

Evaluation of the Electrogenic Potential of Coastal Sediments of La Azufrada Beach, Gorgona Island

Alexander Mora Collazos

Universidad del Valle

Received: October 14, 2016

Enrique Bravo Montaña

Universidad del Valle

Accepted: August 17, 2017

Pag. 11-20

Abstract

The present exploratory work evaluated the electrogenic response of shore sediments collected on La Azufrada Beach in Gorgona Island. It was compared with the electrogenic response of mud and water from the micro-station lake of the Department of Biology of the Meléndez University of Valle Campus. The substrates were evaluated in Microbial fuel cells (MFC) through power density curves. The environmental substrates were used as inoculated and only energetic substrate. Scanning electron microscope was performed on the anodes of the MFC at the end of the trials. Values of maximum power density of 3.1 mW/m² were reported on the 19th day of operation for the case of the MFC feed with lake sediments and a maximum power density of 0.67 mW/m² was reported on the 15th day for the case of marine sediments. Electron microscopic observations showed differences in the formation of incipient bio-film. The results suggested that the collected marine sediments present electrogenic activity which opens the possibility to perform studies on the electrogenic bacterial populations and the applications the MFC could have in those environments.

Keywords: marine sediments, electro-chemical performance, micro-biotic fuel cells.

Evaluación del potencial electrogénico de sedimentos costeros de la playa La Azufrada, isla Gorgona

Resumen

El presente trabajo exploratorio, evaluó la respuesta electrogénica de sedimentos costeros colectados en la Playa La Azufrada en la Isla Gorgona; se comparó con la respuesta electrogénica de lodos y aguas provenientes del lago de la microestación del Departamento de Biología del Campus Universitario Meléndez de la Universidad del Valle. Los sustratos fueron evaluados en celdas de combustible microbianas (MFC por su nombre en inglés) mediante curvas de densidad de potencia. Los sustratos ambientales fueron utilizados como inóculo y único sustrato energético. Al finalizar los ensayos, se realizó microscopía electrónica a los ánodos de las MFC. Se reportaron valores de densidad de potencia máximas de 3.1 mW/m² en el día 19 de operación para el caso de las MFC alimentadas con sedimentos de lago y de 0.67 mW/m² en el día 15 para el caso de los sedimentos marinos. Las observaciones mediante microscopía electrónica muestran diferencias en la formación de la biopelícula de los dos ambientes. Los ánodos de las MFC alimentadas con sedimentos marinos mostraron una formación de biopelícula insipiente. Los ensayos demuestran que los sedimentos marinos colectados presentan actividad electrogénica, lo cual abre la posibilidad de realizar estudios sobre las poblaciones bacterianas electrogénicas y las aplicaciones que puedan tener las MFC en estos ambientes.

Palabras clave: sedimentos marinos, desempeño electroquímico, celdas de combustible microbianas.

Doi: <http://dx.doi.org/10.25100/rc.v21i1.6341>

1 Introducción

Uno de los desafíos más grandes que se enfrenta la ciencia en la actualidad, es la necesidad de remplazar los combustibles fósiles y fuentes de energía con impactos negativos, por fuentes de energía alternativas y amigables con el medio ambiente. Es así como las celdas de combustible microbianas (MFC), se muestran como una alternativa que a largo plazo contribuiría a mitigar el impacto ambiental ⁽¹⁾, las cuales operarían utilizando el metabolismo microbiano para degradar sustratos energéticos complejos provenientes de fuentes naturales tales como lagos ⁽²⁾, sedimentos marinos ^(3,4), efluentes provenientes de aguas residuales domésticas ^(5,6) e industriales ⁽⁷⁾.

Las MFC son dispositivos que utilizan microorganismos para convertir la energía química almacenada en los sustratos energéticos en electricidad ⁽⁸⁾. Una MFC está formada por una o dos cámaras con sus respectivos electrodos (ánodo y cátodo); en el ánodo, se depositan microorganismos que van a oxidar catalíticamente los sustratos orgánicos que allí se encuentren, generando electrones, protones y CO₂. Los electrones producidos son colectados por el ánodo y llevados hasta el cátodo a través de un circuito externo, donde participan de la reducción del oxígeno junto a los protones liberados, para formar agua ⁽⁹⁾.

