



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Facultad de Ingeniería

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales

**ELECTRODOS BIO-HÍBRIDOS CRIOESTRUCTURADOS PARA  
LA GENERACIÓN DE CORRIENTE ELÉCTRICA A PARTIR DE  
ORINA**

Ing. Mariano Prudente

Tesis presentada para optar por el grado académico de

Doctor en Ciencia de Materiales

Dirección - Dr. Hernán Esteban Romeo

Co-dirección - Dr. Diego Ariel Massazza

2023



RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Facultad de Ingeniería

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales

**ELECTRODOS BIO-HÍBRIDOS CRIOESTRUCTURADOS PARA  
LA GENERACIÓN DE CORRIENTE ELÉCTRICA A PARTIR DE  
ORINA**

Ing. Mariano Prudente

Tesis presentada para optar por el grado académico de

Doctor en Ciencia de Materiales

Dirección - Dr. Hernán Esteban Romeo

Co-dirección - Dr. Diego Ariel Massazza

2023



## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer enormemente por su dedicación y compromiso, por toda la ayuda y el tiempo invertido en mi formación a mis directores Hernán y Diego, dos excelentes personas que hicieron que este trayecto sea de lo más cómodo.  
Sin dudas no existiría este trabajo sin ellos.*

*Agradecer especialmente a IIBIO por abrirme sus puertas y permitirme realizar todos mis experimentos en el transcurso de estos años, junto a un increíble grupo de personas.*

*A Lxs Precarixs por ser la compañía perfecta en el día a día.*

*A mis amigxs que me apoyaron incondicionalmente (sin entender qué estuve haciendo).*

*A la música y la poesía.*

*Y finalmente, a mi familia por enseñarme el valor imponderable que tiene hacer lo que a unx le apasiona y perseguir sus sueños.*

*A todxs y cada unx de ustedes, les agradezco con el corazón.*

## RESUMEN

El presente trabajo de Tesis se centra en el desarrollo y caracterización de electrodos cerámicos porosos de óxidos de titanio sub-estequiométricos ( $Ti_4O_7$ ) con estructura laminada, para su uso como plataformas para el crecimiento de bacterias electro-activas capaces de degradar orina humana y generar corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos.

El descubrimiento de bacterias - denominadas electro-activas - capaces de oxidar materia orgánica y transferir electrones a superficies conductoras ha dado lugar en los últimos años al desarrollo de dispositivos bio-electroquímicos conocidos como celdas de combustible microbianas (MFCs). Estas celdas, constituidas en su configuración habitual por un compartimiento anódico y uno catódico, funcionan como una 'pila biológica'. La cámara anódica emplea bacterias electro-activas para oxidar la materia orgánica que se utiliza como combustible de la celda, en conjunto con electrodos (ánodos) capaces de coleccionar los electrones provenientes de la oxidación. La conexión de este compartimiento anódico con uno catódico (en donde ocurre, por ejemplo, la reducción de oxígeno) permite generar corriente eléctrica útil. En los últimos años ha surgido una idea disruptiva basada en el funcionamiento de las MFCs, pero poniendo el foco de atención en una nueva fuente de materia orgánica: la orina humana. El uso de MFCs alimentadas con orina constituye al día de hoy una de las únicas pruebas en campo de esta tecnología; sin embargo, estas celdas aún muestran un desempeño lejano al óptimo. Uno de los principales factores que afectan la eficiencia de generación de corriente en estos sistemas bio-electroquímicos está asociado a limitaciones metabólicas de las bacterias electro-activas que crecen sobre la superficie del ánodo. La formación de agregados bacterianos (denominados *biofilms*) de cientos de micrones de espesor sobre la superficie anódica conduce a una caída de potencial interna debida a la resistencia eléctrica intrínseca del propio *biofilm*, lo que provoca la disminución de la corriente producida por la comunidad bacteriana en su conjunto. A partir de esta limitante se ha hecho evidente que, para mejorar el desempeño de los ánodos microbianos que se utilizan en las MFCs, es necesario que la mayor cantidad de bacterias esté en contacto directo con la superficie del electrodo.

En este escenario se ha demostrado que la utilización de ánodos porosos aumenta considerablemente la corriente producida por el sistema al aumentar el área disponible para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, no solo el aumento de la superficie es fundamental para alcanzar un óptimo desempeño, sino también el desarrollo de poros con un tamaño, geometría y tortuosidad adecuados, de manera de garantizar la accesibilidad microbiana al interior del electrodo y de favorecer

## Resumen

a su vez los fenómenos de transporte de materia orgánica necesarios para la replicación de los microorganismos.

La originalidad del presente trabajo radica en el uso de un material de electrodo bio-compatible con excelentes propiedades eléctricas ( $Ti_4O_7$ ) para el desarrollo de electrodos porosos con estructura laminada, capaces de ser colonizados por bacterias electro-activas y de producir corriente eléctrica a partir de orina humana. La búsqueda de una estructura laminar para los electrodos se focalizó en la posibilidad de contar con ánodos que puedan emplearse bajo una modalidad de flujo continuo de orina a través de su estructura porosa, favoreciendo los fenómenos de transporte de nutrientes a lo largo de todo el volumen del electrodo. A su vez, el desarrollo de electrodos laminados - de distancia interlaminar variable y controlable - permitió modular la superficie electroquímicamente activa por unidad de volumen de ánodo y la accesibilidad microbiana al interior del electrodo, buscando un balance adecuado entre colonización bacteriana y superficie específica para alcanzar el óptimo funcionamiento de los electrodos bio-híbridos.

El trabajo se desarrolló de acuerdo con tres ejes: (1) la obtención, a partir de lodos cloacales, de bacterias electro-activas capaces de degradar orina humana y producir corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos; (2) el diseño y preparación de estructuras porosas eléctricamente conductoras de  $Ti_4O_7$  con morfología laminar; y (3) el estudio de la colonización de los electrodos de  $Ti_4O_7$  con bacterias electro-activas para su uso como ánodos microbianos en la producción de corriente eléctrica a partir de orina.

Los estudios realizados en esta Tesis demostraron que:

- ❖ es posible aislar, a partir de lodos cloacales domésticos, consorcios bacterianos capaces de degradar orina humana y producir corriente eléctrica en celdas bio-electroquímicas.
- ❖ existe un rango de concentraciones de orina en el cual es posible mantener la viabilidad de las bacterias electro-activas, más allá del cual se producen efectos inhibitorios que provocan la pérdida de la actividad microbiana y la caída de la corriente eléctrica producida.
- ❖ es posible variar a voluntad el área electroquímicamente activa y el grado de colonización bacteriana de los electrodos de  $Ti_4O_7$  mediante el control del espaciado interlaminar de los mismos.
- ❖ existe un límite a la máxima densidad de corriente que es posible obtener, la cual depende del espaciado interlaminar y la superficie electroquímicamente activa de los electrodos, así como también de la concentración de orina utilizada.

## Resumen

- ❖ la densidad de corriente máxima obtenida con los electrodos laminados ( $5.2 \text{ kA/m}^3$ ) es un orden de magnitud mayor que las reportadas a la fecha para sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina humana.

## ABSTRACT

This Thesis focuses on the development and characterization of porous electrodes of sub-stoichiometric titanium oxides ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ) with laminar structures, for their use as platforms for the growth of electro-active bacteria capable of degrading human urine and produce electric current in bio-electrochemical systems.

The discovery of bacteria - known as electro-active bacteria - capable of oxidizing organic matter and transferring electrons to conductive surfaces has led to the development of bio-electrochemical devices called microbial fuel cells (MFCs). These cells - composed in their typical configuration by two compartments, an anode chamber and a cathode chamber - can be considered as 'biological batteries'. The anode chamber makes use of electro-active bacteria for oxidizing the organic matter employed as the fuel, and electrodes (anodes) capable of collecting the electrons coming from the oxidation process. The connection of the anode compartment with a cathode reservoir (where, for instance, oxygen reduction occurs) makes it possible to generate electrical current. In the last years a disruptive idea has emerged in the bio-electrochemical area, focusing on a new source of organic matter for feeding the MFCs: human urine. The use of urine-fed MFCs represents to date one of the only field trials of this technology; however, these cells still show a performance far from being optimal. One of the main factors that affect the current generation efficiency in these bio-electrochemical systems is associated to metabolic limitations of the electro-active bacteria growing on the anode surface. The formation of bacterial aggregates on the anode surface (called *biofilms*) of hundreds of microns thick leads to an internal potential drop due to the intrinsic electric resistance of the bacterial *biofilm*, which causes a decrease in the current produced by the bacterial community. Based on this limitation, it has become evident that, in order to improve the performance of the microbial anodes used in MFCs, it is necessary the direct contact of as much as possible electro-active bacteria with the anode surface.

In this scenario, it has been demonstrated that the use of porous anodes considerably increases the current produced, by increasing the area available for bacterial growth. However, not only the increase in surface area is essential to achieve optimal performance, but also the development of pores with an adequate size, geometry and tortuosity, in order to guarantee microbial penetration into the electrode structure while promoting at the same time the transport of the organic matter necessary for bacterial replication.

## Abstract

The highlight of the present Thesis lies on the use of a biocompatible electrode material with excellent electrical properties ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ) for the development of porous electrodes with laminar structure, capable of both being colonized by electro-active bacteria and producing electric current from human urine. The pursuit of a laminar electrode structure focused on the possibility of counting on anodes that can be used under a continuous flow of urine through its porous structure, promoting the nutrient transport throughout the entire electrode volume. In turn, the development of laminar electrodes - with variable and tunable interlaminar distance - made it possible to modulate both the electrochemically active surface area per anode unit volume and the microbial accessibility deep down to the electrode structure, seeking for an adequate balance between bacterial colonization and specific surface area to achieve the optimal electrode performance.

The work was developed according to three research lines: (1) obtaining, from a sewage sludge, electro-active bacteria capable of degrading human urine and producing electric current in bio-electrochemical systems; (2) designing and characterizing electrically conductive  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  porous structures with lamellar morphology; and (3) colonizing the  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  electrodes with electro-active bacteria for their use as microbial anodes in the production of electric current from human urine.

The studies carried out in this Thesis demonstrated that:

- ❖ it is possible to isolate, from a domestic sewage sludge, bacterial consortia capable of producing electric current from human urine in bio-electrochemical cells.
- ❖ there is a range of urine concentrations in which is possible to maintain the viability of the electro-active bacteria, beyond which inhibitory effects occur causing the loss of the microbial activity and the concomitant drop of the electric current produced.
- ❖ it is possible to modify both the electrochemically active surface area and bacterial colonization of the  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  electrodes by tuning the interlaminar distance.
- ❖ there is a limit to the maximum current density that can be obtained, which depends on both the interlaminar distance and the electrochemically active surface area of the electrodes, as well as on the urine concentration used.
- ❖ the maximum current density obtained from the laminar electrodes ( $5.2 \text{ kA/m}^3$ ) is an order of magnitude higher than those reported to date for bio-electrochemical systems fed with human urine

*Todos los protocolos empleados en este trabajo para llevar a cabo los estudios en presencia de orina humana - tanto respecto de su recolección como de su manipulación en el laboratorio - fueron evaluados y acreditados por el comité del Programa Temático Interdisciplinario en Bioética (PTIB) de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). De acuerdo con estos protocolos, se contó con la participación de seis (6) adultos sanos como donantes de orina, seleccionados de acuerdo con diferentes hábitos alimentarios (mayor o menor ingesta dietaria de proteínas, carbohidratos y/o lípidos) así como también contemplando su actividad física diaria y masa muscular. Estos aspectos permitieron contar con muestras representativas de una diversidad de características fisiológicas, lo que resulta fundamental a la hora de evaluar el rendimiento de los sistemas bio-electroquímicos en cuanto a la producción de corriente eléctrica a partir de orina. Todos los participantes de esta propuesta manifestaron su libre voluntad mediante la firma de los correspondientes consentimientos informados, bajo el anonimato que les garantiza la ley (Ley 25326) y a sabiendas de que su participación no pone en riesgo alguno su salud (ni física ni emocional).*

# Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AFC:** celda de combustible alcalina.

**APM:** ánodo poroso monolítico.

**ATP:** adenosín trifosfato.

**BESs:** sistemas bio-electroquímicos.

**CLD:** capa límite difusiva.

**CV:** voltametría cíclica.

**DET:** transferencia electrónica directa.

**DQO:** demanda química de oxígeno.

**DRAM:** dispositivo de estado sólido de almacenamiento de datos.

**DTA:** análisis térmico diferencial.

**EAS:** ensayo de aclimatación secuencial.

**EET:** transferencia electrónica extracelular.

**E<sub>F</sub>:** energía de Fermi.

**EFC:** celda de combustible enzimático.

**EIS:** espectroscopía de impedancia electroquímica.

**EPS:** sustancias poliméricas extracelulares.

**FAN:** nitrógeno amoniacal libre.

**IET:** transferencia electrónica indirecta.

**ISISA:** autoensamblado inducido por segregación de hielo.

**LCD:** lodo cloacal doméstico.

**MCFC:** celda de combustible de carbonato fundido.

**MEC:** celda de electrólisis microbiana.

**MFCs:** celdas de combustible microbianas.

**MLB:** límite de labilidad molecular.

**MSC:** celda solar microbiana.

**MSO:** mezcla Syntho/orina.

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido.

**NPs:** nanopartículas.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PAFC:** celda de combustible de ácido fosfórico.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PEMFC:** celda de combustible de membrana de intercambio de protones.

**PVP:** polivinilpirrolidona.

**QMRA:** análisis cuantitativo de riesgo microbiológico.

**rRNA:** ácido ribonucleico ribosomal.

**RSM:** metodología de la superficie de respuesta.

**RVC:** carbono vítreo reticulado.

**SCE:** electrodo de calomel saturado.

**SEM:** microscopía electrónica de barrido.

**SHE:** electrodo estándar de hidrógeno.

**SOFC:** celda de combustible de óxido de sodio.

**TAN:** nitrógeno amoniacal total.

**TCA:** ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

**TGA:** análisis termogravimétrico.

**XRD:** difracción de rayos X.

**3D:** tridimensional/es.

## Abreviaturas

$\Delta G$ : energía libre de Gibbs.

$\mu$ : velocidad de crecimiento microbiano.

## Magnitudes

$i$ : corriente eléctrica.

$T$ : temperatura.

$t$ : tiempo.

$j$ : densidad de corriente eléctrica.

## Unidades

$^{\circ}\text{C}$ : grados centígrados.

$\text{A}$ : ampere.

$\text{eV}$ : electron-volt.

$\text{g}$ : gramos.

$\text{L}$ : litros.

$\text{m}$ : metro.

$\text{min}$ : minutos.

$\text{Wh}$ : watt-hora.

$\text{W}$ : watt.

## Prefijos

$\text{G}$ : giga.

$\text{M}$ : mega.

$\text{m}$ : mili

# Índice de contenidos

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1- Problemáticas del modelo energético actual .....	2
1.2- Energías alternativas.....	3
1.3- Celdas de combustible.....	6
1.3.1- Celdas de combustible microbianas (MFCs) .....	9
1.4- Orina: combustible para MFCs.....	13
1.4.1- Composición de la orina.....	14
1.5- Ánodos microbianos: optimización para la generación de corriente eléctrica .....	19
1.6- Óxidos de titanio eléctricamente conductores .....	22
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>25</b>
<b>Motivación, hipótesis y objetivos</b> .....	<b>25</b>
2.1- Motivación del trabajo propuesto .....	25
2.2- Hipótesis planteadas.....	29
2.3- Objetivos del trabajo de Tesis .....	29
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>31</b>
<b>Técnicas de análisis y caracterización</b> .....	<b>31</b>
3.1- Cronoamperometría.....	31
3.2- Voltametría cíclica (CV).....	32
3.2.1- Determinación de áreas mediante voltametría cíclica .....	34
3.3- Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).....	34
3.4- Difracción de rayos X de polvos (XRD).....	35
3.5- Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	36
3.6- Fijación de microorganismos .....	37
3.7- Análisis térmico diferencial (DTA) .....	37
3.8- Análisis termogravimétrico (TGA) .....	38
3.9- Medidas eléctricas: determinación de la resistencia eléctrica .....	38
3.10- Medidas de densidad aparente y porosidad .....	39
3.11- Análisis genómico .....	39
3.11.1- Extracción de ADN .....	39

<b>Capítulo 4</b> .....	<b>41</b>
<b>Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito</b> .....	<b>41</b>
4.1- Metabolismo microbiano y corriente eléctrica .....	42
4.2- Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina .....	46
4.3- Electroanálisis de ánodos microbianos .....	49
4.3.1- Diseño y operación de celdas bio-electroquímicas de tres electrodos .....	52
4.3.2- Formación de <i>biofilms</i> en ánodos microbianos .....	54
4.4- Enriquecimiento e identificación de bacterias electro-activas a partir de lodos cloacales domésticos .....	56
4.5- Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina .....	63
4.6- Producción de corriente a partir de orina: estudio de la concentración óptima .....	76
4.7- Simulación bio-termodinámica de las densidades de corriente .....	78
4.7.1- Estequiometría del crecimiento microbiano .....	80
4.7.2- Cinética del crecimiento microbiano .....	82
4.7.3- Estructura del modelo .....	85
4.7.3.1- Primer dominio (líquido 'bulk') .....	86
4.7.3.2- Segundo dominio (capa límite difusiva) .....	90
4.7.3.3- Tercer dominio ( <i>biofilm</i> ) .....	90
4.7.3.4- Cuarto dominio (ánodo) .....	92
4.7.4- Cinética de consumo de acetato y densidad de corriente .....	93
4.7.4.1- Velocidad específica de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ ) .....	94
4.7.4.1.1- Velocidad de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) en función de parámetros termodinámicos .....	96
4.7.5- Estrategia de cálculo .....	99
4.7.6- Validación de las densidades de corriente ( $j$ ) teóricas .....	100
4.8- Conclusiones parciales .....	101
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>103</b>
<b>Preparación y caracterización de electrodos porosos de <math>Ti_4O_7</math></b> .....	<b>103</b>
5.1- Materiales electro-cerámicos .....	104
5.2- Óxidos de titanio .....	105
5.3- Óxidos de titanio eléctricamente conductores: <i>fases de Magnéli</i> .....	109
5.4.- Preparación de electrodos porosos de $Ti_4O_7$ .....	115
5.4.1.- Etapa I: Preparación de dispersiones de NPs de dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) .....	116

