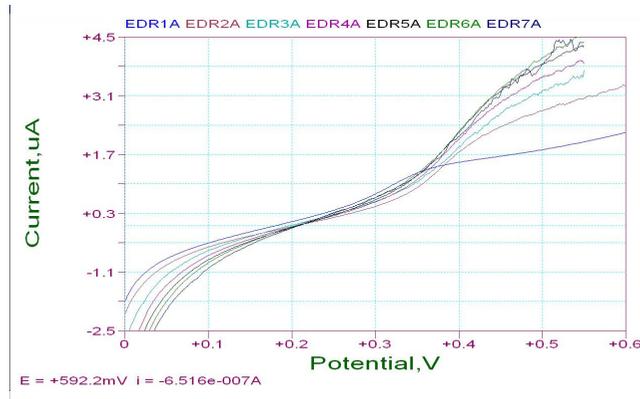
F: Constante de Faraday 96485.34 (C/mol).

En este caso, el experimento se llevo a cabo, sumergiendo el electrodo de disco rotatorio en una solución con alta concentración de células y medio de cultivo, se dejo 24h en incubación a 35°C y posteriormente se reviso si hubo colonización en el disco de carbón vítreo ver figura 4.8.

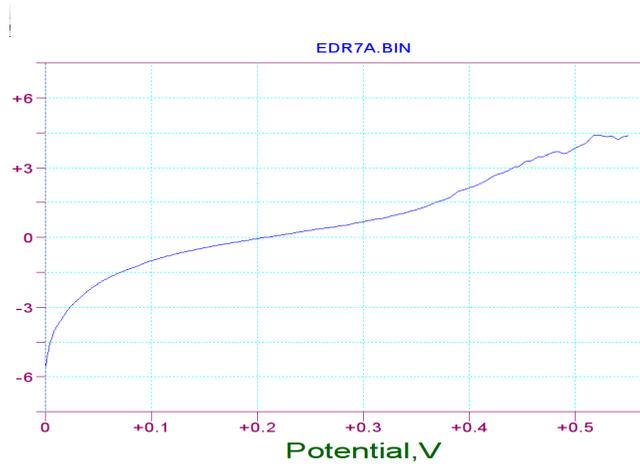


**Figura 4.8:** Vista superior del Electrodo de Disco rotatorio a 10x Estereoscopio Olympus<sup>TM</sup>

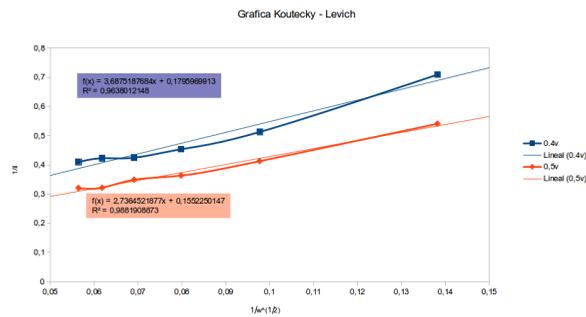
Como se puede apreciar en esta gráfica el electrodo presenta múltiples capas opacas, normalmente este electrodo es brillante, lo que indica la presencia o formación de biopelícula asociada a las bacterias allí inoculadas en muy alta concentración. Una vez certificado esto, se procedió a realizar barridos lineales a diferentes velocidades de agitación desde 500rpm-3000rpm, con el fin de determinar la corriente límite, es decir aquella que presenta un nivel constante sin importar el potencial (estado estacionario), este experimento se realizó por duplicado en dos muestras de *E. coli* los resultados de este ensayo se pueden ver en la figura 4.9 c



(a) Barridos Lineales en Disco Rotatorio para Diferentes Velocidades



(b) Barrido lineal 2000rpm



(c) Gráfico de Koutecki Levich

Figura 4.9: Gráficas Disco Rotatorio y Koutecki Levich

A partir de la pendiente del gráfico de Koutecki-Levich y reemplazando en 4.1 fue posible encontrar que el número de electrones transferidos es  $3.4 \pm 0.7$ , este dato hasta donde se conoce, no ha sido reportado en la literatura, muchos de los modelos existentes de celdas de combustible asumen entre 2 y 4 electrones dependiendo del tipo de microorganismo, esto se debe a que parten de bacterias anaeróbicas estrictas, en este caso se trata de una bacteria facultativa, por lo que el mecanismo de transferencia está atado a la presencia de oxígeno, por lo cual en condiciones mixtas, es decir, regiones bajas de oxígeno combinadas con regiones de disponibilidad de este, la generación de electrones no es del todo clara, de igual forma, el hecho de que el número de electrones no es exactamente un entero implica la presencia de fenómenos de alta complejidad. Para un trabajo posterior, se sugiere el modelado de la concentración de oxígeno en una celda de combustible microbiana de cátodo al aire y su influencia en la generación de corriente eléctrica, acompañado de un trabajo experimental encaminado a determinar precisamente esta relación, mediante la oxigenación y desoxigenación de la celda microbiana, observando la respuesta en corriente.

## **4.2 Simulación**

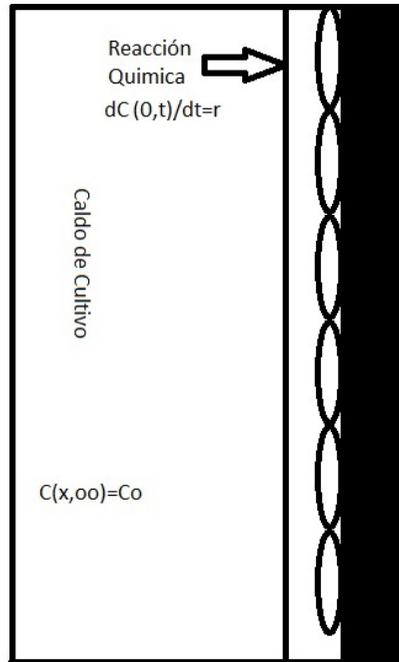
### **4.2.1 Supuestos del modelo**

- Flujo Turbulento, en el seno del fluido.

- Concentración de sustrato en exceso.
  - Región de trabajo: Interfaz electrodo-microorganismos.
  - Crecimiento Microbiano en Fase Estacionaria.
  - En el caso del modelo termodinámico, convección mucho mayor que difusión.
  - Los efectos del transporte electrónico se omiten debido a se suponen mucho mas rápidos que la velocidad de reacción y difusión.
  - Se omiten los efectos de reacción química en el seno del fluido.
  - La suposición de estado estacionario pese a ser un sistema cerrado, se debe a que el volumen de control se toma entorno a las inmediaciones del sistema electrodo microorganismos, para este caso el sistema es abierto, dado que hay flujos allí. <sup>2</sup>
- En el gráfico 4.10 se aprecia de forma general, la región de la celda que se desea modelar.

---

<sup>2</sup>En el texto se demuestra en función del conjunto adimensional  $F(Re, Sc, Sh)$ , la convección es dos ordenes de magnitud mayor que la difusión,  $Sh \gg 1$



**Figura 4.10:** Esquema del Sistema Electrodo-Microorganismos

La expresión  $r$  (velocidad de reacción), se toma según la cinética de consumo de sustrato del organismo de interés, en este caso la obtenida para *E.coli*.

#### 4.2.2 Descripción del Modelo

Para este objetivo se recurrió al interprete de C++, denominado FreeFem++, el cual reúne las librerías necesarias para abordar problemas de ecuaciones diferenciales parciales empleando el método de los elementos finitos, el problema a abordar aquí, consiste en la determinación de un perfil de concentración en la celda de combustible microbiana de

cátodo expuesto al aire, concretamente un problema de difusión-reacción, sin embargo y con el fin de utilizar esta herramienta informática fue necesario adentrarse en el cálculo variacional, debido a que FreeFem++, solo admite problemas descritos mediante formulación débil [66].

Bajo esta óptica los problemas se deben representar mediante una forma bilineal  $a(u,v)$ , una forma lineal  $l(t,v)$  y posiblemente una condición de frontera a esto se le denomina formulación variacional o forma débil de una ecuación diferencial parcial. Otro aspecto importante, es demostrar que en efecto los efectos difusivos son pequeños en comparación con la convección, en ese sentido se trabajara, suponiendo que la difusión es importante y al final de este capítulo se compararan ambos modelos, con y sin difusión, permitiendo concluir, si es importante o no.

Si  $v$  es una función de prueba nula en un espacio  $\Upsilon_d$  el borde  $\Theta$  se separa en  $\Upsilon_d$  y  $\Upsilon_n$  tal que su intersección sea el conjunto vacío y su unión sea el borde mencionado, entonces la ecuación diferencial parcial en  $\Xi$

$$-\nabla \cdot w \nabla c = f \quad (4.2)$$

se puede representar como sigue:

$$-\int_{\Xi} \nabla \cdot (w \nabla c) v d\xi = \int_{\Xi} w \nabla v \cdot \nabla c d\xi - \int_{\Upsilon} v k \frac{\partial c}{\partial n} dv = \int f v \quad (4.3)$$

Mientras que el producto:

$$\nabla v \cdot \nabla c = \left( \frac{\partial c}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial y} \frac{\partial v}{\partial y} \right) \quad (4.4)$$

Lo anterior para un sistema bidimensional, en general FreeFem++ esta diseñado para resolver problemas en diferencias finitas bidimensionales, si bien posee rutinas para resolver problemas volumétricos mediante volúmenes finitos, estos algoritmos aun no están bien depurados. Continuando con la representación de PDE en forma débil, se tiene lo siguiente:

$$\frac{\partial c}{\partial n} = \frac{-au + g}{k} \quad (4.5)$$

Entonces

$$- \int_{\Gamma} vk \frac{\partial c}{\partial n} = \int_{\Gamma} acv - \int_{\Gamma} bv \quad (4.6)$$