En los últimos años se han registrado MFC alimentadas con sustratos marinos que muestran densidades de potencia continua entre 1- 10 mW/m² obteniéndose picos máximos que oscilan entre 10-30 mW/m² en una gran variedad de ambientes marinos ^(4, 10-13). No obstante, MFC construidos en ambientes bentónicos, desarrolladas en aguas frías abundantes en metano o cerca de fuentes hidrotermales marinas han mostrado picos de actividad máxima que oscilan entre 380-500 mW/m² ^(12, 14, 15).

Las MFC han sido utilizadas principalmente como dispositivos de producción de energía eléctrica de muy baja potencia, como modelos de biorremediación al aprovechar las complejas interacciones microbianas llevadas a cabo en la biopelícula anódica y recientemente ha crecido el interés en utilizarlos como transductores acoplados sistemas analíticos, como es el caso de los sensores. Este trabajo pretende caracterizar por primera vez sedimentos costeros de las playas de la Isla Gorgona buscando ampliar las posibilidades para futuros estudios y aplicaciones.

2 Materiales y métodos

Se colectaron sedimentos marinos provenientes de la Playa la Azufrada en la Isla Gorgona a una profundidad entre 40-50 cm. Utilizando recipientes previamente esterilizados se colectaron las muestras de sedimentos. Los recipientes se abrieron al momento de la colecta y fueron cerrados antes de ser retirados del agua, posteriormente fueron sellados y almacenados para su transporte al laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Valle.

2.1 Evaluación de la actividad electrogénica de los sustratos ambientales

Se construyeron MFC de una cámara con un volumen de 500 mL. Los electrodos se construyeron utilizando piezas cilíndricas de grafito con un área superficial de 11.31 cm². El ánodo se construyó con tres piezas de grafito. Para el caso del cátodo, se utilizó

una pieza de grafito recubierta con catalizador de platino-carbono con una carga de $0,1\text{mg/cm}^2$ preparada en una solución de Nafion al 5 %. El monitoreo de los parámetros electroquímicos se llevó a cabo mediante colecta de voltaje y corriente a través del tiempo y curvas de potencial de celda Vs. densidad de corriente. Los valores de potencial y corriente se registraron usando multímetros digitales (EXTECH modelo EX542). La densidad de potencia fue normalizada con respecto al área geométrica del ánodo.

2.2 Aislamiento de los microorganismos cultivables

Finalizadas las mediciones de potencial electroquímico, se realizó el cultivo y aislamiento de bacterias provenientes de la biopelícula formada sobre el ánodo de las MFC que fueron alimentadas con sedimentos marinos. Los ánodos fueron lavados con agua destilada estéril y se raspó la superficie de éstos con un escarpelo estéril, el raspado se utilizó para inocular medio líquido que contenía peptona 0.5 % (p/v) y extracto de levadura 0.1 % (p/v). Para la preparación de este medio se utilizó agua de mar sintética fabricada con base en las siguientes sales: NaCl (24.54 g/L), Na_2SO_4 (4.09 g/L), KCl (0.7 g/L), NaHCO_3 (0.2 g/L), KBr (0.1 g/L), H_3BO_3 (0.003 g/L), NaF (0.003 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (11.1 g/L) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g/L) y $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.017 g/L); la salinidad del medio fue ajustada a 26 ppm (partes por mil). La muestra de la biopelícula fue incubado a 30°C durante 24 horas, posteriormente se realizaron diluciones y siembras en superficie en placas solidificadas con agar-agar, conservando los componente del medio líquido. Se seleccionaron los microorganismos con características distintivas, los cuales fueron caracterizados mediante observaciones macroscópicas y por microscopía óptica.

2.3 Observación de las biopelículas anódicas mediante microscopía electrónica de barrido

Se retiró un fragmento de cada electrodo, los cuales fueron sumergidos en una solución de glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.2 durante 12 h a 4°C , con el objetivo de fijar la biopelícula. Las muestras fijadas fueron lavadas dos veces en amortiguador fosfato. Posteriormente, fueron deshidratadas, sumergiendo e incubando la muestra a 4°C durante 10 min en concentraciones crecientes de etanol entre 30.0 % y 99.8 %. Las muestras deshidratadas se secaron inmediatamente, agregando hexametildisiloxano (HMDS) y se recubrieron con una fina película de oro, para su inmediata observación.