## Índice de contenidos

5.4.2.- Etapa II: Congelamiento direccional.....	117
5.4.3.- Etapa III: Liofilizado .....	121
5.4.4.-Etapa IV: Sinterizado .....	122
5.4.5.- Etapa V: Reducción química.....	127
5.5- Caracterización de electrodos de $Ti_4O_7$ .....	131
5.5.1- Determinación de la conductividad eléctrica .....	131
5.5.2- Determinación del área superficial volumétrica.....	134
5.6.- Conclusiones parciales .....	136
<b>Capítulo 6.....</b>	<b>138</b>
<b>Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos porosos de <math>Ti_4O_7</math>.....</b>	<b>138</b>
6.1- Metodología de la superficie de respuesta (RSM) .....	139
6.1.1 - Fases secuenciales de la experimentación.....	141
6.1.2 - Codificación de los niveles de las variables.....	143
6.1.3 - Optimización de la respuesta .....	144
6.2 - Determinación de las condiciones de operación de la celda.....	147
6.3 - Espaciado interlaminar y producción de corriente a partir de orina: <i>fase de exploración experimental</i> .....	152
6.4 - Optimización de la densidad de corriente mediante la metodología de la superficie de respuesta (RSM).....	157
6.5 - Eficiencia de uso de la superficie anódica .....	164
6.6 - Contextualización de los resultados en el área bio-electroquímica .....	167
6.7- Conclusiones parciales .....	169
<b>Capítulo 7.....</b>	<b>171</b>
<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>171</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>175</b>
Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo utilizado para la simulación de la densidad de corriente.....	175
<b>Anexo B.....</b>	<b>183</b>
Determinación de áreas superficiales por unidad de volumen .....	183
<b>Anexo C .....</b>	<b>188</b>
Código de R.....	188
<b>Producción científica.....</b>	<b>196</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>198</b>

# Capítulo 1

## Introducción

*En este capítulo introductorio se enmarca, dentro del modelo energético actual, la relevancia del uso de energías alternativas, haciendo hincapié en las características generales de las celdas de combustible y en cómo la modificación de estas últimas con material biológico (bacterias, denominadas electro-activas) ha dado lugar al desarrollo de nuevas tecnologías bio-híbridas denominadas **celdas de combustible microbianas** (MFCs). En este marco se describen las características de funcionamiento de las MFCs y se introduce una idea disruptiva abordada en los últimos años para el abastecimiento de las mismas: la **utilización de orina humana como combustible para la producción de corriente eléctrica**.*

*En la parte final del capítulo se describe la importancia que tienen los materiales y la arquitectura de los electrodos que se utilizan en las MFCs en los procesos de recuperación de carga eléctrica a partir de orina, y cómo sería posible utilizar **estructuras porosas de óxidos eléctricamente conductores ( $Ti_4O_7$ )** como ánodos microbianos para incrementar la eficiencia de recuperación de carga eléctrica en sistemas alimentados con orina.*

### 1.1- Problemáticas del modelo energético actual

Existe una preocupación creciente en el mundo, y en particular en el ámbito científico, vinculada a la utilización de **combustibles fósiles** en el modelo energético vigente. Esta está asociada directamente a problemáticas relacionadas con la naturaleza de dichos combustibles.

Los combustibles fósiles, comúnmente llamados convencionales, esto es, el petróleo, el carbón y el gas natural, se originan en procesos naturales que se dan en una escala de tiempo geológica. Proceden de la materia orgánica proveniente de plantas y animales, depositada y acumulada en un proceso de sedimentación. La materia orgánica enterrada sufre una serie de transformaciones controladas por el aumento de la presión y la temperatura. Este proceso transforma la materia orgánica en querógenos, una mezcla insoluble de compuestos orgánicos de alto peso molecular presentes en las rocas sedimentarias. En última instancia, una porción de éstos es transformada en petróleo, gas natural y carbón. Debido a que esta transformación requiere de intervalos temporales que abarcan millones de años, los combustibles fósiles son considerados **recursos no renovables**.

Estas características conducen a dos problemáticas de público conocimiento que vale la pena mencionar: (i) la expansión y desarrollo de un sistema energético mundial basado en recursos no renovables, y (ii) el deterioro global del medioambiente debido a la quema de combustibles fósiles.

Hoy en día los combustibles fósiles constituyen el 80% de la producción energética mundial y del consumo energético global (Enerdata, 2021). En los últimos 20 años, la tendencia de estos dos parámetros (producción y consumo) muestra un incremento cercano al 2% anual, consecuencia del aumento demográfico mundial, con una interrupción en el año 2020 como consecuencia de la pandemia Covid-19, seguida por una recuperación en el siguiente año. Si bien el petróleo, el gas y el carbón seguirán existiendo durante las próximas décadas, es innegable la problemática asociada a continuar desarrollando un sistema energético focalizado en la utilización de recursos no renovables, más aún si se tiene en cuenta que la transición a un nuevo modelo funcional de producción de energía global requerirá, de la misma manera, de décadas para su desarrollo e implementación. En este escenario, es fundamental tener presente las dificultades científicas y tecnológicas que existirían para el suministro energético en condiciones de escasas o ausencia total de combustibles fósiles. Es por esto que es necesario adoptar una iniciativa con esfuerzos direccionados a resolver las problemáticas a largo plazo en seguridad energética global.

En el contexto mencionado, la quema de combustibles fósiles ha generado un incremento considerable de las concentraciones atmosféricas globales de compuestos que contribuyen al efecto

## Introducción

invernadero - como el dióxido de carbono, el metano y el óxido nitroso - resultado de la actividad humana desde 1750 (Revolución Industrial), lo que ha llevado a superar ampliamente en la actualidad los valores preindustriales, determinados estos últimos a partir del estudio de muestras de aire atmosférico ocluidas en núcleos de hielo que han existido desde hace miles de años (Etheridge et al, 1996). Hoy en día, el sector energético es responsable de dos tercios de las emisiones globales, donde el dióxido de carbono representa el gas antropomórfico de efecto invernadero más importante. Las concentraciones atmosféricas globales de este compuesto exceden ampliamente el rango natural de los últimos 650 mil años (180 a 300 ppm en 2005) (Intergovernmental Panel on Climate, 2007).

El efecto de las actividades humanas llevadas a cabo desde los comienzos de la Revolución Industrial se correlaciona directamente con un incremento en la temperatura global terrestre. Estos cambios se evidencian en un aumento de la temperatura promedio del aire y los océanos, el derretimiento extendido de nieve y hielo, y el incremento del nivel promedio global del mar. A nivel continental, regional y oceánico, se manifiestan cambios en la cantidad de precipitaciones, salinidad de los océanos, patrones de vientos y otros aspectos de eventos climáticos extremos que incluyen sequías, grandes precipitaciones, olas de calor y ciclones tropicales (Trenberth et al, 2018).

La transición energética es sin dudas el camino hacia la transformación del sector energético global, desde un sistema basado en combustibles fósiles hacia un modelo que minimice la utilización de carbono, movilizado por la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, atenuando de esta manera el cambio climático a nivel mundial. Sin embargo, para reemplazar el petróleo, gas natural y carbón con otro tipo de combustibles u otras tecnologías, es necesario un mayor conocimiento de los procesos de obtención, distribución y almacenamiento de la energía del que se tiene actualmente.

### **1.2- Energías alternativas**

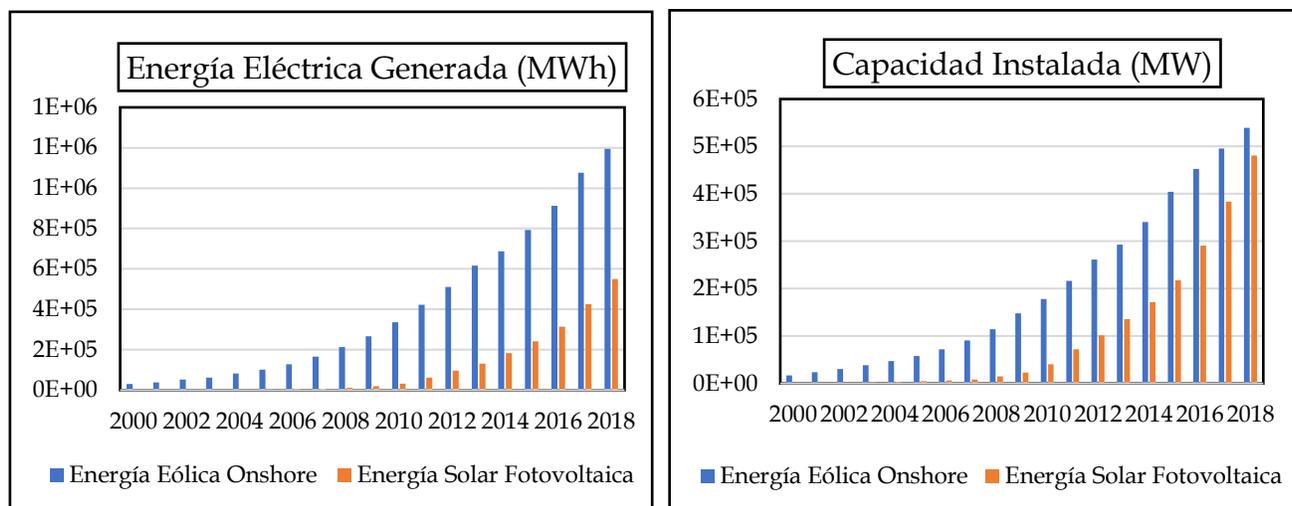
Con el tiempo las fuentes de combustibles fósiles estarán menos disponibles, generando una mayor dificultad de acceso a un bien necesario para el desarrollo de la vida. Las **energías alternativas** crean nuevos escenarios con ventajas tangibles en varias aristas con respecto al paradigma energético actual. Algunos beneficios socioeconómicos de su implementación son la creación de nuevos empleos alrededor del mundo (11.5 millones en 2019 – Ferroukhi et al, 2020), la reducción significativa de la probabilidad de fallas a gran escala debido a la naturaleza modular de muchas de las tecnologías asociadas, la mejora sustancial de acceso a las tecnologías emergentes gracias a la creación de sistemas autónomos de pequeña y mediana escala, así como también las bajas emisiones de carbono de la

## Capítulo 1

mayoría de ellas, los que actualmente son el motor principal de su desarrollo. Estos beneficios, sin embargo, comenzaron a ser visibilizados en las últimas décadas con el despliegue extensivo de algunas energías alternativas en particular.

En la actualidad son varias las energías alternativas que están siendo implementadas en el mundo, sin embargo, son dispares los niveles de desarrollo y utilización de cada una. En este momento, la **energía solar** y la **eólica** son los mayores exponentes en términos de desarrollo en los últimos años.

La energía solar puede ser aprovechada directamente a partir de la interacción con la radiación electromagnética asociada. Dentro del área de la energía solar, las celdas fotovoltaicas son una de las tecnologías energéticas renovables que más ha crecido en el último tiempo, pasando de generar 32150 GWh de energía en el 2010 a generar cerca de 550000 GWh en el 2019. En estos dispositivos fotovoltaicos, la energía lumínica es utilizada para inducir una separación de cargas entre dos semiconductores próximos de diferente tipo ( $n$  y  $p$ ), produciendo así un campo eléctrico capaz de generar corriente eléctrica útil. Otra de las tecnologías más exploradas en la actualidad es la de la energía eólica. En este caso, el viento es usado para producir electricidad a partir de la energía cinética del aire en movimiento. De forma similar a la energía solar, la eólica es una de las tecnologías renovables que más rápido ha crecido en los últimos años. En el mundo, la capacidad instalada, es decir, la disponibilidad de infraestructura necesaria para su producción ha crecido casi 75 veces en las últimas décadas, pasando de 7.5 GW de potencia en 1997 a 564 GW en 2018. Los datos mostrados en las **Figuras 1.1 (a) y (b)** reflejan las tecnologías que más se han desarrollado en los últimos años en materia de energías alternativas.



**Figura 1.1.** Evolución temporal (últimos 20 años) respecto a la generación de energía eléctrica **(a)** y capacidad instalada **(b)** en el mundo a partir de las tecnologías eólica *onshore* y solar fotovoltaica.

## Introducción

Las tecnologías mencionadas han entrado en un ciclo de disminución de costos, aumento de su implementación y acelerado progreso científico-tecnológico. En particular, los precios de los módulos de los paneles solares han caído cerca del 80% en los últimos 10 años, mientras que los de las turbinas de viento lo han hecho entre un 30-40%. Estos resultados son consecuencia del soporte por parte de los gobiernos involucrados, los que han incentivado a través de políticas públicas y financiamiento su investigación particular, generando simultáneamente un marco apropiado para el desarrollo de mercados, los cuales han sido identificados como componentes complementarios vitales para impulsar la innovación en la actividad (Bettencourt et al, 2013).

La **Tabla 1.1** muestra la evolución en los últimos 10 años de un grupo más amplio de energías alternativas, como el biogás, la energía marina, la geotérmica y los biocombustibles, entre otras, en términos de capacidad instalada y generación.

**Tabla 1.1**

Aumento porcentual en capacidad instalada y generación para diferentes energías alternativas entre 2010 y 2019.

<b>Tipo de Energía</b>	<b>Capacidad (%)</b>	<b>Generación (%)</b>
Solar fotovoltaica	1336	1610
Eólica <i>onshore</i>	821	822
Solar térmica	397	633
Eólica <i>offshore</i>	234	256
Biogás	118	57
Marina	113	95
Biocombustibles líquidos	104	91
Biocombustibles sólidos	83	57
Biocombustibles a partir de residuos	73	31
Hidráulica	28	21
Geotérmica	39	29

Una de las principales problemáticas que experimentan las energías alternativas en estadios tempranos de desarrollo es la incapacidad de aplicarse a mediana o gran escala, imposibilitando su ingreso a los ciclos de optimización continua, donde su crecimiento pasa de estar latente en el tiempo a estar en constante desarrollo, mostrando en los mejores casos cambios radicales en el transcurso de una década.

La visualización de oportunidades emergentes de investigación es fundamental a la hora de mejorar el funcionamiento de las tecnologías energéticas existentes y reducir sus costos de implementación, así como también a la hora de estimular la aparición de nichos para la exploración de nuevas tecnologías.

## Capítulo 1

Dentro del marco de energías alternativas, una de las formas más ampliamente estudiada en los últimos años para abordar la interconversión de energía es la utilización de **dispositivos electroquímicos**, los cuales transforman la energía química en eléctrica. Entre estos dispositivos, podemos encontrar las **celdas de combustible** y las **baterías**, cuyo principio de funcionamiento se basa en una reacción química controlada que conduce a la generación directa de corriente eléctrica, la que es finalmente aprovechada mediante la utilización de un circuito externo. En la actualidad, las celdas de combustible representan uno de los sistemas electroquímicos más eficientes que se conocen, ya que están exentas de procesos térmicos y/o mecánicos intermedios de transformación energética característicos de otros tipos de dispositivos (como los motores de combustión, por ejemplo). Esto las ha transformado en sistemas de utilización y desarrollo cada vez más extendido.

Las celdas de combustible se posicionan en la actualidad como una de las alternativas más atractivas para abordar la generación no convencional de corriente eléctrica, debido principalmente a que cumplen con requisitos tales como emisiones nulas y altas eficiencias de transformación energética; además de poseer simultáneamente varias ventajas desde el punto de vista de su implementación, como ser procesos silenciosos sin partes en movimiento, tener un diseño modular, operar a bajas temperaturas y presentar generalmente cortos tiempos de puesta en marcha. En la próxima sección se aborda el funcionamiento y principales características de este tipo de celdas.

### 1.3- Celdas de combustible

Las celdas de combustible son dispositivos electroquímicos que convierten la energía química contenida en los enlaces moleculares de compuestos reducidos en energía eléctrica útil para la realización de trabajo (Steele y Heinzl, 2001). Todas las celdas de combustible son similares en su configuración básica. Constan de un electrodo en cuya superficie ocurre la oxidación de los combustibles, denominado ánodo, y otro en donde ocurre la reducción del oxidante, llamado cátodo. Ambos están conectados externamente a través de un circuito eléctrico y en contacto electrolítico a través de un medio conductor de iones. A diferencia de las baterías, en las que el combustible y el oxidante se encuentran almacenados en su interior, en una típica celda de combustible éstos son suministrados continuamente (en estado líquido o gaseoso) desde el exterior del dispositivo. Entre el ánodo y el cátodo se intercala una delgada capa de electrolito que cumple con diferentes funciones. Por un lado, conduce iones entre los electrodos, lo que posibilita el mantenimiento del balance de cargas con el flujo de electrones que ocurre a través del circuito externo, permitiendo cerrar de esta forma el circuito eléctrico global del sistema. Por otro lado, se comporta como una barrera física que previene la mezcla directa del combustible y el oxidante.