4.6 es la forma débil de las condiciones de frontera, finalmente

$$\int_{\Xi} k \nabla v \cdot \nabla c d\xi + \int_{\Gamma} acv dv = \int_{\Xi} fvd\xi + \int_{\Gamma} bvdv \quad (4.7)$$

Dicho lo anterior ahora si es posible describir el problema de difusión reacción en forma variacional. Sea

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot D \nabla c + R_x \quad (4.8)$$

con

$$C(0, x, y) = C_0 \text{ Condicion Dirichlet} \quad (4.9)$$

$$\frac{\partial C(t, a, y)}{\partial t} = R_x \text{ Codicion Neumann} \quad (4.10)$$

Esta ultima condición de frontera le indica a la PDE que a partir de cierta distancia en x, donde se encuentra ubicado el electrodo hay reacción química, de igual forma se procede para las demás condiciones de frontera asociadas al electrodo<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup>La difusión se tomo igual que para los anteriores apartes de este trabajo es decir  $D=7 \times 10^{-7} \frac{m^2}{s}$

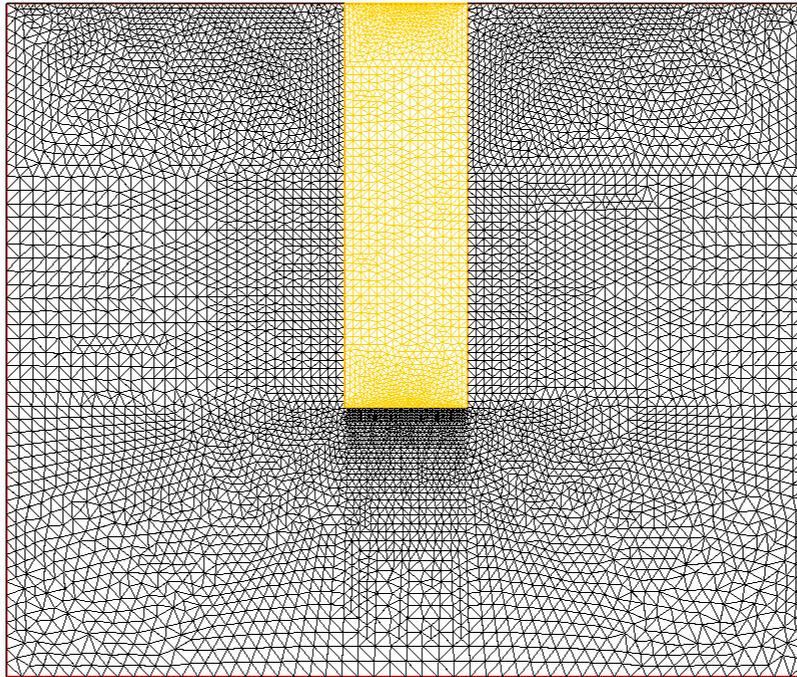
En este caso  $R_x$  es la ecuación de velocidad obtenida experimentalmente.

$$C(\infty, x, y) = 0 \quad (4.11)$$

De lo anterior se deducen cosas interesantes, la mas relevante quizás, tiene que ver con el hecho de que para describir bien el problema, se requiere una gran cantidad de condiciones de frontera, en el caso de 4.10 se debe indicar todas las posibles combinaciones del par  $(x,y)$  tal que exista reacción química, acá solo interesa lo que ocurre en el ánodo microbiano, por lo tanto el problema se simplifica a solo el transporte de glucosa desde las regiones adyacentes al electrodo, hasta la superficie en donde se supone esta completamente cubierto de microorganismos. El calculo variacional simplifica enormemente esto como se vera a continuación, ya que las condiciones de frontera se transforman en una sola integral que barre toda la superficie del electrodo.

$$\int_{\Gamma} cv + dtD\left(\frac{\partial c}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial y} \frac{\partial v}{\partial y}\right) + \int_{\Gamma} -\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} v - \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} v - dtfxv = 0 \quad (4.12)$$

finalmente el algoritmo para resolver el problema, consta de tres partes, primero se definen los elementos finitos necesarios para describir el sistema, esto se realiza mediante el planteamiento de ecuaciones parametricas que describan la situación, en este caso, un cilindro con un electrodo rectangular sumergido ver 4.11



**Figura 4.11:** Malla generada por FreeFem++ para la MFC

En esta se cuenta con un total 14363 elementos finitos y 7732 vértices. El código para generar esta malla se presenta a continuación:

```
border a(t=0.055,0){x=0;y=t;label=1;}\  
border b(t=0,0.065){x=t;y=0;label=1;}\  
border c(t=0,0.055){x=0.065;y=t;label=1;}\
```

```

border d(t=0.065,0.0375){x=t;y=0.055;label=2;}\\
border e(t=0.0375,0.0275){x=t;y=0.055;label=2;}\\
border f(t=0.0275,0){x=t;y=0.055;label=2;}\\
border g(t=0,0.033){x=0.0275;y=0.055-t;label=3;}\\
border h(t=0,0.01){x=0.0275+t;y=0.022;label=3;}\\
border i(t=0,0.033){x=0.0375;y=0.022+t;label=3;}\\

int n=50; Numero de elementos finitos en la frontera\\

mesh Th=buildmesh(a(n)+b(n)+c(n)+d(n)+e(n)+f(n)+g(-n)+h(-n)+i(-n));\\

plot(Th,wait=1);\\

```

Th, es el espacio que contiene toda la información del sistema.

La solución del problema se separa en dos partes, un algoritmo iterativo para resolver la parte evolutiva de la ecuación es decir cuya variable independiente es el tiempo, aquí se emplea diferencias finitas y para la parte espacial se emplea elementos finitos.  $\text{fespace } V_h(\text{Th}, P1)$ ; Define el espacio y el tipo de elementos finitos en este caso lineales y continuos a tramos del tipo P1

```

Vh u,v,uu,fx,gx,co; Se definen las variables en este sub espacio\\

real dt = 1, mu = 7e-3 (Coeficiente de Difusión),z;\\

problem dco(u,v) =\\

```

```

int2d(Th)( u*v + dt*mu*(dx(u)*dx(v) + dy(u)*dy(v)))\\
+ int2d(Th) (- uu*v - dt*fx*v )\\
+ on(1,2,u=2) Concentración inicial de glucosa (g/l)\\
+ on(3,u=gx);\\
real t = 0;\\}
uu = 2;//gml
ofstream ff("conce.dat"); Almacena datos de un punto especifico de la malla\\
ofstream gnu("cur.dat");\\
ofstream alpha("cur2.dat");\\
ofstream omega("cur3.dat");\\
for (int m=0;m<=2500;m++)\
{\
t=t+dt;\\
$fx=0;$ No interesa la reacción química en otra región que no sea ele electrodo \\
$gx = (9e-5*t^3-0.0024*t^2-0.0161*t+1.9833);$Esta es la ecuación obtenida mediante exper
dco;\\
co=-u(0.028,0.02)*3*96485.34*0.230/(t*180.1*7.81) Ecuación de Faraday para determinar la
ff<<u(0.028,0.02)<<endl; rutinas para capturar datos en puntos específicos de la malla\\
gnu<<u(0.028,0.03)<<endl;\\
alpha<<u(0.028,0.04)<<endl;\\

```

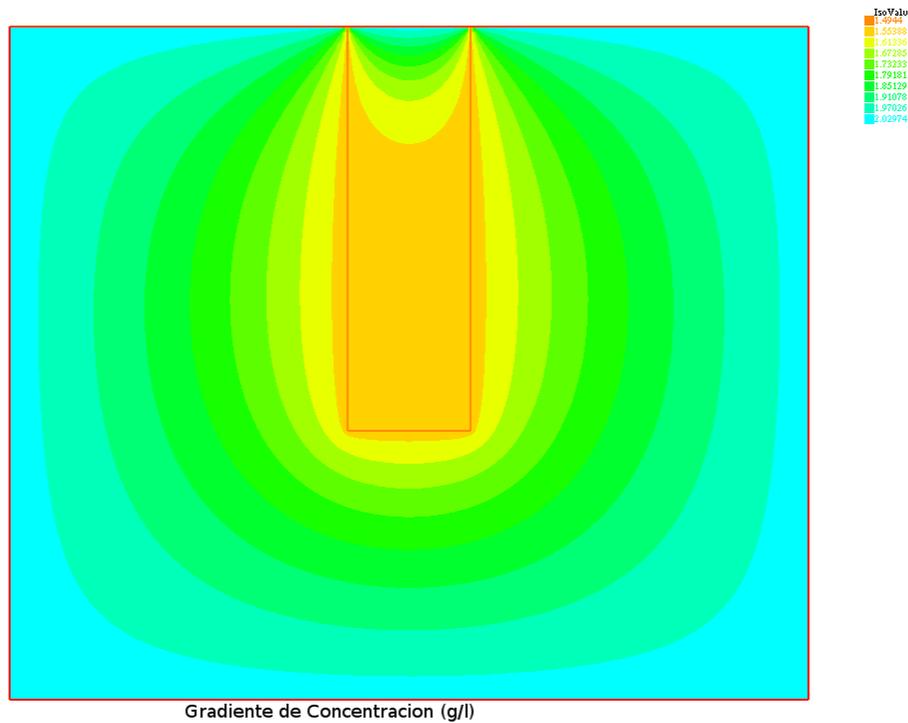
```
omega<<u(0.028,0.05)<<endl;\
```

```
plot(Th,u,fill=1,value=true,wait=false,nbiso=10);\
```

Como se puede apreciar, el código sigue una lógica y sintaxis similar al lenguaje de programación C++, lo cual le da a FreeFem++ una ventaja en cuanto a velocidad de procesamiento, pero una curva de aprendizaje más lenta en su desarrollo, sin embargo al tratarse de software libre, compensa el tiempo invertido en su comprensión con un completo y absoluto manejo de la licencia.