3 Resultados y discusión

3.1 Desempeño electroquímico de los sustratos ambientales

En la Figura 1 se muestran las densidades de potencia generadas por las MFC en función del tiempo. En el caso de la MFC alimentadas con aguas y sedimentos de lago, se registró el mayor valor de densidad de potencia el día 19 con un valor de 3.1 mW/m^2 ; en el caso de la MFC alimentada con sedimentos marinos, registró un valor máximo de 0.67 mW/m^2 en el día 15. Posterior a estos, los valores tendieron a estabilizarse en ambos dispositivos. Los dispositivos pudieron mostrar actividad electrogénica utilizando la muestra ambiental como único sustrato energético.

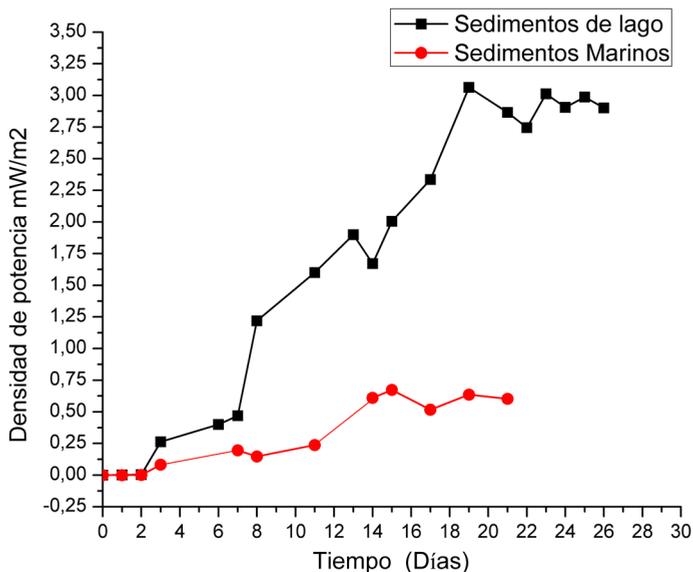


Figura 1. Densidad de potencia de los sustratos ambientales

Los valores de densidad de potencia de la MFC alimentada con sustratos provenientes del lago mostraron valores 4.6 veces más elevados que la MFC alimentada con sustratos marinos. Esta diferencia en la densidad de potencia coincide con lo registrado por otros autores, donde los valores de densidad de potencia máximos para sedimentos marinos oscilan entre 28 mW/m^2 ⁽¹¹⁾ y 32 mW/m^2 ⁽⁴⁾. En contraste, los sedimentos y aguas continentales como lagos muestran valores muy superiores, como 294 mW/m^2 ⁽¹⁶⁾, y aguas residuales con 210 mW/m^2 ⁽¹⁷⁾, los cuales son bastante elevados en comparación con las densidades de potencia encontradas en los sedimentos marinos. Quan *et al.* ⁽¹⁸⁾, consiguieron incrementar la densidad de potencia generada por MFC alimentadas con sedimento marinos a 180 mW/m^2 al enriquecer el dispositivo con sustratos energéticos con fuentes de carbono, indicando que la disponibilidad de sustratos energéticos en los sedimentos marinos representa un factor que limita el desempeño electroquímico del dispositivo.

Aunque los valores registrados en este estudio son bajos, se puede identificar que los sustratos colectados en la Playa La Azufrada de la Isla Gorgona presentan actividad electrogénica. Los bajos valores de densidad de potencia pueden corresponder al diseño de la MFC que solo contaba con una área anódica de 33.9 cm^2 , que a su vez limita el área de la biopelícula y por ende la cantidad de electrones involucrados en la producción de energía ⁽³⁾.

3.2 Biopelículas anódicas

La Figura 2 muestra las diferencias en la estructura y composición de las biopelículas formadas sobre los electrodos. La MFC alimentada con sustratos provenientes del lago muestra la formación de una compleja biopelícula sobre el electrodo. En contraste, la biopelícula formada sobre el ánodo de la MCF alimentada con sedimentos marinos muestra un desarrollo significativamente menor.