## Introducción

El tipo de electrolito utilizado en las celdas de combustibles y la temperatura de operación de las mismas son algunos de los criterios más adoptados para su clasificación. En particular, son consideradas de 'baja temperatura' si operan alrededor de los 80°C. En la **Tabla 1.2** se resumen las principales celdas de combustibles de acuerdo con dicha clasificación (Fuel cell handbook, 2000).

**Tabla 1.2**

Características de celdas de combustible inorgánicas.

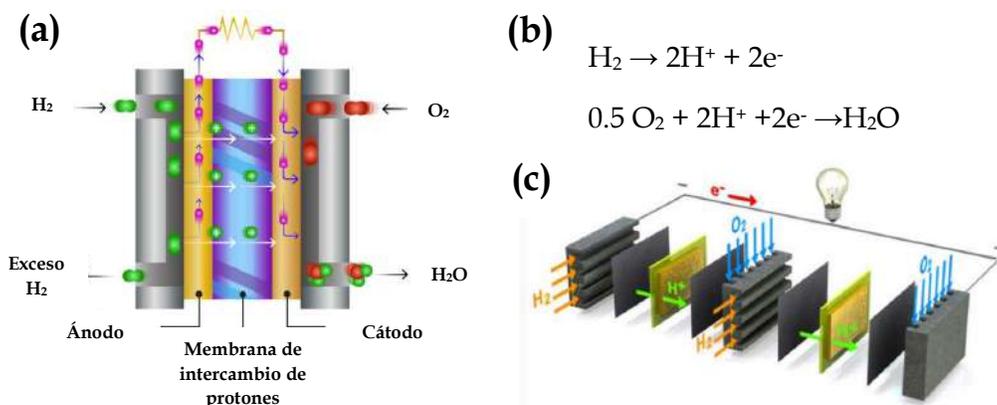
Celda de combustible	Electrolito	Ion móvil	Temperatura de operación °C
Membrana de intercambio de protones (PEMFC)	Membrana polimérica	H <sup>+</sup>	~80
Alcalina (AFC)	Hidróxido de potasio (conc.)	·OH	~100
Ácido fosfórico (PAFC)	Ácido fosfórico (conc.)	H <sup>+</sup>	~200
Carbonato fundido (MCFC)	Carbonato fundido líquido	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	~650
Óxido sólido (SOFC)	Cerámico	O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	~1000

Existe una gran variedad de celdas de combustible que se encuentran en distintos estadios de desarrollo. Las más utilizadas operan mediante reacciones químicas relativamente simples, empleando hidrógeno o metanol como compuestos oxidables, generando energía, agua y dióxido de carbono como productos de reacción. Sin embargo, también existen otros tipos de celdas que utilizan otro tipo de combustibles, como por ejemplo monóxido de carbono o metano. Dentro de las celdas presentadas en la **Tabla 1.2**, la de membrana de intercambio de protones (PEMFC) es una de las que atrae actualmente mayor atención a nivel mundial, especialmente por sus ventajas asociadas a las bajas temperaturas de operación (cercanas a las 80°C), rápida puesta en marcha y fácil y compacto apilamiento.

En la **Figura 1.2 (a)** se muestra un esquema de una celda de combustible **hidrógeno/oxígeno** de tipo PEMFC, también llamada 'pila de hidrógeno'. En este dispositivo, el hidrógeno es oxidado en el ánodo, generando dos protones y cediendo dos electrones al electrodo de trabajo. La migración de los protones a través de la membrana y el flujo de electrones a través del circuito externo hacia el cátodo permiten completar el funcionamiento de la celda. En este esquema, los electrones se combinan con el oxígeno presente en el compartimiento catódico durante el proceso de reducción, produciendo agua como compuesto final (**Figura 1.2 (b)**). Las celdas de combustible se configuran generalmente formando

## Capítulo 1

arreglos en serie (**Figura 1.2 (c)**) con la finalidad de obtener un voltaje mayor, resultado de la suma de los voltajes de cada celda.



**Figura 1.2.** (a) Esquema de una celda de combustible con membrana de intercambio de protones (PEMFC). El combustible y el oxidante ingresan a la celda y se ponen en contacto con el ánodo y el cátodo, respectivamente. La membrana permite el movimiento de protones de ánodo a cátodo. (b) Reacciones químicas involucradas, presentadas como hemirreacciones de óxido-reducción (c) Arreglo en serie de celdas de combustible. La figura fue adaptada de [http://www.twinkletoesengineering.info/hydrogen\\_car.htm](http://www.twinkletoesengineering.info/hydrogen_car.htm).

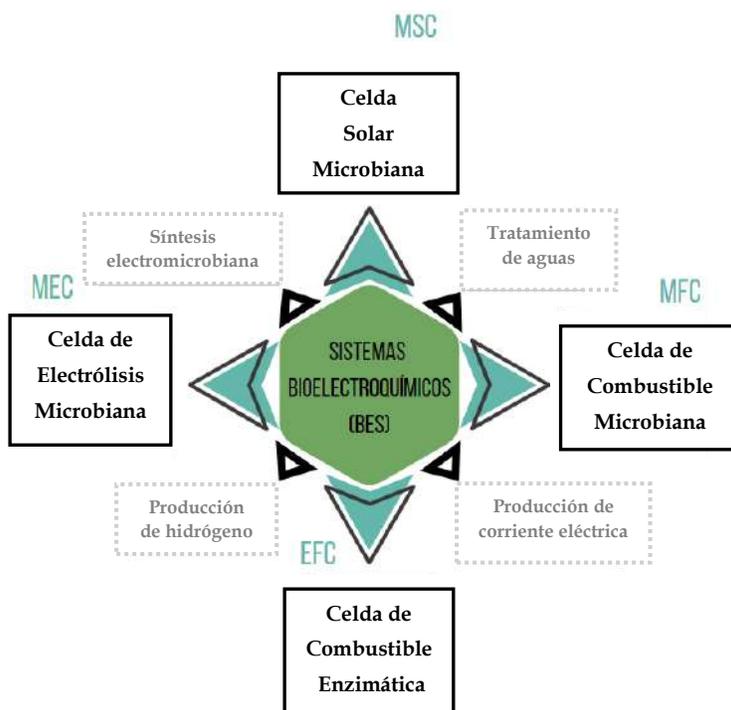
Existen dos consideraciones importantes a tener en cuenta a la hora de estudiar la viabilidad de las celdas de combustible: (i) la naturaleza de los catalizadores empleados en las reacciones de óxido-reducción, y (ii) el carácter renovable de los compuestos utilizados como combustibles. Para acelerar las reacciones anódicas y catódicas de interés, es indispensable contar con catalizadores eficientes que permitan alcanzar velocidades de conversión energética aceptables para el desarrollo de aplicaciones prácticas. En este contexto, el platino es el material que más se ha utilizado como catalizador (y aún sigue siéndolo en la actualidad), fundamentalmente por su indiscutida actividad electroquímica y excelente prestación a largo plazo. Sin embargo, debido a su escasez y altos costos, la reducción de su carga (disminución de la cantidad utilizada en las celdas) se ha convertido en el objetivo de muchos de los estudios publicados en el último tiempo (Sui et al, 2017). En cuanto a la naturaleza renovable de los combustibles empleados, es fundamental tener en cuenta el origen de los mismos. Si bien el hidrógeno, por mencionar un ejemplo, se ha transformado en uno de los compuestos más ampliamente utilizados para alimentar estas celdas, es importante tener presente que la mayor parte del mismo proviene en última instancia (directa o indirectamente) de compuestos obtenidos a partir de combustibles fósiles. De esta forma, su utilización en este tipo de dispositivos disminuye en última instancia parte del carácter renovable de esta tecnología. Si bien una discusión profunda en el tema escapa a los objetivos de esta

Tesis, es importante mencionar la relevancia de este tipo de celdas como **plataformas conceptuales para el desarrollo de nuevas tecnologías asociadas**.

Las investigaciones en materia de **catalizadores biológicos** para reacciones de óxido-reducción han abierto en los últimos años alternativas interesantes para el estudio y desarrollo de nuevas celdas de combustible. En las denominadas **celdas de combustible microbianas (MFCs)**, material biológico (en particular, bacterias) es utilizado como catalizador de las reacciones químicas involucradas (tanto de oxidación como de reducción). El concepto fundacional de este nuevo tipo de celdas de combustible - la bio-catálisis - ha dado lugar a la exploración de nuevas condiciones experimentales y al abordaje de una diversidad de reacciones que, en ausencia de microorganismos, no podrían tener lugar espontáneamente desde un punto de vista energético. La utilización de microorganismos como parte central en este tipo de celdas biológicas ha abierto así un abanico de oportunidades, posibilitando - como punto relevante - el empleo de combustibles renovables para la generación no convencional de energía, explotando la capacidad energética de moléculas orgánicas y/o inorgánicas provenientes de fuentes naturales. Esto presenta *a priori* dos ventajas fundamentales: por un lado, es posible prescindir de combustibles fósiles como punto de partida; mientras que, por otro, es posible aprovechar la concentración de moléculas presentes en su medio natural sin la necesidad de contar con procedimientos costosos para su tratamiento previo. Esta última ventaja ha permitido a su vez utilizar, por ejemplo, aguas residuales domésticas y/o industriales, entre otras, como fuentes de materia orgánica combustible en este tipo de celdas (Aelterman et al, 2006). En este contexto, las MFCs han emergido como plataformas valiosas para la revalorización de desechos líquidos masivos con simultánea generación de energía eléctrica.

### **1.3.1- Celdas de combustible microbianas (MFCs)**

Las MFCs forman parte de un conjunto más amplio de tecnologías pertenecientes a la familia de los sistemas bio-electroquímicos (BESs). El dominio de los BESs involucra el estudio y la aplicación de interacciones electroquímicas entre entidades biológicas (enzimas y/o microorganismos) y superficies eléctricamente conductoras (electrodos), contemplando sistemas complejos focalizados en aplicaciones tan diversas como la generación de corriente eléctrica y el tratamiento de aguas residuales hasta la producción de compuestos químicos de interés, como hidrógeno, ácidos orgánicos o alcoholes. La **Figura 1.3** muestra algunos ejemplos de BESs y las aristas de interrelación entre ellos.

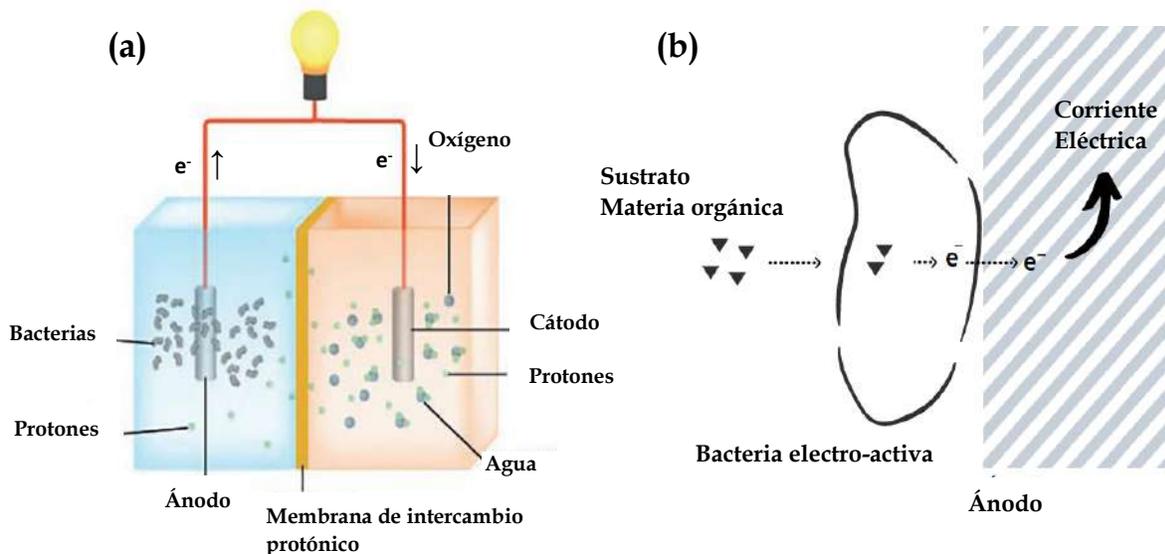


**Figura 1.3.** Sistemas bio-electroquímicos (BESs): celda de combustible microbiana (MFC), celda de combustible enzimático (EFC), celda de electrólisis microbiana (MEC) y celda solar microbiana (MSC).

Dentro del abanico de tecnologías bio-electroquímicas, y de acuerdo con los objetivos de este trabajo de Tesis, resulta de particular interés hacer foco en las características generales de las MFCs. Las MFCs tienen una estructura análoga a las celdas de combustible convencionales, y - al igual que estas últimas - se caracterizan por su capacidad de transformar directamente energía química en energía eléctrica. La principal diferencia entre ambos tipos de celdas es la utilización - en las MFCs - de bacterias (denominadas *electro-activas*) como catalizadores de las reacciones anódicas y/o catódicas de interés. Debido a la presencia de la interfase microbiana, las reacciones que ocurren en una MFC son de naturaleza bio-electroquímica, y forman parte de las rutas metabólicas de los microorganismos involucrados. Durante la secuencia de transformaciones que ocurren en la producción de carga eléctrica a partir de los procesos oxidativos, los microorganismos electro-activos utilizan los electrones presentes en el combustible (moléculas orgánicas, por ejemplo) para obtener la energía necesaria para abastecer tanto sus procesos metabólicos de reproducción (división celular) como aquellos de mantenimiento celular (von Stockar et al, 2006; Freguia, 2010). Además de estas características, las MFCs se distinguen de las celdas de combustible tradicionales en cuanto a las condiciones en las que operan y el tipo de combustibles que emplean, estando éstos últimos definidos por los microorganismos particulares involucrados.

## Introducción

Las MFCs constan (generalmente) de dos compartimientos separados por una membrana semipermeable (**Figura 1.4 (a)**). Uno de ellos, el compartimiento anódico, actúa como receptáculo donde ocurre la oxidación microbológica del combustible (*dador electrónico*). Esta oxidación permite disponer de electrones que son transferidos al ánodo de la celda, ya sea mediante mecanismos de transferencia de carga directa (esto es, por contacto directo de las bacterias electro-activas con la superficie anódica) o indirecta (mediante la utilización de compuestos solubles que actúan como mediadores en solución en el proceso de transporte de carga) (Lovley, 2012). La **Figura 1.4 (b)** muestra un esquema para el caso particular de un proceso anódico de transferencia electrónica directa (como el que será explorado en este trabajo de Tesis).



**Figura 1.4.** (a) Esquema de una MFC. Se representan los compartimientos anódico (celeste) y catódico (naranja), junto con la membrana de intercambio iónico. Se indica el flujo de carga eléctrica de ánodo a cátodo. (b) Esquema del proceso de transferencia electrónica directa en el compartimiento anódico de una MFC, como consecuencia de la actividad catalítica de una bacteria electro-activa adherida al ánodo. La figura (a) fue adaptada de Luna Medina et al, 2018.

Independientemente del mecanismo de transporte operante, la carga eléctrica generada fluye desde el ánodo hacia el segundo compartimiento (cátodo) a través de un circuito externo. En este compartimiento ocurre finalmente la reducción de compuestos oxidados (oxígeno disuelto u otro compuesto oxidante, los cuales actúan como *aceptores electrónicos* finales), permitiendo cerrar el circuito y emplear eventualmente la carga generada en aplicaciones prácticas.

En términos generales, las MFCs operan en un rango de temperaturas de aproximadamente 20-40°C, condiciones en las cuales los microorganismos denominados *mesófilos* presentan un crecimiento óptimo. Existen también sistemas que operan a mayores temperaturas, los cuales requieren la

## Capítulo 1

proliferación de microorganismos termófilos (hasta 55°C) para alcanzar su óptimo desempeño (Garip et al, 2007). Respecto al pH de trabajo, las condiciones del compartimiento anódico suelen ser cercanas a las neutras, de manera de mantener la viabilidad de los organismos presentes. Estas propiedades otorgan a las MFCs una perspectiva de desarrollo atractiva, tanto para su uso en aplicaciones donde, o bien es difícil alcanzar altas temperaturas, o donde condiciones extremas de reacción no son deseadas. Además, la gran diversidad de microorganismos electro-activos que existen en la naturaleza permite en cierta medida que la operación de las celdas pueda darse bajo condiciones de reacción flexibles (temperatura, pH, naturaleza de sustrato, entre otros). En este contexto, la cantidad de reacciones que pueden ser potencialmente catalizadas gracias a las diversas rutas metabólicas inherentes a cada microorganismo, posibilita la utilización de un mayor número de sustancias para alimentar la celda, ampliando así significativamente el tipo de compuesto que puede ser considerado como combustible.