### 4.2.3 Resultados de la Simulación

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la simulación con FreeFem++, primero un gráfico de nivel que es la forma de visualización estándar para el software y posteriormente un perfil del mismo, con el fin de hacer más comprensible los resultados.



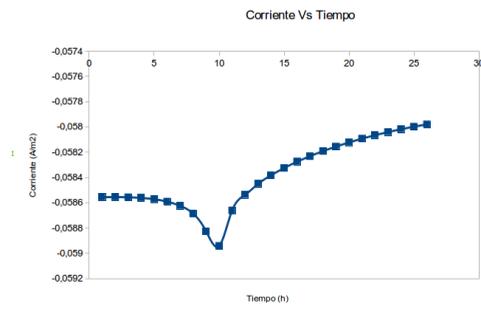
**Figura 4.12:** Gradiente de Concentración (g/l)

En la gráfica 4.12 se puede apreciar una distribución uniforme de concentración y una cierta autosimilaridad y simetría en la solución, no es de extrañar dado que el sistema es cilíndrico, esto de cierta manera concuerda con lo esperado de este tipo de ecuaciones diferenciales parciales de tipo evolutivo, así mismo, desde el punto de vista numérico se tiene una solución consistente con lo experimental, en el sentido que las zonas azul clara, hace referencia a las moléculas de glucosa que no fueron consumidas por los microorganismos, mientras que las zonas naranja, presentan una disminución de 0.5g/l desde la concentración inicial. El perfil de concentración que se aprecia esta asociado con una

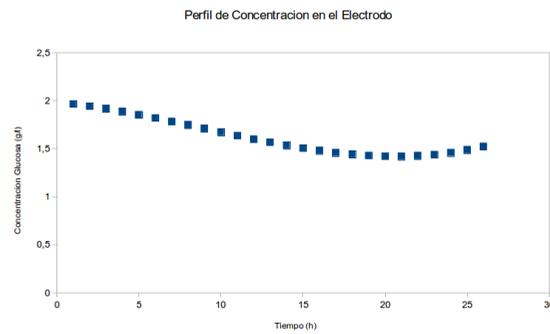
evolución del sistema durante 25h, el tiempo de computo fue 9.69s, cabe aclarar que el comportamiento apreciado, parte del hecho de suponer, que la mayor concentración de microorganismos se encuentra en el electrodo, si se compara esta simulación con los datos obtenidos experimentalmente, ver curva de consumo de glucosa 4.2 en ambos casos la concentración ronda los 1.5g/l, en el caso de la corriente generada en el electrodo esta se predice mediante la aplicación de la ecuación de Nernst y los datos de la concentración de glucosa entregada por la simulación y los datos de la curva de crecimiento.

$$j(A/m^2) = (E_{reduccion} - (8,314472T/(nF)) * Ln(\gamma_{b/s}) / (R_L \times A_{electrodo}) \quad (4.13)$$

El perfil para la densidad de corriente puede apreciarse en:



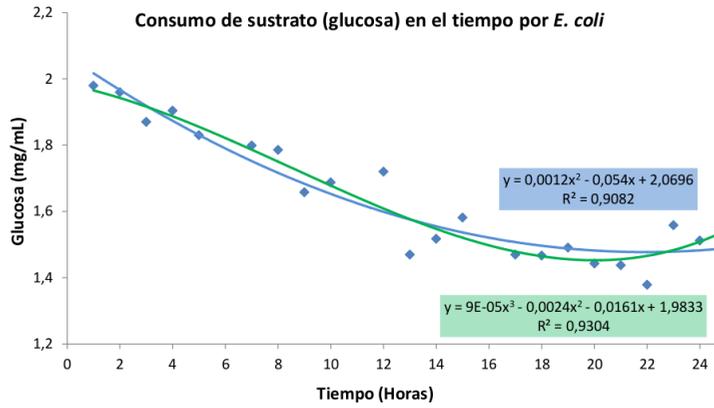
(a) Perfil de Corriente Simulado



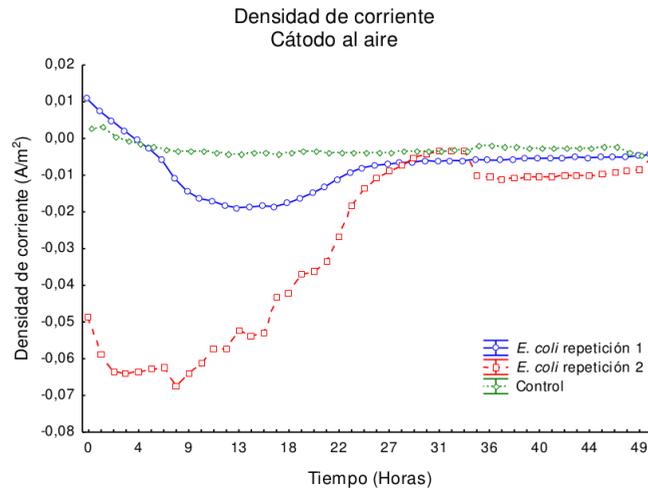
(b) Perfil de Concentración en el Electrodo (simulación)

Si se compara este con el perfil de corriente hallado experimentalmente y con la curva

de consumo de glucosa



(c) Concentración de Glucosa Experimental



(d) Densidad de Corriente

Figura 4.13: Curvas comparativas Simulación - Realidad

Se puede apreciar un comportamiento similar y unos valores de corriente del mismo orden, obviamente existe un error inherente asociado, a que muchos de los procesos de transporte de carga aun son inciertos, para poder obtener una mejor predicción, es necesario ahondar mas en los mecanismos de transporte de electrones en células adheridas a electrodos.

A continuación se plantea una simulación de la hidrodinámica del sistema MFC agitador orbital, con el fin de dar validez a los supuestos planteados en secciones anteriores, donde se asume que el medio tiene una distribución homogénea de velocidades haciendo que la concentración en el reactor sea de igual forma homogénea.

Para esto se resolvió la ecuación de Navier-Stokes, dado que el sistema tiene agitación constante, se asumió estado estacionario y fluido incompresible, el medio de cultivo tiene unas características fisicoquímicas similares a las del agua. En ese sentido la ecuación de N-S quedaría de la siguiente forma:

$$\rho(v_x \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_x}{\partial y}) = \mu(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2}) \quad (4.14)$$

este es el balance de momento para el eje x, para el eje y se tiene que:

$$\rho(v_x \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_y}{\partial y}) = \mu(\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2}) + \frac{\partial P}{\partial y} + \rho g \quad (4.15)$$

Las condiciones iniciales y de frontera que se asumieron fueron, velocidad en las paredes del recipiente, electrodo iguales a cero, velocidad inicial en x,  $v = 0.2m/s$  este valor es resultado de transformar la velocidad angular en lineal, para este caso  $w=120rpm$ ,

velocidad inicial en y cero. El algoritmo a continuación presenta todos los detalles a considerar, así mismo los valores de viscosidad y densidad tomados aquí fueron  $\mu = 0.8^{N.s/m^2}$ ,  $\rho = 1000kg/m^3$  respectivamente fespace Xh(Th,P2); Definición de elemento finito para

las velocidades en este caso P2, es decir funciones cuadráticas continuas por tramos

fespace Mh(Th,P1); Similar al caso anterior funciones lineales

fespace Vh(Th,P1);

Vh u,v,uu,fx,gx,co;

Xh u2,v2;

Xh u1,v1;

Mh p,q;

solve Stokes (u1,u2,p,v1,v2,q,solver=Crout) = Este comando resuelve la ecuación de

Stokes

int2d(Th)( ( dx(u1)\*dx(v1) + dy(u1)\*dy(v1)

+ dx(u2)\*dx(v2) + dy(u2)\*dy(v2) )

- p\*q\*(0.000001)

- p\*dx(v1) - p\*dy(v2)

- dx(u1)\*q - dy(u2)\*q

)

+ on(2,3,u1=0,u2=0)

+ on(1,u1=0.2,u2=0); Condiciones de velocidad inicial x,y

Xh psi,phi;

solve corriente(psi,phi) = Se construyen las lineas de corriente

int2d(Th)( dx(psi)\*dx(phi) + dy(psi)\*dy(phi))

+ int2d(Th)( -phi\*(dy(u1)-dx(u2)))

+ on(2,3,4,psi=0)

+ on(1,psi=0.2);

int j=0;

real nu=1/(0.8/1000.); viscosidad cinemática

real dt=0.1;

real alpha=1/dt;

real mu = 0.0008;

Xh up1,up2;

problem NS (u1,u2,p,v1,v2,q,solver=Crout,init=j) = Crout Es una descomposición de matrices en Triangular Superior e Inferior, es decir una descomposición LU

int2d(Th)( Forma variacional de la ecuación de Navier-Stokes

alpha\*( u1\*v1 + u2\*v2)

+ nu \* ( dx(u1)\*dx(v1) + dy(u1)\*dy(v1)

+ dx(u2)\*dx(v2) + dy(u2)\*dy(v2) )

- p\*q\*(0.000001)