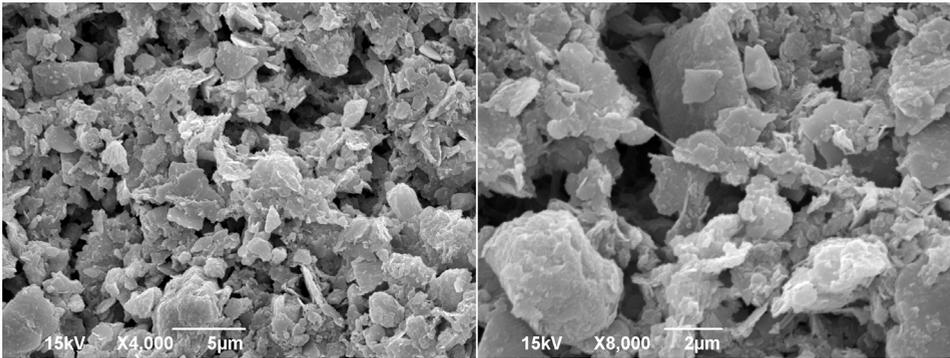


Figura 2. Microscopía electrónica a los ánodos de las MFC. A) Biopelícula anódica formada sobre los ánodos de MFC alimentada con sedimentos marinos. B) Biopelícula anódica formada sobre los ánodos de MFC alimentada con sedimentos del lago de la microestación de la Universidad del Valle.

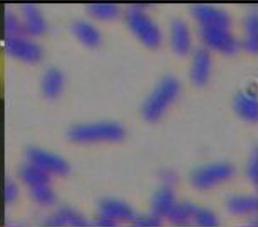
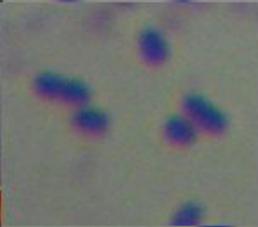
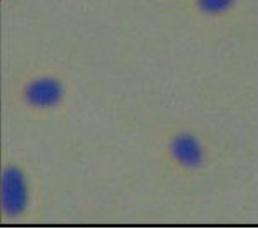
La estabilización de los valores de desempeño electroquímico registrados en las MFC puede ser un indicativo de la conformación de la biopelícula anódica ⁽¹⁹⁾; sin embargo, en la Figura 2 se observa una diferencia notoria en la composición de las biopelículas, donde el desarrollo de la biopelícula anódica de la MFC alimentada con sedimentos marinos muestra un crecimiento y desarrollo menor que la alimentada con sedimentos del lago. Erable *et al.* ⁽²⁰⁾, indican que biopelículas anódicas formadas con sedimentos marinos, en los primeros 20 días de operación muestran células o grupos de células aislados sobre los electrodos y después de 35 días de operación se puede observar una biopelícula compleja.

Biopelículas asociadas a los electrodos de las MFC pueden limitar la producción de energía ⁽³⁾ o actuar como agentes catalizadores en la producción de energía y en la biodegradación de compuestos ⁽²¹⁾. Conocer las dinámicas de las biopelícula así como la búsqueda de microorganismos eficientes son aspectos clave sobre la biología de las MFC; aspectos que contribuirían a mejorar el desempeño de los dispositivos.

3.3 Microorganismos aislados

Se aislaron cuatro microorganismos provenientes de la biopelícula anódica de la MFC alimentada con sedimentos marinos que presentaban características morfológicas distintivas. En la Tabla 1 se muestra la caracterización morfológica realizada a los microorganismos, incluyendo la descripción del microorganismo, su crecimiento en 48 horas en placas sólidas y observaciones mediante microscopía óptica. La valoración de la ultra estructura química de la pared celular se realizó mediante tinción de GRAM y prueba de KOH.

Tabla 1. Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de la biopelícula formada sobre los ánodos de las MFC alimentados con sedimentos marinos.