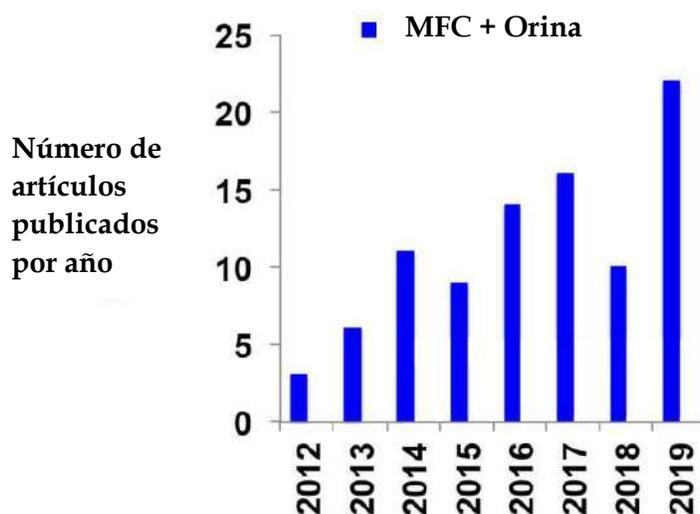
En este contexto particular, las MFCs han sido operadas exitosamente para la producción de corriente eléctrica utilizando una amplia variedad de sustratos puros, desde compuestos simples como glucosa, acetato, butirato y cisteína (entre otros), hasta otros más complejos como proteínas, carbohidratos de cadena larga (almidón, por ejemplo) y lignocelulosa (Pant et al, 2010). Sin embargo, uno de los aspectos más relevantes de este tipo de celdas - que deriva en su uso principal en la actualidad - es su capacidad para degradar materia orgánica contaminante presente en medios de composición compleja, entre los que se destacan desde aguas residuales domésticas hasta desechos acuosos industriales y lixiviados de vertederos (He et al, 2017). Esto ha permitido obtener agua tratada con menores concentraciones de materia orgánica, capaces de alcanzar en algunos casos estándares y especificaciones físico-químicas para su re-utilización (por ejemplo, para riego). De este modo, las MFCs podrían considerarse dentro del conjunto emergente de tecnologías electroquímicas no sólo desde el punto de vista de la recuperación energética, sino también desde una perspectiva directamente asociada al área de saneamiento ambiental.

En este marco, una de las ideas más disruptivas de los últimos años ha sido la utilización y aprovechamiento de **orina humana** como sustrato complejo para alimentar MFCs, tanto con fines de recuperación energética como de nutrientes esenciales (por ejemplo, nitrógeno y fósforo) (Lu et al, 2019; Sharma et al, 2022). Los estudios que han abordado este campo de investigación han demostrado (mediante herramientas de análisis cuantitativo de riesgo microbiológico, QMRA) que no existen riesgos asociados al almacenamiento, manipulación y reutilización de orina para aplicaciones bio-electroquímicas (Höglund, 2001; Quantitative microbial risk assessment, 2016), lo que ha conducido a su uso descentralizado y cada vez más extendido en este tipo de tecnologías.

### **1.4- Orina: combustible para MFCs**

La orina humana es un residuo extremadamente masivo, alcanzando una producción de más de 8700 millones de litros por día en el mundo (sobre una base de 7700 millones de personas en 2020, con un 75% de población adulta) (World Bank Data Catalog). Un adulto promedio genera entre 1.5 y 2 litros diarios de orina, lo suficiente como para llenar a lo largo de su vida (72 años promedio, según datos de la OMS) 16 piletas de tipo *Pelopincho* (medidas estándar: 2,7 x 1,6 x 0,65 m). Si bien la orina representa el 1% en volumen de las aguas residuales domésticas, contribuye con un 10% en peso a la demanda química de oxígeno del agua residual (DQO, cantidad de sustancias disueltas o en suspensión en una muestra líquida susceptibles de ser oxidadas por medios químicos). A su vez, y de interés fundamental para la recuperación de nutrientes, la orina representa el 50% del fósforo y el 75% del nitrógeno de las aguas residuales domésticas (Santoro et al, 2020).

El uso de orina humana como fuente de materia orgánica biodegradable en MFCs se introdujo por primera vez - y prácticamente de manera simultánea - en el año 2012, por grupos de investigación de Inglaterra, Países Bajos y China. El primer artículo publicado fue el del Laboratorio de Bio-energía, de la Universidad de Southampton (Inglaterra), liderado por el Prof. Ioannis Ieropoulos. Este trabajo pionero se centró particularmente en la producción de corriente eléctrica utilizando una MFC (Ieropoulos et al, 2012). Por su parte, Kuntke y colaboradores (Centro de Excelencia para la Tecnología del Agua Sostenible, Países Bajos) demostraron la posibilidad de acoplar el proceso de recuperación energética a la producción descentralizada de amoníaco (Kuntke et al, 2012), mientras que Zang y colaboradores (Departamento de Química, Universidad de Ciencia y Tecnología de China, Hefei, China) utilizaron la orina en procesos de recuperación de fósforo (Zang et al, 2012). En la actualidad existen más de 200 artículos publicados en la temática, los que en su mayoría abordan la optimización de MFCs alimentadas con orina humana ya sea para la recuperación energética o de compuestos de interés comercial (por ejemplo, *estruvita*,  $(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; compuesto utilizado ampliamente como fertilizante). Desde las primeras publicaciones hasta la actualidad, la cantidad de artículos reportados ha mostrado un crecimiento casi ininterrumpido, evidenciando la existencia de un nicho de investigación en constante expansión. La **Figura 1.5** muestra esta evolución en los últimos años.



**Figura 1.5.** Cantidad de artículos publicados en los últimos años relacionados con la utilización de orina humana en MFCs.

De acuerdo con estas publicaciones, las aristas principales de investigación y optimización se han centrado en la configuración de los reactores, así como también en la modalidad de alimentación de los mismos, las características de los materiales del ánodo y cátodo y en la naturaleza y estructura de las membranas separadoras. En este contexto, la utilización de orina focalizada en la producción de corriente eléctrica no sólo se debe al enorme volumen producido y a su alta disponibilidad, sino también a las ventajas competitivas que otorga su compleja y particular composición respecto de otros medios líquidos habitualmente utilizados como combustibles en MFCs, lo que ha llevado a valorar el potencial energético de la orina en función de los compuestos químicos excretados en ella.

### 1.4.1- Composición de la orina

La orina humana es un líquido de color ámbar transparente generado en los riñones. Estos funcionan como un filtro que tamiza la sangre, eliminando el exceso de agua y los residuos solubles. La orina está compuesta (aproximadamente) por un 95% en peso de agua y un 5% de sólidos disueltos (Santoro et al, 2020). La cantidad total de compuestos detectados en la orina varía en la bibliografía, principalmente porque muchos de ellos se encuentran en bajas concentraciones (trazas) y - fundamentalmente - porque dependen ampliamente de factores como el estilo de vida (sedentario/activo), el estado físico, la masa muscular, el género, las condiciones ambientales (temperatura, altitud, estación del año, porcentaje de humedad, entre otros) y/o las características nutricionales.

## Introducción

Estudios metabolómicos de la orina, es decir, estudios de detección e identificación de los productos químicos o metabolitos que genera el cuerpo humano y elimina a través de la orina, han permitido crear una base de datos a partir de resultados obtenidos mediante una amplia batería de técnicas - como Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución, Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, entre otras - revelando la complejidad composicional de la misma, con más de 2600 compuestos identificados a la fecha asociados a distintas condiciones fisiológicas (Bouatra et al, 2013). Esta complejidad ha sido abordada y simplificada identificando cuatro grandes familias de compuestos, de acuerdo con 68 sustancias mayoritarias que representan el 99% en peso de los solutos disueltos (Putnam, 1971). Sobre esta base, los sólidos disueltos en la orina pueden clasificarse como: (a) sales inorgánicas, (b) urea, (c) compuestos orgánicos (no urea) y (d) sales orgánicas de amonio. La **Tabla 1.3** muestra las concentraciones totales de los compuestos pertenecientes a cada grupo (primera columna) junto con la composición elemental (concentración de carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y azufre) diferenciada para cada uno.

**Tabla 1.3**

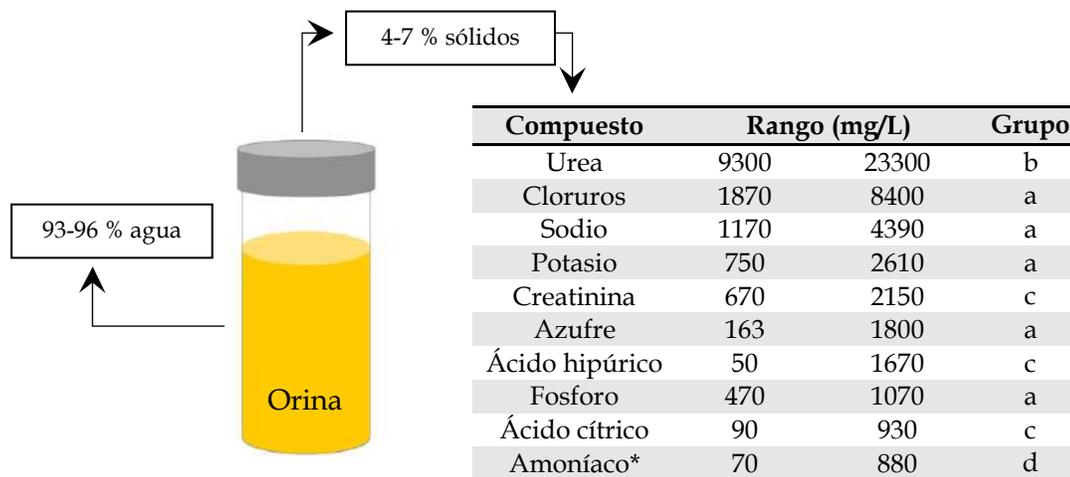
Clasificación de los compuestos principales de la orina y análisis elemental.

Grupos	Cantidad (mg/L)	C (mg/L)	N (mg/L)	O (mg/L)	H (mg/L)	S (mg/L)
(a) Sales inorgánicas	14157	100	0	1877	7	0
(b) Urea	13400	2680	6253	3573	893	0
(c) Compuestos orgánicos (no urea)	5369	2466	1211	1.231	347	134
(d) Sales orgánicas de amonio	4131	1630	659	1576	266	0
<b>TOTAL</b>	<b>37057</b>	<b>6876</b>	<b>8123</b>	<b>8.257</b>	<b>1513</b>	<b>134</b>

El grupo de sales inorgánicas (a) está formado principalmente por cloruro de sodio y de potasio. El ión cloruro es el de mayor concentración en la orina 'fresca' (recién obtenida) con valores promedios de 5135 mg/L, seguido por el sodio (2780 mg/L) y luego el potasio (1680 mg/L). Otros iones de concentración relevante son el calcio, el magnesio, los sulfatos y los fosfatos. La urea (b) presente en la orina es el producto terminal del metabolismo de proteínas y aminoácidos provenientes de los alimentos ingeridos. Es el compuesto orgánico con mayor concentración (13400 mg/L) y representa entre un 75% y un 90% del nitrógeno total. Los compuestos orgánicos (c) presentes en mayor concentración son la creatinina, el ácido hipúrico y el ácido cítrico, los que al pH de la orina (6-7) se encuentran en su forma disociada (hipurato y citrato). Precisamente, estos aniones forman parte de las

## Capítulo 1

principales sales de amonio (**d**) presentes (Putnam, 1971). La **Figura 1.6** esquematiza los diez principales compuestos de la orina ordenados por concentración promedio decreciente, haciendo hincapié en la clasificación mencionada.



**Figura 1.6.** Composición promedio de la orina humana. El 95 % (aproximadamente) es agua, mientras que solo un 5 % son sólidos disueltos. La tabla muestra la concentración de los principales compuestos disueltos. El \* indica concentraciones determinadas en orina fresca (recién obtenida).

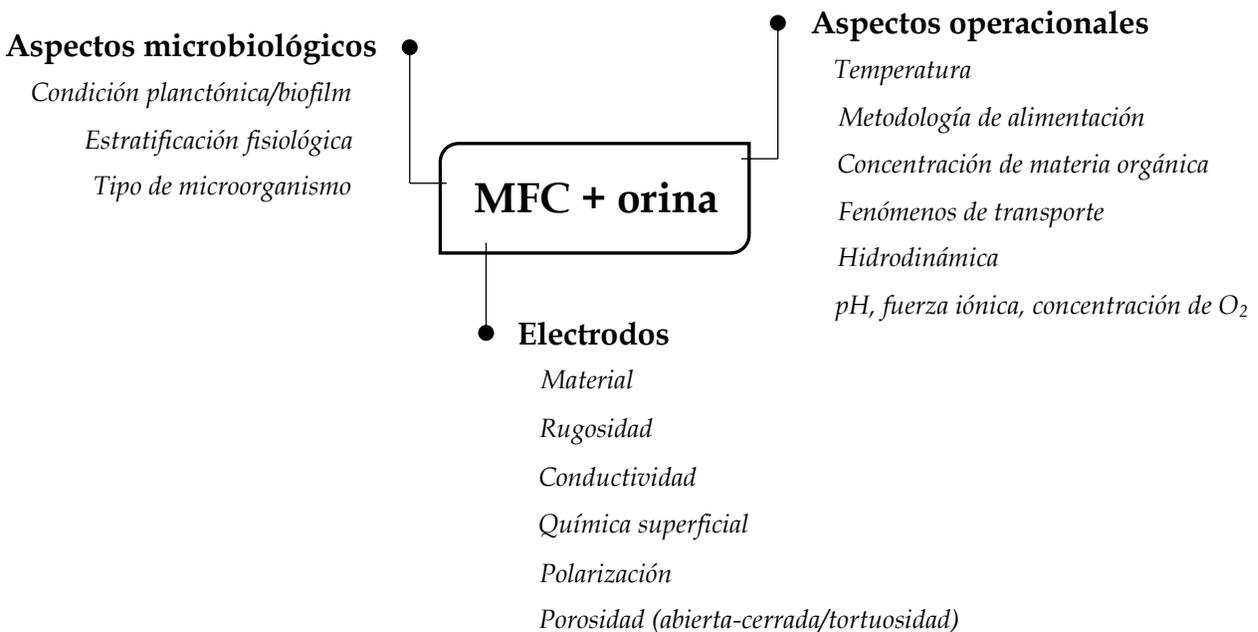
De los sólidos disueltos en la orina, el 60% aproximadamente corresponde a compuestos orgánicos (pertenecientes a los grupos b, c y d mencionados), los que podrían considerarse *a priori* como fuentes de carbono y electrones para el crecimiento bacteriano y consecuente producción de corriente eléctrica en MFCs. Como se mencionó, la orina posee también una gran cantidad de compuestos nitrogenados (sales de amonio) que pueden a su vez ser utilizados como fuente de nitrógeno para el crecimiento celular. Asimismo, y de relevancia directa respecto de su uso en MFCs, la orina se caracteriza por una elevada conductividad iónica, dada por la gran cantidad de sales disueltas que contiene. La presencia de estas sales es responsable de las bajas resistencias al transporte de iones en solución, minimizando caídas óhmicas y fenómenos de migración de especies cargadas cuando se la utiliza en MFCs (Putnam, 1971).

Estas características, sumadas a su alta disponibilidad y costos nulos de obtención, convierten a la orina en un combustible atractivo para las MFCs. Sin embargo, más allá de estos beneficios, el entusiasmo inicial en el área se ha visto comprometido a razón de un conjunto de **limitaciones** inherentes al funcionamiento de estas celdas (y en particular a su funcionamiento en presencia de orina), lo que ha restringido al día de hoy su implementación a escala piloto o industrial. En este contexto, es fundamental un abordaje multidisciplinario que permita identificar dichas limitaciones, de cara a la

optimización y aplicación concreta de esta tecnología con potencial aplicación en el campo de las energías alternativas.

### 1.4.2- Limitaciones en MFCs alimentadas con orina

Los estudios que han abordado la recuperación de energía a partir de orina en MFCs lo han hecho mediante la adopción de una pluralidad de enfoques. Esto ha permitido identificar los principales factores responsables de las **bajas densidades de corriente y potencia** que generalmente se obtienen. Entre estos factores se encuentran, por ejemplo, la competencia de otros microorganismos (principalmente microorganismos no electro-activos) por los compuestos oxidables disponibles en el compartimiento anódico, la baja tasa de reducción de oxígeno sobre los cátodos de las celdas, los problemas difusionales vinculados al transporte de materia orgánica y nutrientes, así como también limitaciones metabólicas asociadas propiamente a las bacterias electro-activas que crecen sobre el ánodo. La **Figura 1.7** muestra un esquema general de los principales factores que afectan el desempeño general de las MFCs en presencia de orina humana.



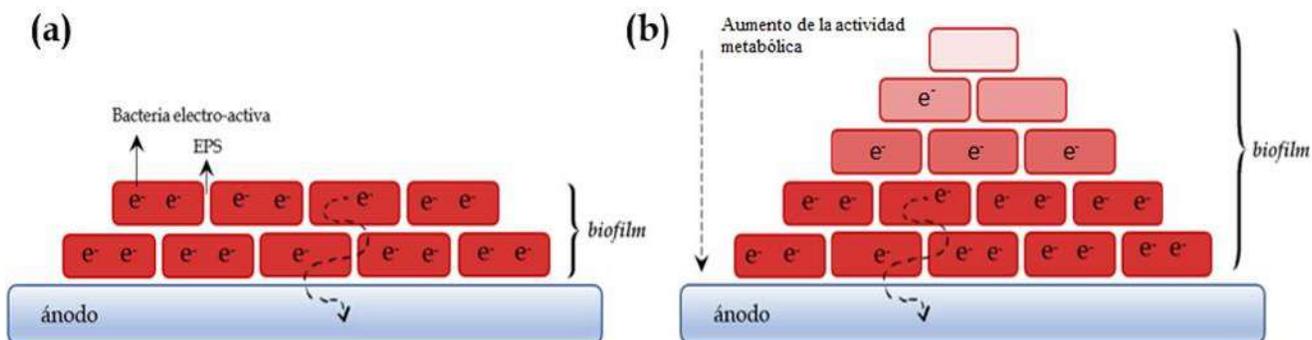
**Figura 1.7.** Núcleos de potencial optimización en MFCs alimentadas con orina.