- p\*dx(v1) - p\*dy(v2)

```

- dx(u1)*q - dy(u2)*q
)
+ int2d(Th) ( -alpha*
convect([up1,up2],-dt,up1)*v1 -alpha*convect([up1,up2],-dt,up2)*v2 ) en esta parte se
soluciona la no linealidad asociada a la convección, con el comando convect
+ on(1,u1=0.21,u2=0)
+ on(2,3,u1=0,u2=0);
ofstream ff("navier.dat");
for (j=0;j=10;j++)

ff<<psi(0.03,0.02)<<endl;

up1=u1;

up2=u2;

NS;

if ( !(j % 10))

ff<<psi(3,0.5)<<endl;

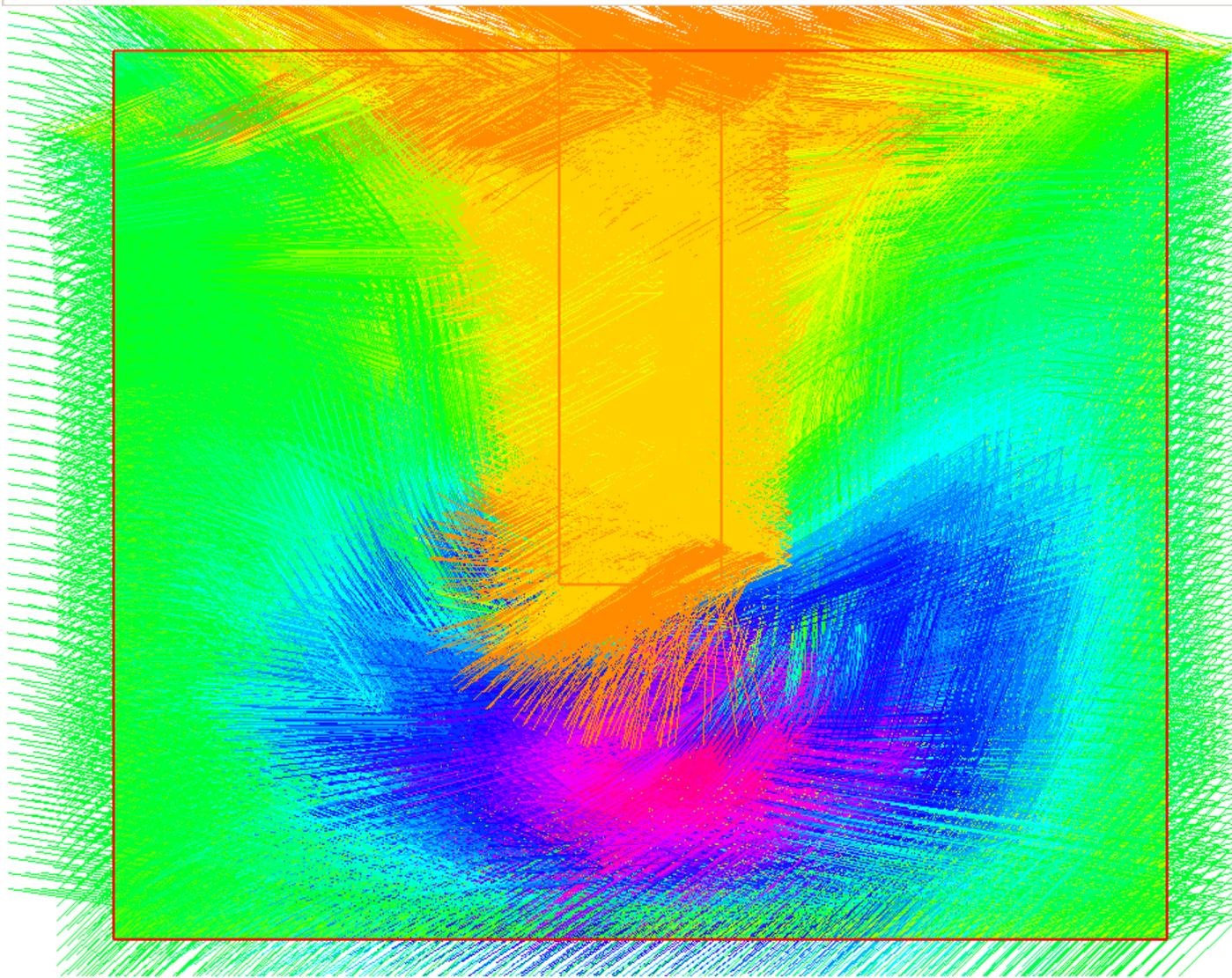
plot(coef=0.2,cmm=" [u1,u2] and p ",p,[u1,u2],value=1,fill=1,nbiso=10);

;

```

En la figura 4.14 se puede apreciar la solución del sistema planteado, es de notar

la coherencia con las condiciones de frontera planteadas, es decir velocidad cero en las paredes y el electrodo, así mismo se evidencia una amplia región donde el campo de velocidades es homogéneo (región verde), lo cual concuerda con lo esperado, la región del electrodo (amarilla y naranja) presenta un campo de velocidad bajo, esto coincide con la vorticidad en ese punto cuando se realiza la agitación orbital, mas evidencia de lo anterior se puede encontrar mas adelante, donde se resuelve este sistema en coordenadas cilíndricas por otro método.



**Figura 4.14:** Perfil de Velocidad (Gráfico de Nivel) Navier-Stokes

Otra aproximación a este problema se realizó usando scilab y encontrando un perfil de velocidad pero sin electrodo en 4.15 se puede apreciar el comportamiento parabólico de

este sistema, para lograr lo anterior se planteo el problema en coordenadas cilíndricas y posteriormente se soluciono mediante un script para scilab. La ecuación en coordenadas cilíndricas que describe este sistema es:

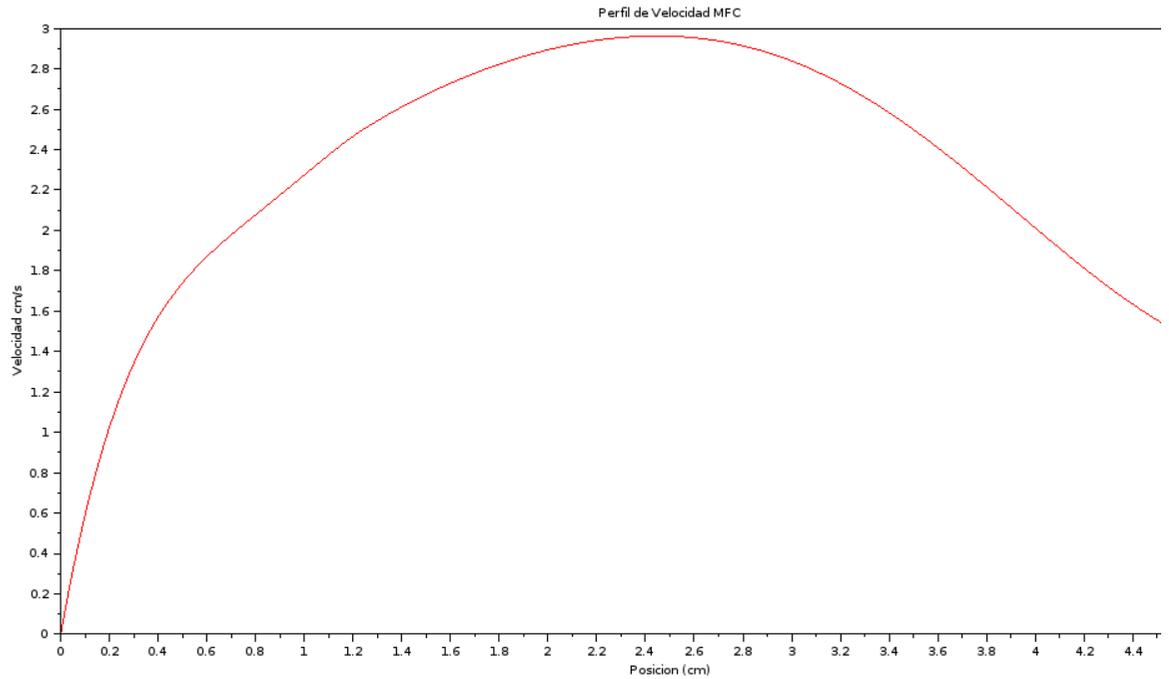
$$v_r \frac{\partial v_r}{\partial r} - \frac{u_\phi^2}{r} = \mu \frac{\partial^2 v_r}{\partial r^2} + \frac{\mu}{r} \frac{\partial v_r}{\partial r} + \mu \frac{\partial^2 v_r}{\partial r^2} - \mu \frac{v_r}{r^2} \quad (4.16)$$

con condiciones iniciales  $v(0) = 0$  y  $v'(0) = 0$

El script se señala a continuación:

```
v=1002e-3; viscosidad dinámica
uo=100*20*%pi*R/60*1e-2; Determinación de la velocidad lineal
deff('[ff] = f(r,u)', 'ff = -(uo/(v*a*r)) - ((v-r*u(1))/(v*a*r))*u(2) + (u(1)/(a*r^2))'); definición de funciones
deff('[dff] = df(r,u)', 'dff = [(r*u(2))/(v*a*r) + (1/a*r^2), (r*u(1)-v)/(v*a*r)]');
deff('[gg] = g(i,u)', '[gg]=[u(1),u(2)]', 'gg=gg(i)');
deff('[dgg] = dg(i,u)', '[dgg] = [1,0;0,1]', 'dgg=dgg(i,:)');
deff('[u0,du0] = guess(r)', '[u0= 0', 'du0 =0']'); condiciones iniciales
n=1;m=[2];fixpnt=0;rL=0;rR=R;Dr=0.01;Tamaño de paso
ipar(3)=1;ipar(4)=2;ipar(5)=10000000;ipar(6)=20000000;ipar(7)=1;ipar(1)=1;
ltol=[1,2];
tol=[0.1,0.1]; error máximo tolerado
u=bvode(r,n,m,rL,rR,zeta,ipar,ltol,tol,fixpnt,f,df,g,dg,guess); Rutina para solucionar E.D.O
```

de orden superior.



**Figura 4.15:** Perfil de Velocidad (Gráfico de Nivel) Navier-Stokes

Nuevamente se muestra que la máxima velocidad se encuentra a medio camino entre el electrodo y la pared (la coordenada  $r=0$ , comprende la superficie del electrodo), a diferencia de la simulación usando FreeFem++ que resuelve la ecuación de Navier-Stokes completamente, este modelo no tiene en cuenta todas las posibles condiciones de frontera

en el electrodo, sin embargo es un buen punto de partida para una simulación o por que no, para tomar decisiones respecto de un diseño. La intención de hallar la hidrodinámica del sistema era justificar lo planteado en el modelo termodinámico, en el cual no se tuvo en cuenta el transporte de materia hacia el electrodo, dado que se asumió, reactivo en exceso y continuo suministro de este debido a la agitación como se mostró en 4.2.3, por lo cual se procedió a analizar el acople, afinidad química, potencial.