Nombre	Descripción	Vista macroscópica y microscópica	
		Macroscópica	Microscópica (1000X)
M1	Bacilo Gram (-). Colonia circular de borde entero; coloración amarillo crema en el centro y un poco más clara en los borde; elevación convexa; textura lisa; apariencia mucoide; brillante no translúcida.		
M2	Bacilo Gram (-). Colonia circular de borde; coloración amarillo quemado; centro elevado donde salen líneas que se extienden hasta los bordes; colonia seca brillante no translúcida		
M3	Cocobacilo Gram (-). Colonia circular de borde entero; coloración roja con centro claro; elevación plana; colonia seca brillante no translúcida		
M4	Coco Gram(-). Colonia circular de borde entero, de color blanco brillante; elevación convexa; textura lisa; apariencia mucoide.		

Microorganismos pertenecientes a los grupos de *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli* y *Chroobacteria*, entre otros, han sido encontrados en biopelículas formadas sobre los electrodos de MFC alimentadas con sedimentos marinos ^(19, 22), indicando que en ambientes marinos existe una amplia diversidad de microorganismos capaces de formar biopelículas sobre los electrodos de las MFC ⁽²³⁾.

3.4 Perspectivas sobre esta biotecnología

Se ha demostrado que las MFC operadas en ambientes naturales tienen la capacidad de proveer energía de forma constante durante largos periodos de tiempo, como lo demuestran Reimers *et al.* ⁽¹⁰⁾, quienes construyeron un dispositivo que mostró una densidad de potencia de 10 mW/m² durante 240 días y, más adelante, lograron obtener

un dispositivo que operó a 34 mW/m² durante 125 días ⁽²⁴⁾. Las celdas de combustible microbianas operadas de forma *in-situ* son consideradas como una alternativa de energía renovable; aunque a la fecha no proveen la energía suficiente para operar grandes dispositivos, sin embargo, se considera promisorio para el monitoreo ambiental en lugares apartados, al utilizar el dispositivo para proveer de energía a sensores y dispositivos de medición ⁽²⁵⁾.

Tender *et al.* ⁽¹³⁾, construyeron una MFC acoplada a un sistema de almacenamiento de energía y éste a su vez a una boya meteorológica, la cual es un dispositivo que incorpora sistemas de adquisición de datos meteorológicos y oceanográficos. El sistema operó con una MFC con densidad de potencia entre 9-20 mW/m², la cual permitió el funcionamiento del sensor incorporado, demostrando que incluso a las bajas potencias generadas es posible acoplar sistemas funcionales a las MFC. Las MFC se consideran como una tecnología emergente, con la capacidad de proveer energía de baja potencia por largos periodos de operación ininterrumpidamente, con costos bajos ⁽¹³⁾. El potencial de esta tecnología está en crecimiento, su potencial de aplicación y complejidad dependerá del desempeño electroquímico logrado por las MFC, aun así esta biotecnología se muestra como promisorio para la construcción de sensores en lugares remotos ⁽²⁵⁾.

Independiente del desempeño electroquímico que muestren las MFC, se consideran una herramienta valiosa como apoyo a estudios de diversidad microbiana y sistemas con complejas agrupaciones microbianas útiles en procesos de biorremediación.

4 Conclusiones

Los datos de desempeño electroquímico (Figura 1), la conformación de una biopelícula (Figura 2) y la posibilidad de aislar microorganismos (Tabla 1) a partir de los ánodos del dispositivo, indicarían que los sedimentos evaluados presentan una importante e inexplorada comunidad microbiana con la capacidad de no solo formar biopelículas sobre los electrodos, además de poseer la capacidad de transferir electrones desde los sustratos energéticos presentes en su medio natural a los ánodos del dispositivo, demostrando que los sustratos evaluados presentan actividad electrogénica. Esta información permite ampliar la posibilidad de diseñar proyectos encaminados al estudio de la diversidad de microorganismos electrogénicos, como también el mejoramiento de dispositivos *in-situ* no invasivos ni dañinos con desempeños electroquímicos, los cuales permitan acoplar sistemas de medición.

Referencias bibliográficas

1. Zhou M, Wang H, Hassett DJ, Gu T. Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013; 88(4): 508-518.
2. Zhao J, Li XF, Ren YP, Wang XH, Jian C. Electricity generation from Taihu Lake cyanobacteria by sediment microbial fuel cells. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012; 87:1567-1573.