En cuanto a los factores relacionados con las condiciones de operación de la celda, uno de los más relevantes es el pH en el compartimiento anódico. El aumento de pH que ocurre cuando se hidroliza la urea presente en la orina puede provocar la pérdida gradual de la viabilidad microbiana, repercutiendo directamente en el desempeño de recuperación de carga (Prudente et al, 2021). Otro tipo de limitación

## Capítulo 1

que conduce a la disminución de la actividad metabólica, y que no sólo ocurre en sistemas alimentados con orina, está asociado a la formación de agregados bacterianos ‘gruesos’ sobre la superficie del ánodo.

Se ha demostrado que ciertos tipos de bacterias electro-activas (por ejemplo, las del género *Geobacter*) tienen la capacidad de formar conglomerados bacterianos - llamados *biofilms* - de varios micrones de espesor sobre la superficie anódica (‘apilamiento’ de bacterias), lo que permite a los microorganismos alcanzar un arreglo funcional organizado sobre la superficie conductora (Bond et al, 2012; Yates et al, 2016). Estos *biofilms*, formados por bacterias embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas, restos celulares y ácidos nucleicos - denominados en su conjunto sustancias poliméricas extracelulares (EPS) - posibilitan la interacción con el ánodo de bacterias que no se encuentran en contacto directo con el mismo. Sin embargo, la formación de *biofilms* gruesos (por encima de  $\sim 50 \mu\text{m}$ ) conduce a una caída de potencial interna, debido a la resistencia eléctrica intrínseca del material biológico. Este fenómeno, conocido como *estratificación fisiológica*, induce a su vez una caída de la actividad metabólica celular de las bacterias que se encuentran más alejadas de la superficie conductora (Schrott et al, 2014) y conlleva, en el caso particular de los procesos microbianos de transferencia electrónica directa (como los que se abordarán en esta Tesis), a una disminución de la carga recuperada por bacteria por unidad de tiempo. La **Figura 1.8** muestra una representación esquemática de dicho fenómeno.



**Figura 1.8.** Esquema representativo de un *biofilm* electro-activo sobre la superficie anódica. **(a)** Para espesores ‘delgados’ de *biofilm* (hasta  $\sim 50 \mu\text{m}$ ), los microorganismos se encuentran metabólicamente activos. **(b)** Para espesores mayores, se produce una caída gradual de la actividad metabólica conforme aumenta la distancia a la superficie del electrodo (*estratificación fisiológica*), lo que disminuye la carga eléctrica recuperada por bacteria por unidad de tiempo (la actividad metabólica promedio del *biofilm* disminuye).

En los últimos años se ha estudiado particularmente la posibilidad de **incrementar el rendimiento del proceso oxidativo** mediante diferentes estrategias, algunas de ellas enfocadas en la interacción entre los microorganismos electro-activos y la superficie del ánodo. Una de estas estrategias ha sido diseñar

y optimizar **sistemas bio-híbridos** que garanticen el **contacto directo de la mayor cantidad de microorganismos con la superficie conductora**. Para esto, se han desarrollado **electrodos tridimensionales (3D) porosos** capaces de proveer una estructura abierta con elevada área superficial por unidad de volumen, de manera de lograr el crecimiento microbiano en el interior del electrodo (Xie et al, 2015). En este contexto, se ha demostrado que tanto el tamaño como la morfología de los poros son variables clave para la colonización y desarrollo bacteriano (Chong et al, 2019). Asimismo, se ha estudiado - tanto teórica como experimentalmente - el efecto de la porosidad sobre los perfiles hidrodinámicos desarrollados en el interior de los electrodos, con el objeto de controlar los procesos de transporte de masa y las fuerzas de corte a las que los microorganismos son sometidos (Picioreanu et al, 2000; Song et al, 2013). Así, los estudios a la fecha han demostrado que, **trabajando sobre la arquitectura de los ánodos**, es posible atenuar parte de las limitaciones microbiológicas e incrementar la carga eléctrica recuperada.

### **1.5- Ánodos microbianos: optimización para la generación de corriente eléctrica**

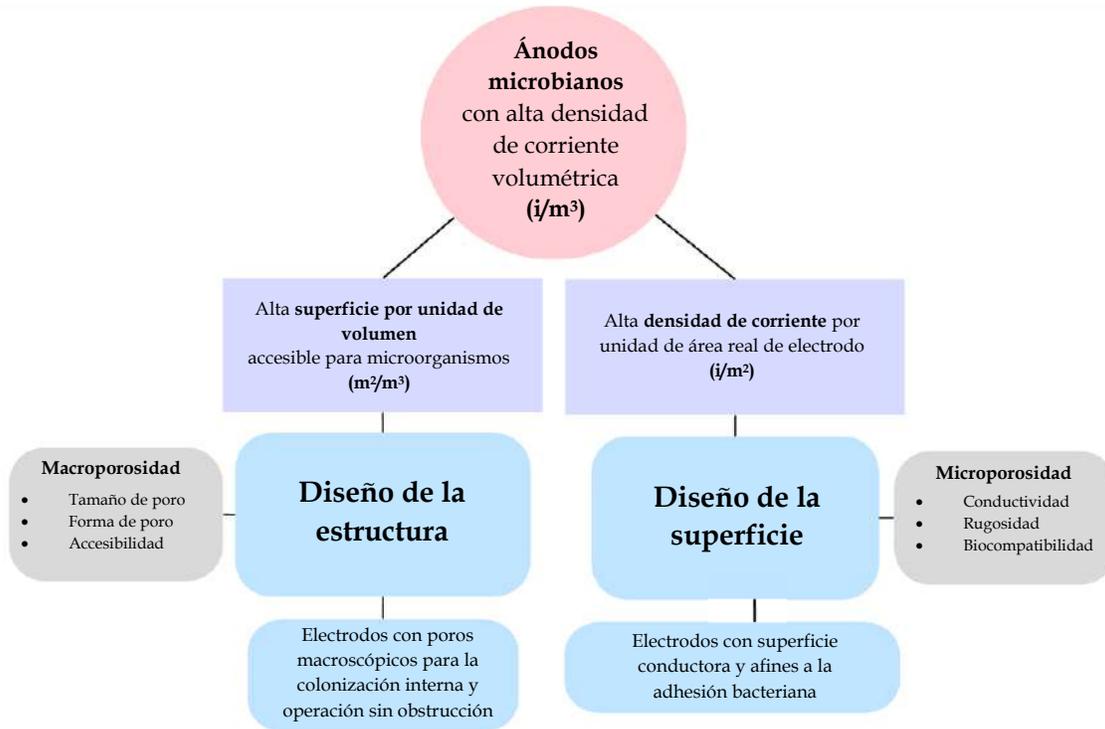
La optimización de los **ánodos microbianos** está dirigida a la obtención de estructuras capaces de generar una **elevada densidad volumétrica de corriente**. Este parámetro puede interpretarse como el producto entre la superficie específica del electrodo, es decir, la relación entre su área real y su volumen geométrico ( $m^2/m^3$ ), y la densidad de corriente por unidad de área ( $A/m^2$ ). Cada uno de estos parámetros se ve afectado a su vez por diferentes características de los electrodos, asociadas en mayor o menor medida a la macro- y micro-escala de los mismos.

La principal característica deseable en un ánodo microbiano - en términos de su *macro-escala* - es poseer una estructura porosa que, como ya se mencionó, favorezca el contacto con la mayor cantidad posible de bacterias electro-activas, garantizando a su vez los fenómenos de transporte de materia orgánica y nutrientes necesarios para el crecimiento y mantenimiento celular, facilitando simultáneamente los fenómenos de transporte vinculados a la eliminación de los productos metabólicos de desecho. Cuando estas consideraciones son tenidas en cuenta en el **diseño de la estructura**, suele observarse un aumento considerable del rendimiento en comparación con el obtenido utilizando electrodos no porosos (Romeo et al, 2017).

En lo que refiere a la *micro-escala*, se busca que los electrodos posean características que favorezcan la interacción con los microorganismos en términos de adhesión celular y transferencia electrónica. Para esto se busca obtener ciertas características superficiales, como alta rugosidad, bio-compatibilidad, hidrofiliidad y, por supuesto, alta conductividad eléctrica (Romeo et al, 2017). Estas y otras

características forman parte del **diseño de la superficie**, y pueden obtenerse a través del control sobre la química del material del ánodo o mediante la selección de recubrimientos superficiales ‘a medida’ con materiales específicos.

En la **Figura 1.9** se resumen los aspectos estructurales y superficiales mencionados.



**Figura 1.9.** Optimización de ánodos microbianos. El objetivo es alcanzar una elevada densidad volumétrica de corriente. Esto se puede lograr a través del diseño de la estructura y de la superficie del electrodo.

En este esquema de optimización, el diseño de ánodos porosos requiere además tener en cuenta aspectos termodinámicos y cinéticos del crecimiento bacteriano, contemplando las necesidades energéticas para la replicación microbiana en conjunto con los factores dinámicos asociados al proceso de transformación de la materia orgánica en carga eléctrica. Esto repercute directamente en la necesidad de diseñar poros abiertos ‘a medida’ con tamaños y morfologías adecuadas para permitir el acceso tanto de las bacterias electro-activas al interior de los electrodos como de la materia orgánica necesaria para su desarrollo. La colonización de los electrodos conlleva a un aumento progresivo de la biomasa en el interior de los mismos y, en consecuencia, un tamaño de poro no optimizado puede provocar la obstrucción de la estructura porosa (Chong et al, 2019). Asimismo, el material particulado proveniente de medios de alimentación sin tratamientos previos (filtración y/o precipitación), podría bajo ciertas condiciones contribuir también al ‘taponamiento’ de la matriz porosa. Este fenómeno se ha visto en aplicaciones tecnológicas como el tratamiento de aguas residuales, y podría representar un

## Introducción

inconveniente en sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina. Por estas razones, muchos de los electrodos porosos utilizados hoy día en estudios bio-electroquímicos no cumplen con las características adecuadas de acuerdo a la escala de tamaño de poro y arquitectura requerida para favorecer una actividad microbiana óptima. En este contexto, sólo unos pocos diseños de ánodos porosos han demostrado su potencial como ‘hábitats’ microbianos apropiados. Algunos de estos sistemas contemplan desde configuraciones de lecho compacto, mallas de acero inoxidable, fieltros/cepillos de carbono y textiles modificados con nanotubos de carbono hasta la mayoría de los **ánodos porosos monolíticos** (Xie et al, 2015).

A diferencia de los electrodos porosos formados por varias unidades conductoras interconectadas, como por ejemplo las mallas o fieltros basados en fibras de carbono, un ánodo poroso monolítico (APM) es aquel cuyo material está intrínsecamente interconectado en una única unidad estructural y que, además, posee porosidad abierta, es decir, accesible desde la superficie externa. Uno de los APM más utilizados en la actualidad es el carbono vítreo reticulado (RVC), también conocido como espuma de carbono. Este y muchos otros electrodos monolíticos se fabrican mediante procesos de pirolisis (en atmósfera inerte o reactiva) de matrices porosas (en este caso particular, la de una esponja polimérica). Sin embargo, esta no es la única forma de crear estructuras monolíticas porosas.

En los últimos años se ha estudiado el desarrollo de plataformas porosas jerárquicamente estructuradas para diferentes aplicaciones, para lo cual se han propuesto diversas vías de preparación de las mismas. Dentro de los diferentes enfoques abordados, la técnica de estructuración criogénica denominada *congelamiento direccional* ha demostrado ser una opción valiosa, brindando versatilidad a la hora de seleccionar los materiales que pueden ser utilizados y procesados de acuerdo con los requerimientos experimentales (Su et al, 2012; Zhang et al, 2005). Además, este método resulta particularmente atractivo ya que permite controlar de manera muy precisa tanto la morfología como el grado de orden de la porosidad a partir del manejo de las condiciones de congelamiento. Al respecto, la característica más sobresaliente de las estructuras obtenidas mediante congelamiento direccional es su morfología de tipo laminada (estructura tipo ‘milhojas’ de láminas equiespaciadas), lo que brinda la posibilidad de controlar - a partir de las condiciones de procesamiento - el espaciado interlaminar y la anisotropía de la porosidad resultante. Estas y otras características han posicionado a esta técnica como una herramienta versátil para el desarrollo de estructuras porosas funcionales de diferente naturaleza, capaces de ser utilizadas en diversas áreas de investigación y desarrollo en el campo de la Ciencia de Materiales (Deville, 2008; Guizard et al, 2014; Shahbazi et al, 2020).

De acuerdo con el esquema de optimización mostrado en la **Figura 1.9**, además de las características estructurales, la química superficial del ánodo juega un papel fundamental en el desempeño de recuperación de carga en procesos bio-electroquímicos. Es por esto que para la utilización de plataformas porosas como ánodos funcionales es necesario que su superficie cumpla además con los requerimientos mencionados de afinidad microbiológica (bio-compatibilidad), elevada conductividad eléctrica, estabilidad mecánica y química, rugosidad (lo cual favorece la adhesión microbiana), entre otros. Esto puede lograrse o bien mediante la modificación superficial de una estructura porosa preformada (en donde el material base sólo determina la morfología de la porosidad y la accesibilidad al interior de la estructura, mientras que la modificación superficial incorpora funcionalidad bio-electroquímica) (Baudler et al, 2016) o mediante la elección de un material que cumpla dichos requerimientos *per se*, pudiendo utilizarse este último para la fabricación de la propia estructura porosa (Massazza et al, 2015). En este último caso, la posibilidad de contar además con materiales a los que pueda modificarse su *estructura electrónica* es particularmente atractiva, especialmente cuando el principal objetivo es el desarrollo de electrodos (Massazza et al, 2018). Del abanico de opciones que existe en la literatura al respecto, el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) se ha destacado en los últimos años como punto de partida y material de elección para la preparación de plataformas porosas eléctricamente conductoras.

### 1.6- Óxidos de titanio eléctricamente conductores

La búsqueda de nuevas plataformas que puedan utilizarse - tanto desde el punto de vista electroquímico como microbiológico - para el desarrollo de ánodos porosos, ha dado lugar a la exploración de materiales de diversa naturaleza (metales, materiales de base carbono, óxidos) que permitan abordar simultáneamente los requerimientos estructurales y superficiales mencionados. En el área energética (generación, conversión, almacenamiento), el  $\text{TiO}_2$  ha surgido sin lugar a dudas como uno de los materiales de elección en las últimas décadas, tanto para su uso directo como también como punto de partida para el desarrollo de estructuras de conductividad eléctrica variable. De acuerdo con su estructura electrónica de bandas, el  $\text{TiO}_2$  (de fórmula general  $\text{TiO}_{2-x}$ , donde  $x$  representa una fracción de vacancias de oxígeno en la red cristalina) es un semiconductor de tipo  $n$ , el cual ha despertado particular interés en el campo de la *fotocatálisis* (Haider et al, 2019). Sin embargo, la misma característica que ha estimulado su uso extendido como fotocatalizador - su amplio *band-gap* energético (3.0-3.2 eV, dependiendo de su estructura cristalográfica) - ha limitado al mismo tiempo su rango de absorción de radiación a la zona ultravioleta del espectro solar.

## Introducción

En las últimas décadas se ha buscado extender este rango a la región visible, para lo cual se ha recurrido a la generación deliberada de defectos estructurales extendidos en la red cristalina del  $\text{TiO}_{2-x}$  (Chen et al, 2015). En el caso particular de óxidos con estructuras de tipo *rutilo*, éstos han demostrado ser excelentes plataformas para la ‘incorporación’ de múltiples defectos; ya sea desde vacancias de oxígeno y posiciones intersticiales, hasta planos de cizalladura (Diebold, 2003). Esto ha permitido no solo modular la energía de absorción del material, sino también producir estructuras que, dependiendo de las condiciones experimentales (por ejemplo, la temperatura de trabajo), puedan comportarse además como *conductores eléctricos*. Específicamente, las *vacancias de oxígeno* han demostrado tener particular *influencia sobre las propiedades eléctricas finales del material*. El estudio teórico y experimental del efecto producido por la incorporación de vacancias aniónicas en la estructura de óxidos ha demostrado también que, cuando intervienen en su composición metales que pueden existir en más de un estado de oxidación (como el caso del titanio), es posible controlar además de manera muy precisa la cantidad de portadores de carga (electrones para el caso de los óxidos de titanio) y la ocupación de la banda de conducción del material (Eyert et al, 2004; Liborio y Mallia, 2009; Tsujimoto et al, 2015). Se ha demostrado además que, si bien este efecto por sí sólo no garantiza conductividad eléctrica extendida en el material, es posible modular la deslocalización electrónica por modificación de las distancias óxido-metal en la estructura cristalina, lo que puede lograrse con la temperatura de trabajo.