## 4.3 Modelo Termodinámico Lineal de No equilibrio

### 4.3.1 Supuestos del modelo

- Corriente del fluido perpendicular al electrodo.
- Flujo Turbulento, en el seno del fluido.
- Concentración de sustrato en exceso.
- Región de trabajo: Interfaz electrodo-microorganismos.
- Crecimiento Microbiano en Fase Estacionaria.
- En el caso del modelo termodinámico, convección mucho mayor que difusión.
- Los efectos del transporte electrónico se omiten debido a se suponen mucho mas rápidos que la velocidad de reacción y difusión. <sup>4</sup>

---

<sup>4</sup>En el texto se demuestra en función del conjunto adimensional  $F(Re, Sc, Sh)$ , la convección es dos ordenes de magnitud mayor que la

### 4.3.2 Descripción del Modelo

Partiendo del balance de entropía descrito en el capítulo de termodinámica del no equilibrio, es decir,

$$dS = dS_e + dS_i \quad (4.17)$$

y teniendo en cuenta que  $dS_e$ ,  $dS_i$  hacen referencia al cambio de entropía asociado a los flujos y fuerzas externos e internos del electrodo microbiano respectivamente, para el caso puntual de la celda de combustible microbiana, la variación interna en la entropía está asociado a los procesos metabólicos del microorganismo, como se menciona en la metodología, se empleó *Escherichia coli*, la elección radica, en la simpleza del mantenimiento de esta cepa y en lo ampliamente estudiada, erróneamente se le menciona como un organismo simple por algunos autores, cosa alejada de la realidad ya que a la fecha y a pesar de haber sido secuenciado todo su genoma, algunas de sus funciones metabólicas, relacionadas con el transporte de electrones y el catabolismo, no se entienden bien o simplemente se desconocen, ejemplo de esto es el complejo citocromo bd-II, para el cual aun se debate su rol metabólico, así como su capacidad de generar fuerza protón motriz (PMF) [50].

Tomando como referencia el trabajo de (Kumar, et al)[37] quien plantea por ejemplo un acople entre el potencial electroquímico de catabolismo y anabolismo, no sin antes señalar que si ambos flujos fueran de magnitud similar, el sistema no estaría fuera del equilibrio

esto porque en su desarrollo los seres vivos están sometidos a continuos cambios de su entorno, desencadenando esto modificaciones a nivel genético, esto es, expresión de genes bajo presión con el fin de sobrevivir, si el equilibrio entre estos dos estados fuera perfecto, dicha presión no desencadenaría una respuesta inmediata, sino que debería dar comienzo a la elaboración de ATP, de tal forma que se puedan llevar a cabo los procesos de síntesis al interior de la célula una vez acumulada la energía necesaria, dicho margen de tiempo entre la producción de energía y la elaboración del metabolito, podría implicar la muerte del organismo, lo cual haría de este supuesto equilibrio una característica no deseada y posiblemente no heredada por la siguiente generación, de allí que se considere un ligero desacople entre estos dos potenciales en favor del catabolismo, con el fin de garantizar una reserva energética permanente, en otras palabras  $\mu_{catabolismo} \gg \mu_{anabolismo}$

Para representar las fuerzas impulsoras que permiten la reacción química, la termodinámica del no equilibrio, recurre al concepto de afinidad química que no es mas que una forma practica de representar el potencial electroquímico es decir:

$$A_i = \sum_i \vartheta \mu_i = \frac{\partial g}{\partial \xi} \quad (4.18)$$

donde  $\vartheta$  es el coeficiente estequiométrico de la  $i$ -ésima reacción y  $\xi = \frac{c(t)-c(0)}{\vartheta}$  es el avance de la reacción. Teniendo en cuenta lo anterior y partiendo de la forma local de la ecuación de Gibbs, se tiene

$$du = Tds - pdv + \sum_{\lambda} \mu_{\lambda} N_{\lambda} \quad (4.19)$$

Reemplazando en 2.10 separando el sistema entre los fenómenos de transferencia que ocurren al interior del fluido  $d_e S$  y los que transcurren en el ánodo microbiano  $d_i S$  se tiene que:

$$\frac{du_e}{dt} = -\frac{1}{\rho} \Pi : \nabla v + \sum_i A_i \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (4.20)$$

Reemplazando 4.20, 4.17 en 2.19 considerando la no existencia de fuerzas no conservativas y tomando  $F_k = m\omega^2 r$  es decir la fuerza centrífuga de agitación:

$$\frac{ds_e}{dt} = \frac{1}{T} \nabla \cdot \sum_k \mu_k j_k - \frac{1}{T} \Pi : \nabla v - \frac{1}{T} \sum_i J_i A_i \quad (4.21)$$

Esta ecuación, representa el cambio en la entropía en el fluido, en concreto, la acumulación de irreversibilidad asociada al movimiento de las partículas debido a la agitación mecánica y a la reacción química asociada a los microorganismos presentes en el fluido y que no se adhirieron al electrodo, no se incluyeron los términos asociados al gradiente de temperatura ya que las celdas se encuentran a temperatura y agitación constantes, debido a que el agitador orbital posee control de estas variables (Temperatura de trabajo 35°C +/- 1 @120rpm), por su parte la fuerza centrífuga esta asociada a la variación de la velocidad la cual al estar constante evita que este termino de generación aparezca en la ecuación, en general la divergencia del flujo de entropía solo es función del transporte debido a gradientes de potencial químico (difusión) y reacción química. La entropía asociada al calor metabólico y demás fuentes de energía térmica es cero debido al trabajo que debe efectuar el agitador elíptico para mantener los parámetros de velocidad y temperatura constantes,

dichas entradas y salidas de entropía en la celda quedan de cierta forma asimiladas por el dispositivo quien es el que acumula la irreversibilidad (compensación por trabajo). En ultima instancia el cambio en la entropía se da en este caso por acción de flujos y fuerzas exclusivamente  $\frac{ds_e}{dt} = \sigma$ , debido a que se omiten los efectos asociados a la difusión, ya que como se mostrara a continuación la advección es aproximadamente ochocientas veces superior a la difusión, para esto se empleo una correlación con el fin de determinar el numero de Sherwood a partir del Reynolds y el Schmidt, que se conoce como la ecuación de Froessling esto es  $Sh = 2 + 0.552Re^{1/2}Sc^{1/3}$  [51], se usaron los siguientes datos para el calculo mencionado:

- ★ Difusión de glucosa en *E. coli*:  $7x10^{-7} \frac{m^2}{s}$  [52]
- ★ Viscosidad del medio de cultivo:  $0.708x10^{-3} \frac{N.s}{m^2}$  [53]
- ★ Densidad del medio:  $1000 \frac{kg}{m^3}$  (se toma la del agua, el medio es esencialmente acuoso).
- ★ Diámetro característico (Diámetro del recipiente):  $5.5x10^{-2}m$
- ★ Velocidad del fluido:  $120rpm \simeq 0.31416 \frac{m}{s}$

Tomando el siguiente grupo de números adimensionales:

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} = 22189.3 \quad (4.22)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{AB}} = 1180 \quad (4.23)$$

y de 4.22, 4.23 se tiene que:

$$Sh = 2 + 0.552Re^{1/2}Sc^{1/3} = 870.8 \quad (4.24)$$

Esto es  $Sh \gg 1$ , por lo tanto se tiene un criterio solido para afirmar que en esencia la materia se transporta por advección o convección [54], mejor aun, que la convección es dos ordenes de magnitud superior a la difusión y por tal motivo se desprecia este tipo de mecanismo de transporte en el lecho del fluido, para mas detalles ver la simulación de la dinámica de fluidos para este sistema en la siguiente sección. Por lo anterior 4.21 queda de la siguiente forma:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{T}\Pi : \nabla v - \frac{1}{T} \sum_i J_i A_i \quad (4.25)$$

Continuando con el balance de energía, pero esta vez en el electrodo y teniendo en cuenta la naturaleza no conservativa de la transferencia de carga, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{\rho du_i}{dt} = -\nabla \cdot J_q - \rho p \frac{dV}{dt} - \Pi : \nabla \mathbf{v} + i \cdot (\mathbf{E} + \frac{1}{c} \mathbf{v} \times B) + \sum_i A_i \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (4.26)$$

Suponiendo que las células se encuentran adheridas a la superficie del electrodo como se menciono en el capitulo 1 mediante (fuerzas de Van der Waals inicialmente) y que no hay ningún tipo de movimiento de las mismas (estado estacionario, cuando segregan adhesinas), así mismo se considera la no presencia de campos magnéticos apreciables, es decir que el ultimo termino de la ecuación 4.26 que hace referencia a la cantidad de energía electromagnética que se transforma en energía interna solo tendrá en cuenta el aporte del

campo eléctrico  $\mathbf{E}$  por lo tanto la ecuación queda de la siguiente forma:

$$\frac{\rho du_i}{dt} = i \cdot (\mathbf{E}) + \sum_i A_i \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (4.27)$$

Tomando nuevamente a 2.19 como punto de partida se puede obtener el termino de cambio de entropía para el electrodo, en este caso,  $F_k = \nabla\phi$  es decir el gradiente de potencial eléctrico y su flujo asociado sera la corriente, en virtud del teorema de Curie, este flujo solo se puede relacionar con fuerzas de su mismo orden tensorial para este caso "uno" y asumiendo también que no existen cambios netos en la temperatura, volumen, presión y velocidad.