3. Dumas C, Mollica A, Féron D, Basséguy R, Etcheverry L, Bergel A. Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. *Electrochim Acta*. 2007; 53(2): 468-473.
4. Erable B, Lacroix R, Etcheverry L, Féron D, Delia ML, Bergel A. Marine floating microbial fuel cell involving aerobic biofilm on stainless steel cathodes. *Bioresour Technol*. 2013; 142: 510-516.
5. Liu H, Ramnarayanan R, Logan BE. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(7): 2281-2285.
6. Logan BE, Rabaey K. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*. 2012; 337(6095): 686-690.
7. Velasquez-Orta SB, Head IM, Curtis TP, Scott K. Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. *Bioresour Technol*. 2011; 102(8): 5105-5112.
8. Logan BE, Regan JM. Microbial fuel cells--challenges and applications. *Environ Sci Technol*. 2006; 40(17): 5172-5180.
9. Du Z, Li H, Gu T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv*. 2007; 25(5): 464-482.
10. Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang W. Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ Sci Technol*. 2001; 35(1): 192-195.
11. Tender LM, Reimers CE, Stecher HA, Holmes DE, Bond DR, Lowy DA, *et al*. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat Biotechnol*. 2002; 20 (8): 821-825.
12. Nielsen M-E, Reimers C, Stecher H. Enhanced power from chambered benthic microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2007; 41: 7895-7900.
13. Tender LM, Graya SA, Groveman E, Lowy DA, Kauffman P, Melhado J, *et al*. The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J Power Sources*. 2008; 179(2): 571-575.
14. Nielsen M-E, White H, Sharma S, Girguis P. Sustainable energy from deep ocean cold seeps. *Energy Environ Sci*. 2008; 1: 584-593.

15. Girguis P, Holden J. On the potential for bioenergy and biofuels from hydrothermal vent microbes. *Oceanography*. 2012; 25(1): 213–217.
16. Zhang Y, Angelidaki I. Self-stacked submersible microbial fuel cell (SSMFC) for improved remote power generation from lake sediments. *Biosens Bioelectron*. 2012; 35(1): 265-270.
17. Shin JW, Seo SJ, Maitlo HA, Park JY. The enhancement of ammonium removal from ethanalamine wastewater using air-cathode microbial fuel cells coupled to ferric reduction. *Bioresour Technol*. 2015; 190: 466-473.
18. Quan XC, Quan YP, Tao K, Jiang XM. Comparative investigation on microbial community and electricity generation in aerobic and anaerobic enriched MFCs. *Bioresour Technol*. 2013; 128: 259-265.
19. Vandecastelaere I, Nercessian O, Faimali M, Segaert E, Mollica A, Achouak W, *et al*. Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm. *Bioelectrochemistry*. 2010; 78(1): 62-66.
20. Erable B, Vandecastelaere I, Faimali M, Delia ML, Etcheverry L, Vandamme P, *et al*. Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry*. 2010; 78(1): 51-56.
21. Huang L, Chai X, Chen G, Logan BE. Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2011; 45(11): 5025-5031.
22. Sokhee PJ, Mi-Hwa Y, Seung-Mok L, Sang-Eun O, Hojeong K, Jae-Kyu, Y. Power generation and anode bacterial community compositions of sediment fuel cells differing in anode materials and carbon sources. *Int J Electrochem Sci*. 2014; 9: 315-326.
23. Rao AMF, Malkin SY, Hidalgo-Martinez S, Meysman FJR. The impact of electrogenic sulfide oxidation on elemental cycling and solute fluxes in coastal sediment. *Geochim Cosmochim Acta*. 2016; 172: 265-286.
24. Reimers CE, Girguis P, Stecher III HA, Tender LM, Rychelynck N, Whaling P. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology*. 2006; 4(2): 123–136.
25. Donovan C, Dewan A, Heo D, Beyenal H. Batteryless, wireless sensor powered by a sediment microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*. 2008; 42(22): 8591-8596.

Dirección de los autores

Alexander Mora Collazos

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali – Colombia

alexander.mora.collazos@gmail.com

Enrique Bravo Montaña

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali – Colombia

enrique.bravo@correounivalle.edu.co