En función de los estudios mencionados, y de acuerdo con los objetivos de esta Tesis, es de interés remarcar el enorme impacto que ha producido el  $\text{TiO}_2$  como material precursor de una serie de óxidos sub-estequiométricos conocidos como *fases de Magnéli*. Los óxidos pertenecientes a esta familia son compuestos de fórmula general  $\text{Ti}_n\text{O}_{2n-1}$ , donde  $n$  es un número entero comprendido generalmente entre 4 y 10. Estos compuestos se caracterizan por una elevada conductividad eléctrica a temperatura ambiente, la cual varía a lo largo de la serie en función del valor de  $n$  en la estructura (los óxidos con menor valor de  $n$  exhiben mayor conductividad). Al respecto, dentro de esta familia de sub-óxidos, el  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  es el material más atractivo desde el punto de vista electroquímico, debido a que presenta la conductividad eléctrica más elevada, complementada por una aceptable cinética de transferencia electrónica superficial (Inglis et al, 1973; Smith et al, 1998; Chen et al, 2015). Estas características, sumadas a su estabilidad química, han hecho del  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  un excelente material de electrodo, tanto en el campo de la investigación básica (por ejemplo, en el estudio de procesos de síntesis, procesos de oxidación de gases de combustión, entre otros) como también en la industria (sistemas de protección catódica de acero en concreto, fotocátalisis, tecnología de baterías, supercapacitores, entre otros) (Irooi et al, 2008; Maragatha et al, 2017; Nayak y Chaplin, 2018). En el caso particular de su utilización como

## Capítulo 1

electrodo, se ha demostrado que su uso como ánodo en celdas de combustible tradicionales ha mejorado considerablemente el rendimiento de éstas, lo que se ha asociado a la conductividad eléctrica del material como consecuencia de la gran cantidad de vacancias aniónicas de oxígeno que posee.

Además de sus propiedades eléctricas y de su consecuente uso en aplicaciones electroquímicas (fundamentalmente bajo condiciones agresivas, como pHs extremos, soluciones con altos contenidos de sales, medios corrosivos, entre otros), el  $Ti_4O_7$  resulta ser a su vez un candidato atractivo para su utilización en el área bio-electroquímica. Esto se debe a su demostrada bio-compatibilidad frente a bacterias electro-activas, lo que ha permitido el uso de este óxido conductor como interfase de contacto con estos microorganismos en procesos de transferencia electrónica directa sin provocar la inhibición de los mecanismos biológicos involucrados (Romeo et al, 2017).

De acuerdo con el marco teórico expuesto en el este capítulo, podemos reconocer la relevancia que tendría el desarrollo de nuevas estructuras conductoras que puedan utilizarse en contacto con microorganismos electro-activos para aumentar la eficiencia de recuperación de carga eléctrica en procesos bio-electroquímicos empleando orina humana como fuente energética.

*Esta Tesis se enfoca así en el diseño y la preparación de electrodos cerámicos de  $Ti_4O_7$  con porosidad estructurada por congelamiento direccional, para ser utilizados como plataformas para el crecimiento y colonización (dentro de los poros del material) de bacterias electro-activas capaces de degradar orina humana y generar corriente eléctrica útil.*

El punto de partida para el desarrollo de las estructuras porosas será la utilización de dispersiones acuosas de nanopartículas (NPs) comerciales de  $TiO_2$  (P25, Degussa), las que serán procesadas mediante la técnica de congelamiento direccional. La elección de estas NPs como bloques de construcción de los electrodos porosos se debe, por un lado, a la posibilidad de preparar dispersiones acuosas estables capaces de ser estructuradas criogénicamente y, por otro, a la posibilidad de contar con un material base precursor de la fase cristalográfica conductora de interés ( $Ti_4O_7$ ).

En esta Tesis se vinculan, a través del estudio de las propiedades de óxidos eléctricamente conductores y su interacción con microorganismos electro-activos, dos campos de investigación que confluyen en el área bio-electroquímica: la *Ciencia de Materiales* y la *Electro-microbiología*.

# Capítulo 2

## Motivación, hipótesis y objetivos

### 2.1- Motivación del trabajo propuesto

De acuerdo con el marco teórico descrito en el capítulo anterior es posible emplear orina humana en celdas de combustible microbianas (MFCs) para la recuperación de nutrientes y la generación simultánea de corriente eléctrica. Sin embargo, los fenómenos fisicoquímicos que se desencadenan durante la degradación microbiológica de la orina y las limitaciones inherentes al funcionamiento de las celdas repercuten a la hora de aprovechar este desecho corporal en los procesos de recuperación de carga. Dentro de las principales limitaciones, y de acuerdo con los objetivos del trabajo de Tesis, es de interés remarcar los siguientes aspectos vinculados a la caída en el desempeño anódico:

- ❖ Bajas eficiencias de recuperación de carga debido a fenómenos de estratificación fisiológica (como consecuencia del ‘apilamiento’ de microorganismos electro-activos sobre la superficie del ánodo).
- ❖ Factores condicionantes de la viabilidad microbiana (por ejemplo, el pH del medio) cuando se utiliza orina como combustible.
- ❖ Limitaciones asociadas al transporte de materia orgánica y nutrientes cuando se emplean ánodos porosos con porosidad tortuosa.
- ❖ Colonización microbiana deficiente dentro de los electrodos porosos cuando éstos presentan estructuras ‘cerradas’ y bajas superficies por unidad de volumen.

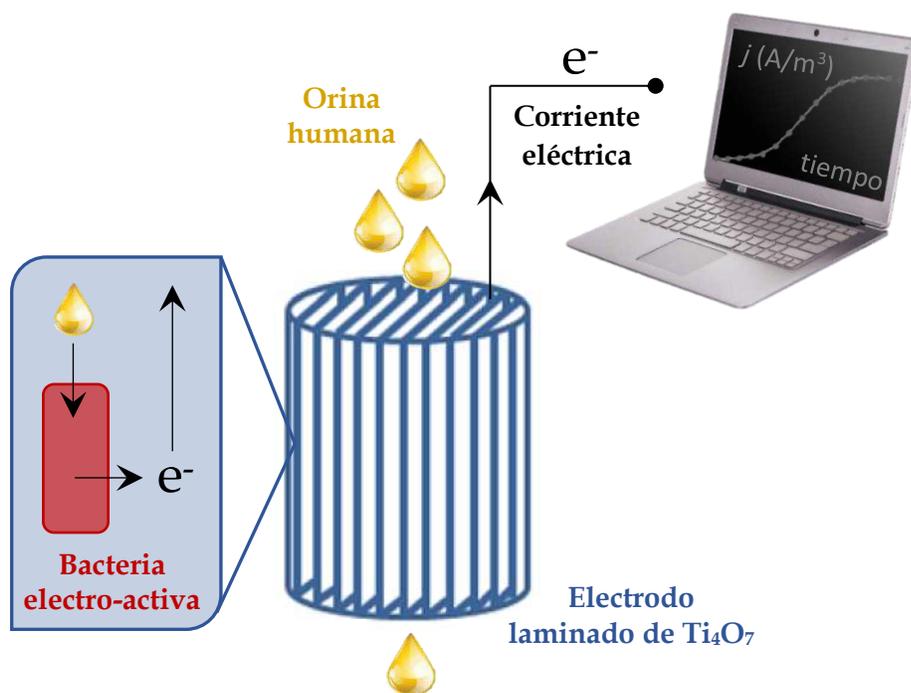
En este contexto aún quedan aristas por optimizar en el funcionamiento de los sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina, tanto desde el punto de vista operacional (por ejemplo, caudales de alimentación y concentración óptima de orina) como estructural (material y arquitectura de los

## Capítulo 2

electrodos - especialmente los ánodos -, tamaño de las celdas, entre otros), lo que ha dado lugar a la concepción de esta Tesis.

La principal **motivación** de este trabajo ha sido la de diseñar y preparar electrodos cerámicos de óxidos de titanio sub-estequiométricos ( $Ti_4O_7$ ) con porosidad anisotrópica (láminas alineadas longitudinalmente a lo largo del electrodo) para ser utilizados como ánodos microbianos capaces de generar eficientemente corriente eléctrica a partir de orina humana en sistemas bio-electroquímicos.

La **Figura 2.1** representa gráficamente esta idea:



**Figura 2.1.** Esquema representativo de la idea/motivación del presente trabajo de Tesis.

La búsqueda de porosidad anisotrópica (obtenida mediante la técnica de *congelamiento direccional*) se focalizó, por un lado, en la posibilidad de contar con ánodos que puedan emplearse bajo una modalidad de *flujo continuo de orina a través* de su estructura porosa. Esto favorecería *a priori* los fenómenos de transporte de materia orgánica y nutrientes a lo largo de todo el volumen del electrodo. Asimismo, el desarrollo de estructuras con morfología laminada permitiría utilizar la distancia interlaminar como parámetro para controlar el 'tamaño de poro' y, en consecuencia, la accesibilidad microbiana al interior del electrodo. De igual modo, el control sobre la arquitectura porosa permitiría modular la superficie electroquímicamente activa por unidad de volumen de ánodo. Estas características, sumadas a la utilización de un material de electrodo bio-compatible con excelentes

propiedades eléctricas, permitirían aprovechar la superficie del óxido conductor como plataforma para el crecimiento y proliferación de bacterias electro-activas.

En la **primera sección experimental** de la Tesis (*Capítulo 4*) se presentan estudios de **producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito** como ánodos de celdas bio-electroquímicas. En este capítulo se detalla un protocolo de enriquecimiento de bacterias electro-activas (obtenidas a partir de un lodo cloacal doméstico) capaces de degradar los componentes de la orina humana y generar corriente eléctrica, así como los estudios de identificación de dichos microorganismos. Luego se describe el efecto de la concentración de orina sobre la viabilidad microbiana y se introduce un estudio teórico de simulación de las densidades de corriente a partir de un modelo termodinámico aplicado al metabolismo microbiano. El objetivo de esta primera parte del trabajo fue obtener, a partir de una fuente natural, una población microbiana mixta (electro-activa y no electro-activa) capaz de degradar orina y producir carga eléctrica, así como establecer un rango óptimo de concentraciones de orina en el cual los microorganismos electro-activos permanezcan metabólicamente viables. Los resultados de esta sección se utilizaron para fijar las condiciones experimentales empleadas en la última parte del trabajo (Capítulo 6).

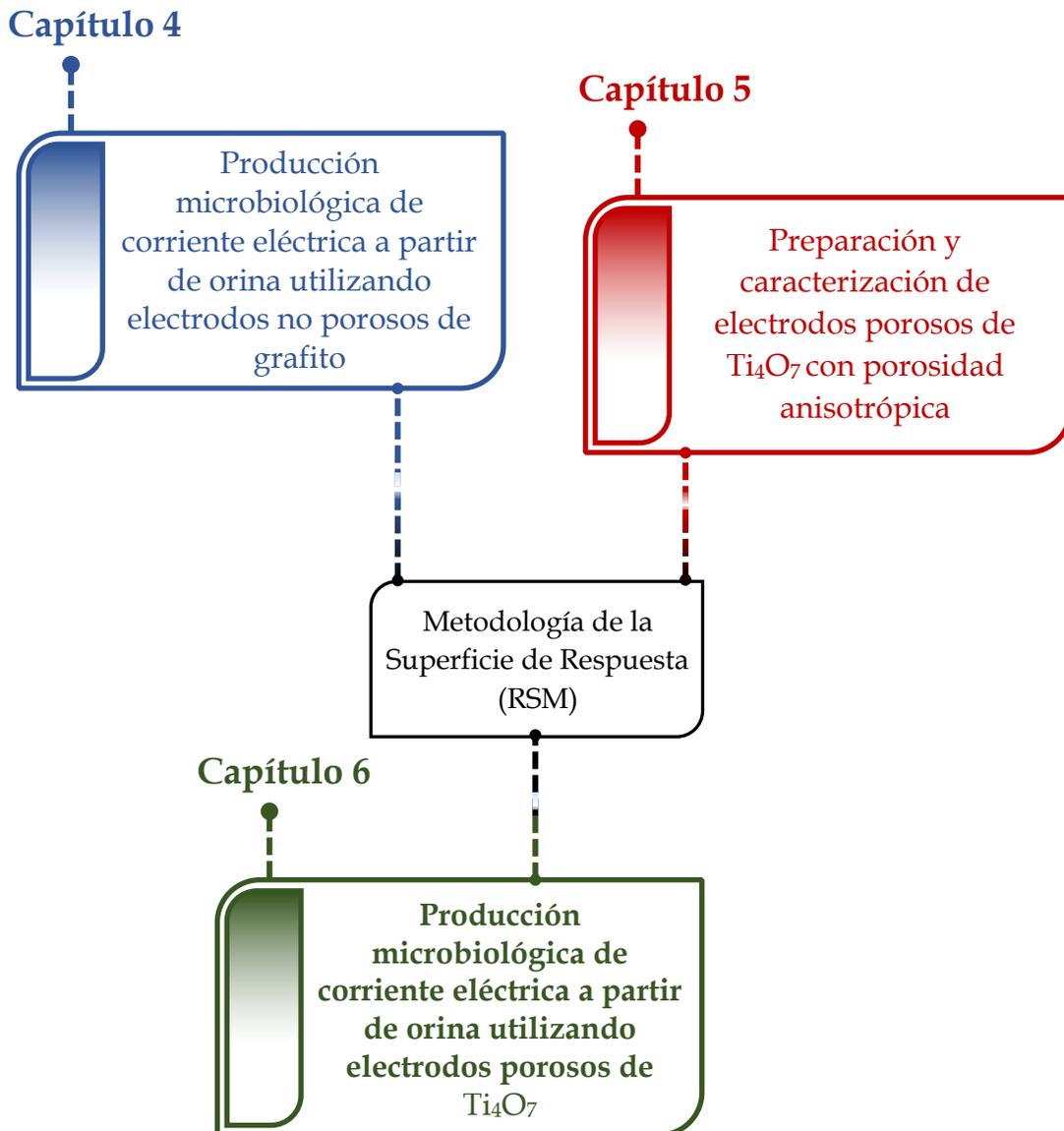
En la **segunda sección experimental** (*Capítulo 5*) se presenta el **diseño, preparación y caracterización fisicoquímica de electrodos porosos de  $Ti_4O_7$  con porosidad anisotrópica** obtenidos por congelamiento direccional. Esta sección discute las variables de procesamiento que controlan las características estructurales de los electrodos, en particular, el espaciado interlaminar y la superficie específica por unidad de volumen. El objetivo de esta sección fue obtener electrodos con elevada porosidad y conductividad eléctrica, generando estructuras con baja tortuosidad y alta superficie electroquímicamente activa para su utilización como ánodos microbianos. Los resultados de este capítulo se emplearon en la última parte del trabajo (Capítulo 6) para relacionar las propiedades estructurales de los electrodos con las densidades volumétricas de corriente obtenidas en función de la concentración de orina.

En la **última sección** (*Capítulo 6*) se presenta el estudio de la **combinación de los microorganismos electro-activos obtenidos a partir del lodo cloacal y los electrodos porosos de  $Ti_4O_7$  desarrollados**, con el objeto de producir corriente eléctrica en sistemas operados bajo condiciones de flujo continuo de orina a través de la estructura porosa de los electrodos. El objetivo de esta sección final fue evaluar los nuevos electrodos híbridos desarrollados y predecir las condiciones óptimas de concentración de orina y espaciado interlaminar que conducen a la maximización de la corriente generada por unidad de volumen de ánodo microbiano. El estudio se llevó a cabo dentro del marco estadístico de la Metodología

## Capítulo 2

de la Superficie de Respuesta (RSM), seleccionándose la concentración de orina y el espaciado interlaminar como las variables experimentales bajo control, construyendo superficies de densidad volumétrica de corriente como variable de respuesta.

A continuación, se muestra un esquema de la estructura del trabajo de Tesis de acuerdo con cada una de las secciones mencionadas.



## 2.2- Hipótesis planteadas

Las *hipótesis* de este trabajo son:

- ❖ Es posible enriquecer, a partir de lodos cloacales domésticos, microorganismos electro-activos capaces de ser utilizados en presencia de orina humana para la producción de corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos.
- ❖ El control sobre las variables de procesamiento (*congelamiento direccional*) permite modular a voluntad la porosidad y estructuración final de los electrodos de  $Ti_4O_7$ .
- ❖ La porosidad abierta de los electrodos y su morfología laminar facilitan la colonización bacteriana en su interior, así como los fenómenos de transporte de materia orgánica, nutrientes y productos de desecho metabólico.
- ❖ El control sobre la estructura de los electrodos permite modular el área superficial por unidad de volumen y, en consecuencia, el área de contacto efectiva entre los microorganismos electro-activos y la superficie conductora.
- ❖ El aumento del área de contacto entre las bacterias electro-activas y la superficie del electrodo conduce a un incremento de la densidad volumétrica de corriente.
- ❖ El uso de óxidos de titanio conductores (fases de Magnéli, en particular  $Ti_4O_7$ ) como material de electrodo permite lograr una mayor eficiencia en la transferencia electrónica bacteriana, debido a su mayor conductividad eléctrica en comparación con los materiales carbonosos típicamente utilizados como ánodos en el área bio-electroquímica.

## 2.3- Objetivos del trabajo de Tesis

El **Objetivo General** de esta Tesis es desarrollar electrodos bio-híbridos porosos ( $Ti_4O_7$ /bacterias electro-activas) capaces de producir corriente eléctrica a partir de orina humana, contribuyendo a la comprensión de los fenómenos y variables que controlan los procesos de recuperación de carga eléctrica en los sistemas híbridos desarrollados.

De acuerdo con este objetivo general, se plantean los siguientes **Objetivos Específicos**:

- ❖ Enriquecer e identificar, a partir de efluentes cloacales domésticos, consorcios bacterianos capaces de producir corriente eléctrica a partir de orina humana.
- ❖ Evaluar la influencia de las variables de procesamiento criogénico sobre el tamaño y la morfología de los poros generados en los electrodos de  $Ti_4O_7$ .
- ❖ Seleccionar las condiciones óptimas para los tratamientos térmicos y químicos de las matrices cerámicas de  $TiO_2$  (precuroras de los electrodos de  $Ti_4O_7$ ) que permitan la consolidación

## Capítulo 2

estructural de las mismas y la obtención de la fase cristalográfica responsable de la conductividad eléctrica ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ).