$$\rho \frac{ds_i}{dt} = -\frac{1}{T} \nabla \mu_i \frac{dc}{dt} + \frac{1}{T} \nabla \phi i - \frac{1}{T} \sum j_i A_i \quad (4.28)$$

Reemplazando 4.28 y 4.21 en 4.17, tenemos

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{T} \nabla \mu_i \frac{dc}{dt} + \frac{1}{T} \nabla \phi i - \frac{1}{T} \sum j_i A_i + \frac{1}{T} \nabla \cdot \sum_k \mu_k j_k - \frac{1}{T} \Pi : \nabla v - \frac{1}{T} \sum_i J_i A_i \quad (4.29)$$

Comparando esta ecuación con  $\frac{ds}{dt} = -\nabla \cdot J_s + \sigma$  se concluye que:

$$\nabla \cdot J_s = \frac{1}{T} \nabla \cdot \sum_k \mu_k j_k \quad (4.30)$$

y

$$\sigma = \frac{1}{T} \nabla \mu_i \frac{dc}{dt} + \frac{1}{T} \nabla \phi \cdot i - \frac{1}{T} \sum_j j_{e_i} A_{e_i} - \frac{1}{T} \Pi : \nabla v - \frac{1}{T} \sum_k J_{i_k} A_{i_k} \quad (4.31)$$

dato que la generación de entropía es una relación de fuerzas y flujos, es posible escribir cada uno de los últimos como combinación lineal de coeficientes fenomenológicos y fuerzas como se muestra en 2.20, es decir  $J_i = \sum_k L_{ik} F_{ik}$  y teniendo en cuenta a 4.31 entonces se

tiene el siguiente conjunto de ecuaciones que describen de forma global el comportamiento de un ánodo microbiano, acá solo se incluyen aquellos fenómenos que bajo el principio de Curie pueden acoplarse, en este sentido no se incluye el aporte del tensor de esfuerzo viscoso y se tuvieron en cuenta únicamente los campos escalares asociados.

$$j(A/m^2)T = L_{\phi\phi}\nabla\phi + L_{\phi r}A \quad (4.32)$$

$$r(mol/s)T = L_{rr}A + L_{r\phi}\nabla\phi \quad (4.33)$$

En lugar de tomar en consideración únicamente los flujos anabólicos y catabólicos como en el caso de [37] Kumar, se empleo la energía libre de reacción del sistema, esto a razón de que el modelo planteado por este autor no tiene en cuenta otros potenciales químicos externos en su desarrollo, como por ejemplo el asociado a la reacción de reducción de  $O_2$ , en tal sentido es más práctico el método planteado aquí.

Para este caso puntual, se tomara la afinidad química como  $A = \Delta G_r$ , esto es particularmente práctico dado que se conoce bastante bien la ruta metabólica empleada por *E.coli*, en este caso Glicolisis,  $\Delta G_{glicolisis} = -78.4KJ/mol$  [60], esto sería la media reacción del lado del ánodo, para el cátodo, se tiene la clásica reacción de reducción de oxígeno  $O_2 + 4H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$  con un potencial de reducción contra electrodo estándar de hidrógeno de 1.229V [61] pero si se tiene en cuenta que  $\Delta G_{reduccion} = -nFE$  entonces  $\Delta G_r = \Delta G_{Glicolisis} - \Delta G_{reduccion} = -78.4 - 1.229 * 3 * 96485.34 = -78.399996$ ; así mismo  $\nabla\phi = -E$ , asumiendo que el electrodo es una placa plana entonces el campo eléctrico se

puede calcular como  $E = \frac{\rho_s}{2\epsilon}$  apuntando a cualquier posición normal a la lamina [62] en este caso, la densidad de carga superficial  $\rho_s$  esta asociada a la cobertura de la lamina por microorganismos, si se tiene que la lamina tiene un área de  $7.82\text{cm}^2$  y una *E.coli* promedio tiene un área de  $0.2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} = 4 \times 10^{-13}\text{m}^2$  [65], asumiendo que el electrodo esta totalmente cubierto de *E.coli*, entonces el numero de total de células presente es  $N = 7.82 / (4 \times 10^{-13} * 100^2) = 1.995 \times 10^9 \text{celulas}$  .

Si se toma como ecuación empírica de *E.coli*  $CH_{1.88}N_{0.22}O_{0.5}P_{0.022}$  [63] lo que da un peso molecular de  $26\text{g/mol}$ , y teniendo en cuenta la ecuación para crecimiento de biomasa obtenida en la sección anterior es decir  $C^*(g) = (4e^{-5t^3} - 0.002t^2 + 0.0338t - 0.0374)230 \times 10^{-3}$  tomando un valor de tiempo correspondiente a estado estacionario y reemplazando en esta ultima, se tiene:  $C^*(20h) = 0.0377476\text{g}$ , con lo anterior es posible calcular la carga de cada célula así  $q = \frac{0.0377476\text{g}}{26\text{g/mol} \times 1.99 \times 10^9} \times 96485.34\text{C/mol} = 7 \times 10^{-8}\text{C/celula}$ , para poder calcular el campo eléctrico es necesario determinar la permitividad eléctrica del medio, para ello se midió la capacitancia de los dos electrodos sumergidos mediante un multimetro Fluke en la celda por triplicado obteniéndose un valor de  $C_{medio} = 21.2\mu\text{F} + / - 0.2$ , por tanto  $\epsilon = \frac{C_{medio}}{C_{vacio}} = 218556.7$  en donde la capacitancia del vacío se tomo como  $C_{vacio} = 0.0921\text{nF}$  [62], por lo anterior y reemplazando en la ecuación del campo eléctrico se tiene que este es  $E = 0.2132056\text{V/m}$ , usando Nernst para representar la energía libre de reacción se tiene entonces que,  $\Delta E_r = -78.4\text{kJ/mol}$ .

Reemplazando todo lo anterior en 4.32 y 4.33, tomando de la figura 4.13 el valor de cor-

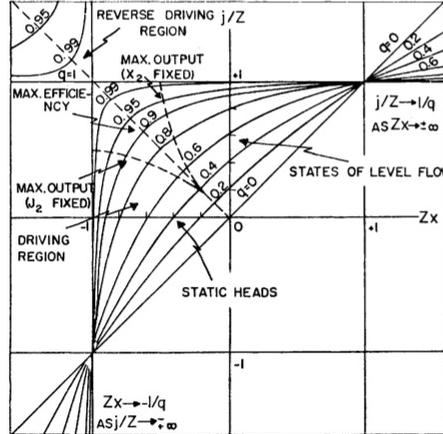


Figura 4.16: Diagrama de constantes de acoplamiento [64]

riente en estado estacionario para *E. coli* 1, es decir  $i = -0.065A/m^2$ , así mismo  $r = 0$  en este caso, resolviendo para  $L_{\phi r} = -0.24S/m^2$ , así mismo,  $L_{\phi\phi} = 0.11S./m.s$ , Teniendo en cuenta el teorema de reciprocidad de Onsager, podemos afirmar que  $L_{r\phi} = L_{\phi r}$  por tanto resolviendo para  $L_{rr} = 0.1941mol^2/s$ . Determinados los coeficientes fenomenológicos, es posible recurrir a la ecuación  $\eta = \frac{R_{\phi r}}{\sqrt{R_{rr} + R_{\phi\phi}}} = 0.37$  nos dice que tan importante es el proceso cruzado en el flujo de carga, para este caso puntual, se puede apreciar del diagrama 4.16 [64]

que este valor de acople se encuentra en la región transporte, esto indica que en lugar de la reacción química proveer electrones de manera sincronizada hacia el electrodo, esta tomando electrones libres para su proceso metabólico, quiere decir esto que el proceso en cuestión es poco eficiente para generar energía eléctrica y que la mayor parte de la energía libre se utiliza en los procesos propios de la célula.

Si se reemplaza  $L_{\phi\phi}$ ,  $L_{\phi r}$  en la ecuación 4.32, y tomando un valor de tiempo que se encuentre en la región estacionaria, para este caso  $t=20h$ , se tiene que la corriente predicha por el modelo es  $i = 0.061A/m^2$  mientras que la corriente medida de la gráfica 4.13 fue de  $0.065A/m^2$ , lo que daría una desviación respecto de lo medido de  $\%Error = \frac{|i_{medido}-i|}{i_{medido}} \times 100 = \frac{|0.065-0.061|}{0.065} \times 100 = 6.15\%$  lo que indica una buena correlación.

Realizando el mismo calculo, para el ensayo *E.coli 2* se tiene que  $i_{medido} = -0.02A/m^2$   $i_{calculado} = -0.0187958$ , dando esta vez un  $\%Error = 6\%$ , de nuevo existe una buena correlación, para el caso de los Erlenmeyer se tiene que  $I_{medido} = 0.07A/m^2$   $I_{calculado} = 0.00027$  para un  $\%Error = 99\%$ , este ultimo seria un dato escandaloso sino fuera por el grado de acople para este sistema,  $\eta = \frac{R_{\phi r}}{R_{rr}+R_{\phi\phi}} = 0.1$

lo que indica que probablemente los supuestos realizados en este caso, no se cumplen, como inicialmente se había dicho, también es factible que como lo indicaba la voltametría cíclica existe un fenómeno adicional presente (modificación de la superficie del electrodo) o simplemente no hay acople entre los dos fenómenos y la corriente medida se deba a otro proceso que nada tiene que ver con los microorganismos.

Finalmente la ecuación para la densidad de corriente queda de la siguiente forma.

$$jT(A/m^2) = 0.101\nabla\phi - 0.182\frac{\Delta G_r}{nF} \quad (4.34)$$

Este resultado, da cuenta de la importancia del fenómeno cruzado ya que es de similar magnitud al directo, por lo cual un modelo de estos sistemas deben contener en su descripción estos fenómenos.