- ❖ Evaluar la adherencia y proliferación de consorcios bacterianos en el interior de los electrodos preparados en función del espaciado interlaminar generado.
- ❖ Evaluar la producción de corriente eléctrica a partir de orina humana utilizando los electrodos bio-híbridos bajo una modalidad de alimentación continua de tipo *flujo a través*.
- ❖ Aplicar métodos estadísticos multivariados (metodología de la superficie de respuesta, RSM) para predecir las condiciones óptimas estructurales y de operación de los ánodos microbianos que conducen a la maximización de la densidad volumétrica de corriente.

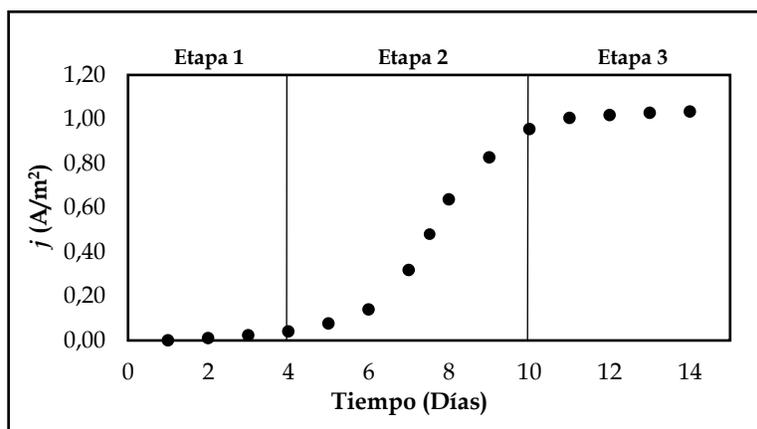
# Capítulo 3

## Técnicas de análisis y caracterización

En este capítulo se resumen las técnicas utilizadas en el trabajo de Tesis para caracterizar los materiales preparados y el desempeño electroquímico/bio-electroquímico de los electrodos híbridos desarrollados.

### 3.1- Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroquímica en la que el electrodo de trabajo es sometido a un potencial constante y la corriente generada en este se registra y grafica en el tiempo. La **Figura 3.1** muestra un perfil típico de una cronoamperometría obtenida en una celda de tres electrodos *biótica* (por ejemplo, a partir de un electrodo de grafito colonizado por microorganismos electro-activos) bajo alimentación continua. El aumento de la densidad de corriente eléctrica sobre el electrodo está asociado a los procesos de catálisis bacteriana.



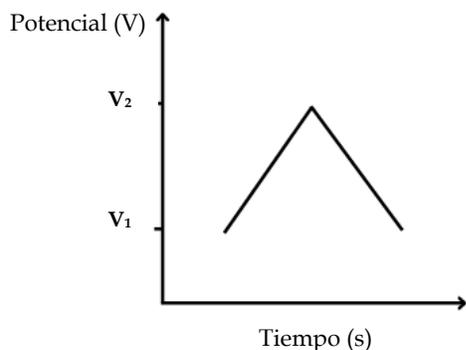
**Figura 3.1.** Cronoamperometría 'típica' en una celda *biótica* de tres electrodos con alimentación continua. El tiempo de evolución de cada etapa depende de los microorganismos involucrados y las condiciones experimentales utilizadas.

En la primera etapa del proceso (**Etapa 1 - Figura 3.1**) la corriente medida sobre el electrodo es incipiente y corresponde a la *fase lag* o de latencia, donde las bacterias se adaptan al medio de cultivo y comienzan a interactuar con el electrodo. El mayor aumento de la corriente eléctrica en el tiempo se da en la segunda etapa, conocida como *fase de crecimiento exponencial* (**Etapa 2 - Figura 3.1**), la que corresponde al crecimiento bacteriano sobre el electrodo, utilizando su superficie como sumidero de los electrones provenientes de la oxidación de los compuestos presentes en el medio. Esta etapa coincide con la mayor velocidad de crecimiento de la biomasa. Finalmente, en la tercera etapa (**Etapa 3 - Figura 3.1**), conocida como *fase estacionaria*, se alcanza una corriente invariante en el tiempo cuando la cantidad de bacterias se mantiene constante. Como se mencionó, este perfil cronoamperométrico corresponde a una modalidad de alimentación *continua* de medio de cultivo. Esto permite mantener constante la concentración de compuestos químicos en las celdas y así obtener corrientes estables en el tiempo. En el caso de trabajar bajo una modalidad *batch* (suplementación inicial de medio de cultivo sin renovación en el tiempo), se observaría una cuarta etapa de muerte celular, donde la disminución en la concentración de los compuestos utilizados como alimentación ya no permite mantener una corriente estable, observándose una caída final de la misma.

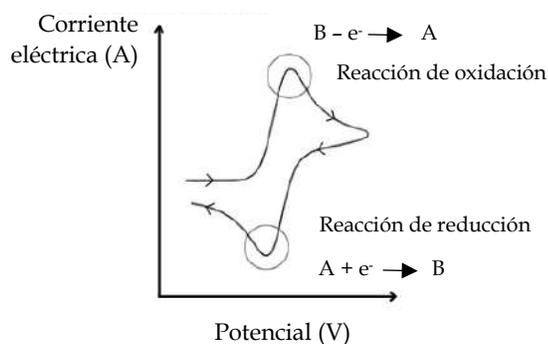
Esta técnica se empleó en el marco de la Tesis para evaluar la producción de corriente eléctrica a partir de electrodos de grafito colonizados por bacterias electro-activas (Capítulo 4) y de los nuevos electrodos bio-híbridos de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  desarrollados (Capítulo 6), utilizando en todos los casos celdas bio-electroquímicas de tres electrodos como reactores experimentales. El potencial seleccionado para la evaluación de los electrodos fue de 0.2 V *vs* Ag/AgCl. Para esto se empleó un potenciostato Autolab 105 PGSTAT 101, controlado por el software NOVA 1.6.

### 3.2- Voltametría cíclica (CV)

La voltametría cíclica (CV, por *cyclic voltammetry*) es una técnica electroquímica que permite detectar procesos de transferencia de carga sobre la superficie del electrodo de trabajo (conocidos como procesos *faradaicos*) así como también procesos de acumulación de carga en la interfase electrodo/solución (conocidos como procesos *capacitivos*) en función del potencial externo aplicado. Para esto la técnica consiste en la aplicación de una perturbación en el potencial (V) del electrodo de trabajo, la cual puede cambiar, por ejemplo, linealmente con el tiempo, como se muestra en la **Figura 3.2**. La corriente que fluye a través del electrodo se registra y grafica finalmente en función del potencial aplicado. Este gráfico es conocido como *voltagrama* y se muestra en la **Figura 3.3** para una reacción reversible típica.



**Figura 3.2.** Cambio lineal del potencial (V) del electrodo de trabajo en función del tiempo en una voltametría cíclica.



**Figura 3.3.** Voltagrama: corriente eléctrica (A) vs potencial (V).

El potencial inicial  $V_1$  (Figura 3.2) se selecciona generalmente en un valor donde no se observe corriente asociada a una reacción química para el sistema bajo estudio. En el caso de una voltametría cíclica de barrido lineal, el potencial se hace variar linealmente hasta un valor  $V_2$  a partir del cual se invierte la dirección de avance y el potencial aplicado al electrodo regresa al valor inicial. Los valores de los potenciales  $V_1$  y  $V_2$  se seleccionan en general de manera de abarcar un amplio rango, en el cual se encuentre la reacción de interés.

Los barridos hacia potenciales positivos (derecha en el ejemplo de la **Figura 3.3**) se denominan anódicos, ya que inducen reacciones de oxidación sobre el electrodo polarizado. Por el contrario, cuando el barrido se realiza hacia potenciales negativos (izquierda) se inducen reacciones de reducción (barrido catódico). El ciclo de barrido de potenciales suele realizarse varias veces hasta alcanzar valores estacionarios de corriente, y la velocidad a la que se realiza el mismo (variación del potencial con el tiempo) puede modificarse para obtener información acerca de la velocidad de las reacciones en el electrodo. Esta velocidad está dada por la pendiente de las rectas en la **Figura 3.2**.

Esta técnica se utilizó (Capítulos 4 y 6) para la detección de los procesos *redox* asociados a la transferencia de carga eléctrica entre los microorganismos electro-activos involucrados en la producción de corriente y los electrodos sobre los cuales crecieron. Asimismo, se utilizó esta técnica para la determinación del área por unidad de volumen de los electrodos de  $Ti_4O_7$  desarrollados (Capítulo 5), como se resume en la siguiente sección. Los estudios de voltametría cíclica se realizaron utilizando un potenciostato Autolab 105 PGSTAT 101, empleando diferentes rangos de potencial (de acuerdo con el sistema estudiado) y usando diferentes velocidades de barrido (de 1 a 10 mV/s) en función del objetivo abordado.

### 3.2.1- Determinación de áreas mediante voltametría cíclica

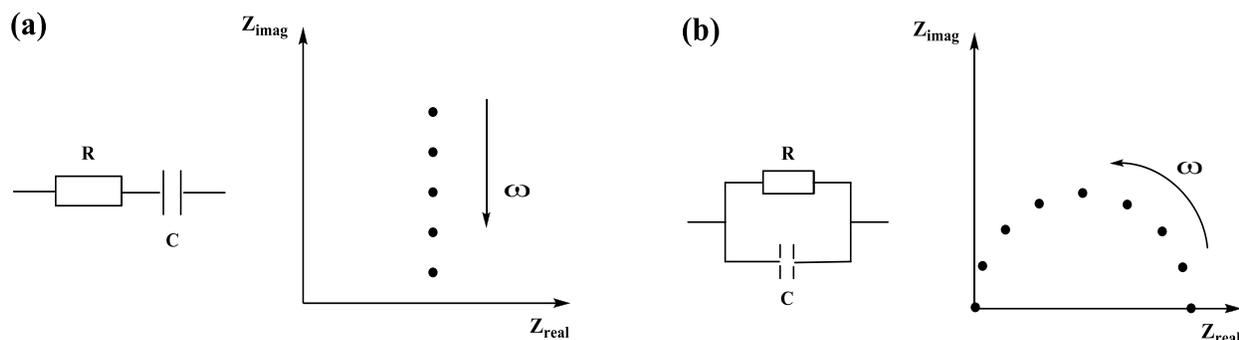
El área superficial volumétrica de materiales conductores puede ser calculada a partir de valores de capacitancia de doble capa eléctrica ( $C_{dl}$ ) obtenidos por voltametría cíclica en solución. La determinación de  $C_{dl}$  se realiza modificando la velocidad de barrido de potencial a la que se somete el electrodo de trabajo, midiendo la respuesta en corriente (asociada a la migración de especies cargadas hacia la superficie del electrodo) para cada velocidad. El área superficial electroquímicamente activa puede finalmente determinarse dividiendo  $C_{dl}$  por la capacitancia efectiva ( $C_{efectiva}$ ) propia del material de electrodo bajo estudio, donde  $C_{efectiva}$  es la capacidad asociada a la polarización del material, debido a la separación y acumulación de portadores de carga en la superficie del mismo.

La determinación del área superficial volumétrica de los electrodos de  $Ti_4O_7$  se realizó con un potenciostato VoltaLab10 PGZ-100 (Radiometer Analytical). Esta, se aborda en el Capítulo 5, y los cálculos correspondientes se detallan en el Anexo B.

### 3.3- Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Cuando se aplica un potencial ( $V$ ) a un sistema electroquímico se produce un flujo de corriente ( $i$ ) a través de éste, cuyo valor estará determinado por el mecanismo de transporte que tenga lugar en el sistema. En particular, si el potencial aplicado es sinusoidal, la respuesta obtenida también lo será. La relación que existe entre el potencial sinusoidal aplicado y la corriente resultante es conocida como *impedancia* ( $Z$ ), la cual tiene una magnitud  $V(t)/i(t)$ . Los diferentes procesos que ocurren a nivel electroquímico ‘absorben’ energía eléctrica a frecuencias discretas, provocando consecuentemente una demora temporal entre la señal de entrada y de salida (respuesta), la cual se mide a través de un ángulo de fase ( $\theta$ ). Por este motivo, la impedancia representa una cantidad *vectorial* en el plano complejo.

Si se aplica un potencial sinusoidal a un elemento resistivo puro, la magnitud de  $Z$  será igual a la resistencia, y la fase será igual para todas las frecuencias evaluadas. En un gráfico de componente imaginaria ( $Z_{imag}$ ) en función de la componente real ( $Z_{real}$ ), este caso particular queda representado como un vector sobre el eje real. Por otro lado, si la señal sinusoidal es aplicada a un capacitor puro, la  $Z$  será independiente de la frecuencia, y el ángulo de fase será de  $90^\circ$ . La representación gráfica en este caso será un vector sobre el eje imaginario. El resultado de combinar componentes resistivos y capacitivos en un sistema (en serie o en paralelo) es fácilmente reproducible, y las gráficas resultantes pueden ser apreciadas en la **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Espectros de impedancia en el plano complejo. (a) Resistencia y capacitor *en serie*; (b) Resistencia y capacitor *en paralelo*.

A diferencia de las técnicas de corriente continua, la espectroscopía de impedancia permite obtener separadamente los valores de resistencia (R) y capacidad (C) asociados a las diferentes partes constituyentes del sistema bajo estudio. Generalmente, para el análisis de los resultados es conveniente disponer de un circuito equivalente (construido a partir de la combinación de elementos resistivos y capacitivos) para la representación del comportamiento y realidad física del sistema.

En este trabajo se utilizó la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, por *electrochemical impedance spectroscopy*) para determinar la capacidad efectiva ( $C_{\text{efectiva}}$ ) del material de los electrodos porosos ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ), con el objeto de determinar el área superficial volumétrica de los mismos. Este estudio se aborda en el Capítulo 5. Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente utilizando un impedancímetro Gamry Ref600, en el intervalo de frecuencias  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^{-2}$  Hz, empleando una solución 0.1 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como electrolito soporte, un electrodo de calomel saturado (SCE) como referencia y un alambre de platino bobinado como contra-electrodo. Los detalles se abordan en el Anexo B.

### 3.4- Difracción de rayos X de polvos (XRD)

La técnica de difracción de rayos X (XRD, por *X-ray diffraction*) es un método no destructivo que permite caracterizar materiales con cierto grado de cristalinidad. Proporciona información sobre la distribución espacial de los átomos (o iones) en estructuras cristalinas, así como también de otros parámetros estructurales, como el tamaño medio de grano, el grado de cristalinidad, la presencia de defectos, entre otros.

Los rayos X son una clase particular de radiación electromagnética de elevada energía, cuya longitud de onda es del orden de magnitud de los espaciados interatómicos existentes en los materiales

sólidos cristalinos. Cuando una muestra es irradiada con rayos X, la interacción con la luz incidente produce - en el caso de que exista una disposición ordenada de los átomos - un fenómeno de difracción e interferencia constructiva cuando las condiciones satisfacen la Ley de Bragg. En estos casos, se producen patrones de difracción cuyas intensidades y posiciones en el difractograma resultante están determinadas por la distribución de los átomos dentro de la red. La relación que existe entre la posición de los picos de difracción y los espaciados interatómicos característicos permite la identificación del compuesto bajo estudio.

En este trabajo de Tesis se utilizó difracción de rayos X para el análisis de las fases inorgánicas precipitadas sobre los electrodos de trabajo evaluados en presencia de orina humana (Capítulo 4). Asimismo, se empleó para la caracterización de los polvos comerciales de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (Aeroxide P25/Degussa) utilizados para la preparación de los electrodos porosos y para la identificación de la fase conductora Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (Capítulo 5).

Los análisis de las muestras en polvo se realizaron usando un difractómetro PANalytical X'Pert Pro, empleando radiación de Cu K<sub>α</sub> ( $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ ). En todos los casos se empleó un voltaje acelerador de 40 kV y una corriente de 30 mA, abarcando la región de  $2\theta$  (ángulo de difracción) comprendida entre 10 y 80°, utilizando una velocidad de barrido de 1°/min.

### 3.5- Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido (SEM, por *scanning electron microscopy*) es una técnica que permite obtener información morfológica/topográfica de la superficie de una muestra, produciendo imágenes de alta resolución a partir de la interacción de un haz de electrones con la materia. Para esto el equipo cuenta con un filamento por el que se hace circular una corriente, al cual se aplica una diferencia de potencial para inducir la emisión del haz de electrones que impactará - luego de ser enfocado mediante un sistema de lentes electro/magnéticos - sobre la muestra. La detección de los electrones dispersados por la superficie (denominados electrones secundarios) permite crear una imagen que refleja las características de la misma.

En este trabajo se utilizó microscopía electrónica de barrido para el análisis superficial de electrodos de grafito colonizados por microorganismos electro-activos (Capítulo 4), para la determinación de los espaciados interlaminares de los electrodos de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> con porosidad anisotrópica (Capítulo 5) y para la caracterización de estos últimos en presencia de bacterias electro-activas (Capítulo 6).

Las observaciones fueron realizadas con un microscopio Jeol (JSM-6460LV), previo recubrimiento de las muestras con una delgada película de Au/Pd.

### 3.6- Fijación de microorganismos

Para la visualización por SEM de los microorganismos crecidos sobre la superficie de los electrodos debe realizarse un proceso previo de *fijación química*, de manera de preservar la estructura y morfología bacteriana. Este procedimiento implica el tratamiento inicial de las muestras (electrodos de grafito y de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> colonizados) con una solución de glutaraldehído (GTA), el cual forma ‘puentes’ entre las moléculas del tejido bacteriano. Posteriormente, las muestras tratadas con GTA son sometidas a un proceso de deshidratación progresiva mediante la inmersión en soluciones de etanol de concentración creciente. La **Tabla 3.1** muestra el protocolo desarrollado para los distintos tipos de muestras.