# 5

## Conclusiones

- ♠ Desde el punto de vista teórico, queda en evidencia que en el caso de las celdas de combustible con cátodo abierto el potencial eléctrico y la reacción química están acoplados, esto se puso de manifiesto cuando a partir de un dato teórico como lo es el  $\Delta G_r$  de la glicolisis se pudo obtener valores de corriente similares a los medidos en estado estacionario, lo que coincide con la evidencia experimental, la cual sugiere que existe una relación entre la biomasa y la respuesta en potencial, si bien la simulación también arroja un perfil similar, este no coincide del todo con el comportamiento exhibido, lo que indica que el coeficiente cruzado  $L_{r\phi}$  esta ligado a lo que ocurre en este sistema y es importante en su descripción, esto indica que la difusión no es tan importante, la razón puede deberse a que la reacción química responsable del fenómeno de generación eléctrica se encuentra en las capas exter-

nas, así mismo el hecho de ser un sistema agitado y cuyas líneas de flujo están perpendiculares al electrodo, hacen que este aspecto sea de menor validez como se mostró tanto en la simulación, como en la determinación del conjunto adimensional, en ambos casos el resultado concluye que la convección es dos ordenes de magnitud superior a la difusión. A manera de especulación pudiese ser, que exista una relación entre el  $L_{r\phi}$  y la especie de microorganismo, lo cual de ser cierto, permitiría establecer un mecanismo de seguimiento a ciertas especies que pudiesen tener algún valor biotecnológico o médico, la estrategia para determinar este coeficiente ya fue presentada en este trabajo. Lo que si parece no ser especulación es el hecho de que la respuesta en voltaje es similar al perfil de crecimiento microbiano, esto fue particularmente cierto en los ensayos con los frascos Erlenmeyer, en los cuales casi que a los mismos tiempos, quizás con un ligero desfase, las diferentes etapas del crecimiento microbiano, estacionaria, lag, y exponencial quedaban registradas en la tarjeta de adquisición de datos, es decir cada una de estas etapas generaban una respuesta proporcional en el voltaje medido. Queda para un futuro trabajo, encontrar la relación voltaje/biomasa con el fin de establecer una nueva técnica encaminada a desplazar la engorrosa curva de peso seco y que al mismo tiempo permita realizar un seguimiento en tiempo real de esta variable en por ejemplo un bioreactor.

♠ En cuanto a la parte experimental, este trabajo permitió determinar el número de electrones transferidos empleando un electrodo de disco rotatorio ( $n= 3$ ), el valor

de esto, se fundamenta en que este es uno de los pocos trabajos en este campo y que demuestra la necesidad de explorar ampliamente las técnicas electroquímicas en sistemas biológicos en las cuales hasta ahora no hay una incursión de lleno, por parte de los investigadores en biotecnología, esto es particularmente cierto en el caso de la Universidad Nacional sede Medellín. Quizás este trabajo pueda servir de semilla para abordar problemas biológicos desde una perspectiva diferente. Este resultado permitirá a otros investigadores, sugerir un mecanismo de reacción, que explique las razones de este valor. La mayoría de modelos de celdas de combustible actuales, se describen mediante la transferencia de 2 o 4 electrones dependiendo del organismo, sin embargo el fundamento de esto no es experimental, sino basado en la interpretación de algunas rutas metabólicas, lo cual puede ser erróneo si se tiene en cuenta que en ocasiones no se conoce la función de ciertas enzimas.

- ♠ Respecto de la simulación, fue interesante explorar las bondades que ofrece un paquete de software poco conocido en el medio como FreeFem++, el cual permitió desarrollar un modelo para describir el gradiente de concentración en un reactor Batch como es el caso de la MFC, esta herramienta y los algoritmos aquí planteados pueden extrapolarse a otro tipo de montajes y reactores biotecnológicos pudiendo en un futuro crearse una caja de herramientas destinada al diseño de estos dispositivos, lo cual daría herramientas de peso para la elección de materiales y reactivos previo al abordaje de un proyecto. Mucho trabajo y dinero se hubiese ahorrado si

desde el principio se hubiera contado con esta herramienta previo a la convocatoria EPM-CIEN de la cual este trabajo fue el fundamento y soporte para ganarla. Los resultados de la simulación, arrojaron algo similar al modelo termodinámico, sin embargo, en este caso se tuvo en cuenta la difusión del azúcar en la película del electrodo microbiano esto represento una desviación mayor respecto del valor obtenido experimentalmente, permitiendo concluir, que la suposición inicial acerca de la magnitud de la convección respecto del fenómeno difusivo es correcta en las condiciones del experimento. Es decir, aparentemente, la reacción química y el posterior transporte de electrones, se lleva a cabo en la superficie externa de los microorganismos y es precisamente la velocidad de reacción el factor controlante dado que el modelo no da cuenta del transporte electrónico y sin embargo este no parece ser importante la hora de describir el sistema, lo que permite inferir que los supuestos del modelo son coherentes.

# 6

## Recomendaciones

- Para futuros trabajos en este campo se recomienda, profundizar en el fenómeno de transferencia de electrones, si bien el modelo aquí presentado, se ajusta bastante bien a los valores obtenidos experimentalmente, no da una explicación profunda de este fenómeno, así mismo el método para obtener la permitividad, debe ajustarse, para explicar todos los fenómenos involucrados en la capa doble eléctrica, lo cual puede lograrse mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.
- Para un modelo mas realista de celda, es necesario contemplar la posibilidad de una alimentación externa, con el fin de mantener el dispositivo en zona exponencial, maximizando de esta forma la densidad de potencia entregada.
- En este caso, al tratarse de un primer acercamiento a la tecnología de celdas de combustible microbianas, se empleo una cepa bacteriana cuyo metabolismo fuera

ampliamente estudiado con el fin de simplificar el trabajo. Sin embargo, es necesario explorar otras opciones que permitan mejorar aun mas el rendimiento estos dispositivos, se recomienda el empleo de bacterias del genero *Clostridium* spp y en el caso de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas, probar con bacterias del genero *Pseudomonas* spp, cuyo potencial bioremediador, esta ampliamente documentado.

# ANEXO I

## Protocolo de DNS

### DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES POR ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO (DNS), MÉTODO COLORIMETRICO (Miller, 1959)

#### Reactivos:

- ★ Solución de DNS, 1%
- ★ Solución de tartrato de sodio y potasio, 40% (p/v): 40 g en 1L de agua destilada, esta solución estabiliza el color, también se le conoce como sal de Rochelle.
- ★ Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), 1g
- ★ Fenol: 2 g <sup>1</sup>
- ★ Sulfito de sodio: 0.05 g

---

<sup>1</sup>Nota: El fenol es opcional solamente produce un efecto en la absorbancia, para casos en los que la concentración de azúcares reductores es baja.

★ Hidróxido de sodio: 1 g

★ Llevar a 1 litro de agua destilada

2

★ Solución de tartrato de sodio y potasio, 40% (p/v): 40 g en 1L de agua destilada, esta solución estabiliza el color, también se le conoce como sal de Rochelle.

### **Procedimiento:**

★ Mezclar:

▷ 3 mL de la muestra a analizar

▷ 3 mL del reactivo de DNS

★ Calentar la mezcla a 90°C por 5 a 15 minutos para desarrollar el color rojo-café

★ Agregar en caliente 1mL de la solución de tartrato de sodio y potasio al 40% p/v

★ Enfriar en baño de hielo hasta temperatura ambiente

★ Medir la absorbancia a 575 nm.

**Curva de calibración** Preparar soluciones patrones de glucosa de 0.125, 0.150, 0.20, 0.30, 0.35 mg/mL, a partir de una solución de 0.35 mg/mL, mediante dilución. Posteri-

---

<sup>2</sup>Recomendación: disolver primero el hidróxido de sodio ya que el DNS disuelve mejor en medio ácido.

ormente comparar la muestra problema con la curva de calibración, para determinar la concentración de la muestra problema. [42]



# ANEXO II

## 6.1 SCRIPTS EN SCILAB

El primer script es para capturar el archivo .csv entregado por la tarjeta de adquisición de datos, mientras que el segundo, se encarga de la depuración de esta matriz.

### 6.1.0.1 Captura de archivos .csv

```
Jeva 2.718281828459
```

```
clear;
```

```
clc;
```

```
count=0;
```

```
M1=csvRead("a1.csv");
```

```
M2=csvRead("a2.csv");
```

```
M3=csvRead("a3.csv");
```

```
M2(:,1)=M2(:,1)+M1(rows1,1);
```

```
M3(:,1)=M3(:,1)+M2(rows2,1);
```

```
    for z=1:3
```

```
select z
```

```
case 1 then
```

```
aux=rows1;
```

```
    case 2 then
```

```
aux=rows2;
```

```
count=count+rows1;
```

```
    else
```

```
aux=rows3;
```

```
count=count+rows2;
```

```
end
```

```
for i=1:aux
```

```
    for j=1:col3 //col1
```

```
if z==1 then
```

```
    M11(i,j)=M1(i,j);
```

```
elseif z==2
```

```
    M11(i+rows1,j)=M2(i,j);
```

```
elseif z==3
```

```
    M11(i+count,j)=M3(i,j);
```

```
end
```

```
end
```

```
end
```

```
end
```

```
M11(:,1)=M11(:,1)/3600;//Cambio de unidades de tiempo a Horas
```

**6.1.0.2 Depuración de Matriz**

```
function N=lea()

clc;

clear;

e=1;

//M6=csvRead("aguas11.csv");

[rows, cols] = size(M11);

for j=1:cols

for i=1:400:rows

e=e+1;

N(e,j)=M11(i,j);

end

e=0;

end beep

endfunction

// 1017148632
```

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] CAPÓ MARTÍ, M. Principios de Ecotoxicología. Editorial Tebar. 2007. [113-123]
  
- [2] Du Z, Haoran L, Tingyue G. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* 25: 464-482(2007)
  
- [3] Logan B, Hamelers B, Rozendal R, Schroder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K. *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*. *Environ. Sci. & Technol.* Publicada en Web 07/14/2006
  
- [4] Silva C, Joana Silva C, Zille A, Guebitz G, Cavaco-Paulo A. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. *Ezyme and Microbial Technology* 41: 867-875(2007)
  
- [5] Bruce E. Logan. *Microbial Fuel Cells*. Editorial WILEY-INTERSCIENCE. 2008

- [6] Liu H, Ramnarayanan R, Logan B. Production of electricity during a wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. & Technol* 38: 2281-2285(2004).
- [7] Cohn, E; Stumpf, G; Bruening, G; DOI, R. *Bioquímica Fundamental*. Ed, Limusa Wiley. 2006. Cap14.
- [8] T. Zhang et al. / *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 293–297
- [9] Reguera et al. 2006. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7345-8
- [10] Bond , D.R, Holmes, D.E, Tender, L.M, Lovley, D.R. Electrode reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295(5554), 483-485.
- [11] Park, D.H, Kim, S.K, Shin, I.H, Jeong, Y.J. Electricity production in biofuelcell using modified graphite electrodes with neutral red. *Biotechnol. Lett* 22,1301-1304 (2002)
- [12] Rabaey, K, Boon, N, Hofte, M, Verstraete, W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 39(9), 3401-3408 (2008).

- [13] Ntarlagiannis, D., E. A. Atekwana, E. A. Hill, and Y. Gorby (2007), Microbial nanowires: Is the subsurface “hardwired”? *Geophys. Res. Lett.*, 34, L17305, doi:10.1029/2007GL030426
- [14] Mohamed Y. El-Naggar,\* Yuri A. Gorby, y Wei Xia, z and Kenneth H. Nealson. The Molecular Density of States in Bacterial Nanowires. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*. 2008
- [15] Madigan, M, Martinko, J, Stahl, D, Clark, D. Brock *Biología De Los Microorganismos* 13th Edición. Ed, Pearson. 2010
- [16] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2ª Edición. Ed, Wiley. 2001
- [17] “Técnicas de Tinción” [En Línea]  
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>
- [18] Dávila, G, Vásquez-Duhalt, R. *Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para fines ambientales*. Mensaje Bioquímico, Vol XXX. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2006).
- [19] Mansilla, H, Lizama, C, Gutarra, A, Rodríguez, J. *Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil*. CYTED, Editado por Miguel. A. Blesa, Mar del Plata, Argentina, (2001). <http://www.cnea.gob.ar/cyted/default>

- [20] J. Rubio Retamaa, D. Mecerreyesb, B. Lopez-Ruizc, E. Lopez-Cabarcosd. Synthesis and characterization of semiconducting polypyrrole/polyacrylamide microparticles with GOx for biosensor applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Volumes 270–271, 2005, P 239–244.
- [21] Laura Schick Zapanta, Ming Tien. The Roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *Journal of Biotechnology*. Volume 53, 14 March 1997, P 93–102
- [22] Hammel, KE, Tien, M, Kalyanaraman, B, Kirk, TK. Mechanisms of Oxidative C  $\alpha$ -C  $\beta$  . Cleavage of a Lignin Model Dimer by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase. *J. Biol. Chem.* 1985. 260(14).P 8348-8353.
- [23] J. Wimpenny. An overview of biofilms as functional communities. *Community structure and co- operation in biofilms, fifty-ninth symposium of the society for general microbiology held at the university of exeter september 2000*. Cambridge university press. (1-25)p
- [24] S.P. Denyer, S.P. Gorman, M. Sussman. *Microbial biofilms : formation and control*. Oxford ; Boston : Blackwell Scientific Publication, 1993.
- [25] Handley HH, Yu J, Yu DTY, Singh B, Gupta RS, Vaughan JH (1996). Autoantibodies to human heat shock protein (Hsp) 60 may be induced by *Escherichia coli* GroEL. *Clin Exp Immunol* 103:429–435.
- [26] Water Enviromental Federation. *Biofilm Reactors*. McGraw Hill. Capitulo 2 (2011).

- [27] Silvia Márquez, Lionel Valenzuela Pérez, Gladys Gálvez, Luis A. Fernández, Cecilia Bocchino. "INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA CÉLULA". [En línea] <http://genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>
- [28] Rabaey, K; Angenet, L; Schroder, U; Keller, J. Bioelectrochemical Systems: from extracellular electron transfer to biotechnological application. Iwa Publishing, 2010.
- [29] Jou, D; Casas-Vazquez, J; Lebon, G. Extended Irreversible Thermodynamics. Springer, 4th Edition, 2010.
- [30] Ottinger, HC. Beyond Equilibrium Thermodynamics. Ed, Wiley-Interscience, 2005.
- [31] S.R de Groot; P. Mazur. Non-Equilibrium Thermodynamics. Dover Publications, INC, 1984.
- [32] Onsager, L. Reciprocal Relations In Irreversible Process. Physical Review, Vol 38, 1931.
- [33] S, Kjelstrup; D, Bedeaux. Elements of Irreversible Thermodynamics. International Centre For Applied Thermodynamics. 2001.
- [34] K, Kontturi; L, Murtomaki; J, Manzanares. Ionic Transport Processes in Electrochemistry and Membrane Science. Oxford University Press. 2008.

- [35] J. Xu; S. Kjelstrup; D. Bedeaux; A. Røsjorde; L. Rekvig. Verification of Onsager's reciprocal relations for evaporation and condensation using non-equilibrium molecular dynamics. *Journal of Colloid and Interface Science* 299 (2006) 452–463
- [36] D, Wong. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* (2009) 157:174-209
- [37] H, Cheng; M, Kumar; J, Lin. Development of Linear Irreversible Thermodynamic Model for Oxidation Reduction Potential in Environmental Microbial System. *Biophysical Journal* Volume 93, August 2007 787–794
- [38] P, Mitchell. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191 (4784): 144–148 (1961)
- [39] E, Itagaki; LP, Hager. Studies on cytochrome b-562 of *Escherichia coli*. I. Purification and crystallization of cytochrome b-562. *J Biol Chem*. 1966 Aug 25;241(16):3687–3695.
- [40] F, Mathews; P, Bethge; E, Czerwinski. The structure of cytochrome b562 from *Escherichia coli* at 2.5 Å resolution. *J Biol. Chem*. 1979, 254:1699-1706.
- [41] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (2005) *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, 21st ed.; Washington, DC

- [42] G.L, Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426, 1959.
- [43] W, Deen. *Analysis of Transport Phenomena*. Oxford University Press, USA; 2 edition (October 21, 2011).
- [44] I, Prigogine. *Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes*. Wiley; 3rd edition (January 15, 1968).
- [45] E.M . Galimov. Phenomenon of Life: Between Equilibrium and non-linearity. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 34:599–613, 2004
- [46] D, Miller. Duhem and the Gibbs-Duhem Equation. *J. of Chemical Education.*, 1963, 40 (12), p 648
- [47] I, Prigogine. *El fin de las certidumbres*. Ed, Andres Bello. 1996
- [48] R.B, Bird, W. E. Stewart, E. N. Lightfoot. *Transport Phenomena* , Wiley, (1960, 2nd ed. 2002).
- [49] C.S, Helrich. *Modern Thermodynamics with Statistical Mechanics*. Springer. Cap 11. 2009.
- [50] Borisov VB, Murali R, Verkhovskaya ML, Bloch DA, Han H, Gennis RB, Verkhovsky MI (2011). Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(42);17320-4. PMID: 21987791

- [51] A.H.P, Skelland, DIFFUSIONAL MASS TRANSFER, John Wiley & Sons, New York, pp. 273-284. 1974.
- [52] R. Hober. Physical Chemistry of cells and tissues. Chruchill, london. 1967
- [53] METCALF & EDDY, INC. Ingeniería de aguas residuales. Mc Graw Hill. 3<sup>a</sup> Edición (1995)
- [54] H. S, Fogler. Elements of chemical reaction engineering. prentice-hall, englewood cliffs, New Jersey, 1986,
- [55] P, Doran. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press Limited, Londres. 1995
- [56] V.B. Oliveira; M. Simões; L.F. Melo; A.M.F.R. Pinto. Overview on the developments of microbial fuel cells. Biochemical Engineering Journal 73 (2013) 53–64
- [57] <http://www.scilab.org/>
- [58] D. Lovley. Electromicrobiology. Annual Review of Microbiology Vol. 66: 391-409 (Volume publication date October 2012)
- [59] M. Okochi; T. Matsunaga. Electrochemical sterilization of bacteria using a graphite electrode modified with adsorbed ferrocene. Iecrochimica Am, Vol. 42. Nos 2g-22, pp. 3247-3250. 1997.
- [60] E.A. Newsholme; C. Start. Regulation in Metabolism. Wiley, p 97 (1973).

- [61] P. Atkins. Physical Chemistry, 6th edition (W.H. Freeman and Company, New York). (1997)
- [62] M. Sadiku. Elementos de Electromagnetismo. Oxford University Press. 2010 Cap 4.
- [63] G. Stephanopoulos; A. Aristidou; J. Nielsen. Metabolic Engineering. Academic Press. Cap 2. 1998.
- [64] O. Kedem; S.R. Kaplan. Degree of Coupling and its Relation to Efficiency of Energy Conversion. Polymer Dept., Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel  
Received 12th February, 1965.
- [65] B. Volkmer; M. Heinemann. Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of Escherichia coli to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling. Plos One. (<http://www.plosone.org/article/info%253Adoi%252F10.1371%252Fjournal.pone.0023126>)  
Published: July 29, 2011
- [66] F. Hecht. FreeFem++. Laboratoire Jacques-Louis Lions, Université Pierre et Marie Curie, Paris. Third Edition, Version 3.25