**Tabla 3.1**

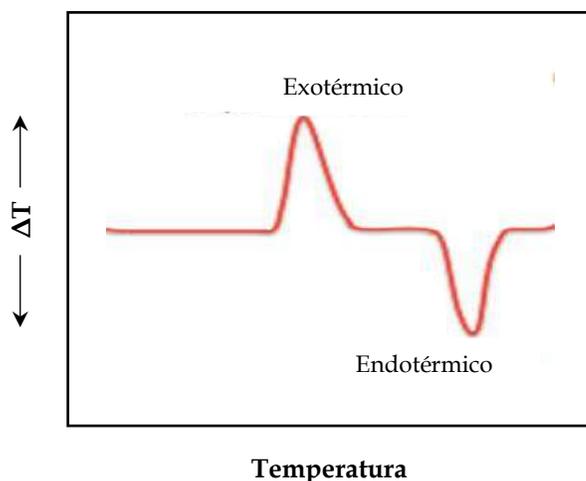
Protocolos de fijación para electrodos de grafito y Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> colonizados

Electrodos de grafito				Electrodos de Ti <sub>4</sub> O <sub>7</sub>			
Paso	Solución	Concentración (%)	Tiempo (min)	Paso	Solución	Concentración (%)	Tiempo (min)
1	GTA	2,5	15	1	GTA	2,5	40
2	Etanol	30	10	2	Etanol	30	10
3	Etanol	40	10	3	Etanol	40	10
4	Etanol	60	10	4	Etanol	60	10
5	Etanol	80	10	5	Etanol	80	10
6	Etanol	100	10	6	Etanol	100	10

### 3.7- Análisis térmico diferencial (DTA)

Bajo la denominación de *análisis térmico* suele englobarse un conjunto de técnicas analíticas que permiten estudiar el comportamiento de los materiales frente a la temperatura. En particular, el análisis térmico diferencial (DTA, por *differential thermal analysis*) es una técnica en la cual se registra la diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) entre una muestra y un material de referencia inerte (por ejemplo, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en función de la temperatura, de acuerdo con un programa de calentamiento/enfriamiento controlado. Los cambios diferenciales de temperatura entre la muestra y la referencia (ya sean derivados de procesos endotérmicos o exotérmicos) son finalmente graficados en función del tiempo o de la temperatura, dando lugar al *termograma* resultante, el cual proporciona información sobre las transformaciones que ocurren en la muestra de interés, tales como procesos de fusión, cristalización,

transiciones vítreas, reacciones químicas, entre otros. Estos eventos se manifiestan como ‘picos’ o ‘valles’ en el termograma, tal como se observa a modo de ejemplo en la **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Termograma DTA. Los picos y valles representan diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia a una determinada temperatura.

Esta técnica se empleó (Capítulo 5) para el estudio de las transiciones térmicas de las piezas de PVP/TiO<sub>2</sub> precursoras de los electrodos de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. Para esto se utilizó un equipo Shimadzu DTA-50H, evaluando las muestras en atmósfera de aire a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

### 3.8- Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, por *thermogravimetric analysis*) es una técnica utilizada para estudiar los cambios en la masa de una muestra en función de la temperatura, mientras se la somete a un programa controlado de calentamiento o enfriamiento. Este análisis proporciona información relevante sobre diversos procesos que ocurren en una muestra, como la pérdida de humedad, transiciones de fase o descomposición de compuestos. Esta técnica se utilizó (Capítulo 5) para la determinación de las condiciones de tratamiento térmico para el sinterizado de las piezas cerámicas porosas de TiO<sub>2</sub>. Para esto se empleó un equipo Shimadzu TGA-50H, sometiendo las muestras a una atmósfera de aire a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

### 3.9- Medidas eléctricas: determinación de la resistencia eléctrica

El comportamiento eléctrico de los electrodos porosos de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> se evaluó a partir de medidas de corriente (A) en función de la tensión (V) aplicada a diferentes temperaturas. Para esto se utilizó una fuente de tensión variable (Siglent SPD3303D), un amperímetro (Rigol DM3062) y un sistema de control

de temperatura en una celda de medición. Conociendo la relación entre la corriente eléctrica y la tensión aplicada (para las diferentes temperaturas evaluadas) se determinó la resistencia eléctrica de las muestras, empleando para esto la Ley de Ohm. En la Sección 5.5.1 del Capítulo 5, se detalla este procedimiento realizado sobre electrodos de  $Ti_4O_7$ .

### 3.10- Medidas de densidad aparente y porosidad

La determinación de la densidad aparente de las muestras porosas sinterizadas se llevó a cabo por el método de Arquímedes, utilizando en este trabajo agua destilada como fluido. Este método consiste en la determinación de la masa de la muestra seca ( $m_{seca}$ ), la masa de la muestra sumergida en agua ( $m_{sumergida}$ ) y la masa de la muestra saturada de agua ( $m_{saturada}$ ). A partir de estas medidas y de la densidad del agua ( $\rho_{agua}$ ) a la temperatura de trabajo, es posible determinar la densidad aparente de la muestra ( $\rho_{aparente}$ ) aplicando la siguiente ecuación:

$$\rho_{aparente} = \left( \frac{m_{seca}}{m_{saturada} - m_{sumergida}} \right) \times \rho_{agua}$$

A partir de las medidas de cada una de las masas mencionadas se determinó además la porosidad abierta (P%) de cada una de las piezas porosas, para lo que se empleó la siguiente expresión:

$$P\% = \left( \frac{m_{saturada} - m_{seca}}{m_{saturada} - m_{sumergida}} \right) \times 100$$

Estas medidas se efectuaron para cada una de las piezas porosas preparadas en esta Tesis (Capítulo 5), utilizando una balanza Sartorius equipada con un kit comercial de determinación de densidad.

### 3.11- Análisis genómico

El *genoma* es el conjunto completo de material genético de un organismo, el cual incluye todos los genes y las regiones no codificantes. El análisis genómico abarca una amplia gama de técnicas y enfoques que permiten identificar y analizar la información contenida en el genoma de un microorganismo o comunidad. A continuación, se describen brevemente las técnicas utilizadas en esta Tesis para estudiar el genoma de las comunidades bacterianas utilizadas.

#### 3.11.1- Extracción de ADN

La extracción del ADN bacteriano de las comunidades microbianas estudiadas se llevó a cabo utilizando un *kit comercial* diseñado para facilitar y estandarizar el proceso de extracción en muestras biológicas. Este kit contiene los reactivos y establece los protocolos necesarios para realizar la extracción de manera

### Capítulo 3

eficiente, confiable y reproducible. A continuación, se enumeran los pasos generales de funcionamiento del kit:

1. Preparación de la muestra
2. Lisis celular (desnaturalización las membranas celulares para la liberación del ADN)
3. Precipitación del ADN
4. Purificación del ADN
5. Elución del ADN

En el trabajo de Tesis se efectuó la extracción del ADN genómico total utilizando el kit comercial 'Qiagen' sobre lodos cloacales domésticos y sobre comunidades bacterianas adheridas a electrodos de grafito en distintas condiciones de crecimiento (Capítulo 4).

La integridad estructural del ADN extraído fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa. Las muestras de ADN genómico fueron finalmente enviadas al Instituto Nacional de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR) para su secuenciación. Los resultados se presentan en el Capítulo 4.

# Capítulo 4

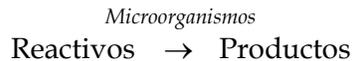
## Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito

*En este capítulo se describe el estudio de la producción de corriente eléctrica a partir de orina humana mediada por microorganismos electro-activos, utilizando electrodos no porosos de grafito como soportes para el crecimiento microbiano y la recolección de carga.*

*La sección introductoria aborda los mecanismos involucrados en el proceso de producción microbiológica de carga eléctrica a partir de materia orgánica, y como éstos pueden ser utilizados con fines prácticos en sistemas bio-electroquímicos para obtener corriente a partir de orina. La descripción de los resultados experimentales se presenta en cuatro bloques. El primero (Sección 4.4) describe la obtención, enriquecimiento e identificación de bacterias electro-activas a partir de lodos cloacales domésticos. El segundo (Sección 4.5) se centra en los ensayos de generación de corriente a partir de los microorganismos obtenidos, empleando orina como fuente de materia orgánica biodegradable en celdas bio-electroquímicas de tres electrodos. El tercer bloque (Sección 4.6) aborda el estudio del rango óptimo de concentraciones de orina donde los microorganismos electro-activos permanecen metabólicamente viables y la producción de corriente eléctrica es máxima. En el último bloque (Sección 4.7) se introduce un modelo bio-termodinámico para simular las densidades de corriente en función de la concentración de orina.*

## 4.1- Metabolismo microbiano y corriente eléctrica

Los procesos microbiológicos son esencialmente procesos físico-químicos en los que intervienen microorganismos, como por ejemplo bacterias. Un proceso de este tipo puede describirse de manera sencilla como una reacción química general, representada de la siguiente forma (Castañeda, 2019):



En este caso, los **reactivos** son las moléculas y nutrientes que los microorganismos necesitan para su reproducción y mantenimiento celular; como por ejemplo fuentes de carbono y nitrógeno, macro- y micro-nutrientes, factores de crecimiento, entre otros. En lo que respecta a los **productos** de reacción, uno de los más importantes es la biomasa microbiana que se genera a partir de la reproducción celular, así como también otros productos ligados al metabolismo energético, como por ejemplo CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en un metabolismo oxidativo y/o compuestos orgánicos/inorgánicos en un metabolismo fermentativo.

Los procesos descritos son mediados por cadenas de reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo microbiano en su conjunto, el cual puede representarse como una combinación sincronizada de eventos catabólicos y anabólicos. A partir de las **reacciones catabólicas** los microorganismos degradan, por ejemplo, materia orgánica en el interior celular, lo que les permite obtener energía en forma de ATP (*adenosín trifosfato*). Al igual que cualquier reacción química convencional, las reacciones catabólicas tienen asociada una determinada variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{\text{catabólico}}$ ). Parte de dicha energía es utilizada en los procesos de mantenimiento celular, mientras que otra fracción (mayoritaria) es consumida durante las **reacciones anabólicas**, a partir de las cuales los microorganismos producen estructuras celulares y, finalmente, nuevas células. De manera análoga al catabolismo, el anabolismo tiene asociado un  $\Delta G_{\text{anabólico}}$ , vinculado a la energía invertida en el proceso de 'construcción' celular. En este esquema, para que el proceso de replicación microbiano sea consistente con la Segunda Ley de la Termodinámica, parte de la energía puesta en juego debe ser disipada al entorno ( $\Delta G_{\text{disipación}}$ ), ya sea como calor y/o entropía (moléculas simples derivadas del proceso catabólico) (von Stockar et al, 2006).

En el metabolismo, las reacciones de transferencia electrónica juegan un papel central. Lejos de ocurrir de manera aleatoria, las reacciones involucradas en los procesos de transferencia de carga que se desencadenan a partir del proceso catabólico ocurren de manera ordenada entre componentes celulares específicos, cada uno de ellos localizados espacialmente de acuerdo con una secuencia de valores crecientes de sus potenciales *redox*, a fin de optimizar la energía puesta en juego (Barlett, 2008).

## Corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito

Esta organización espacial representa sólo una parte del proceso de optimización energética, controlando la *fuera impulsora termodinámica* del mismo. Para lograr además selectividad entre los centros *redox* involucrados, se requiere una *cinética de transferencia electrónica* adecuada, lo que a nivel celular se controla mediante la distancia, orientación y entorno (constante dieléctrica) entre los centros activos (Kuznetsov y Ulstrup, 1999; Barlett, 2008). Los eventos de transferencia electrónica pueden ocurrir entre centros *redox* solubles presentes en el propio medio líquido celular (citoplasma, periplasma) y/o entre centros asociados a una o más bicapas lipídicas, las que actúan a modo de barrera física permitiendo la separación de cargas y el consecuente almacenamiento de energía electroquímica. Estos procesos organizados espacio-temporalmente constituyen lo que se denomina **cadena transportadora de electrones**, el núcleo central de todos los procesos de generación de energía en organismos vivos. La energía ganada durante el flujo electrónico a lo largo de la cadena dependerá del dador electrónico utilizado (cupla *redox* de menor potencial) y del aceptor electrónico final (compuesto reducido, de mayor potencial).

En el caso particular de células bacterianas, estas pueden utilizar una gran variedad de dadores y aceptores electrónicos, diferenciándose los procesos de generación de energía en procesos *respiratorios* (cuando el aceptor electrónico final es externo a la célula, sea éste incorporado a la célula o no) o procesos *fermentativos* (cuando el aceptor es un compuesto intermedio producido en el interior de la célula) (Freguia, 2010). La energía teórica que los microorganismos pueden obtener dependerá directamente de la diferencia de potencial de los compuestos localizados en los extremos de la cadena transportadora, y puede calcularse de acuerdo con la siguiente expresión:  $\Delta G = - nF\Delta E$ , donde  $n$  es el número de electrones intercambiados en la reacción de interés,  $F$  es la constante de Faraday ( $96485 \frac{C}{mol e^-}$ ) y  $\Delta E$  la diferencia de potencial (V) entre el aceptor y el dador electrónico (Rabaey, 2010). De acuerdo con el entorno en el que se encuentren y a la oferta de sustratos metabolizables, las bacterias intentarán maximizar la ganancia de energía 'seleccionando' el dador de electrones de menor potencial y el aceptor disponible de mayor potencial. Debido a que a menudo los aceptores solubles se encuentran en bajas concentraciones y suelen agotarse en el entorno microbiano, las bacterias pueden recurrir a diferentes estrategias para 'completar' sus procesos metabólicos: o bien modificar su metabolismo (de respiración a fermentación, por ejemplo) o utilizar **aceptores electrónicos insolubles**. En las últimas décadas se han descubierto mecanismos específicos de interacción entre bacterias y aceptores insolubles, como por ejemplo material particulado presente en sedimentos anaeróbicos - como óxidos de hierro (III), de manganeso (IV), de uranio (VI) - entre otros. En estos casos, los microorganismos involucrados tienen

que poseer estructuras celulares que permitan canalizar de alguna manera los electrones producidos en el metabolismo hacia el exterior de la célula. Cuando estos requerimientos se cumplen, el proceso de transferencia de carga se denomina **transferencia electrónica extracelular** (EET, por sus siglas en inglés).

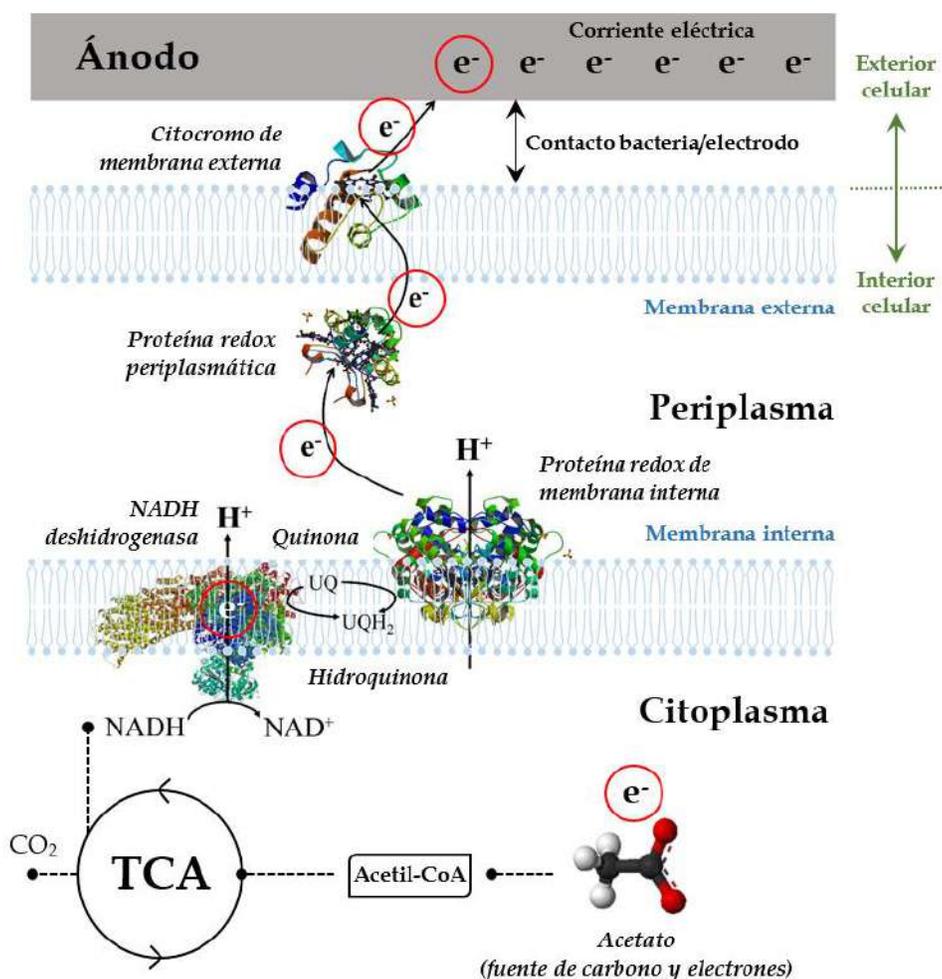
Se han identificado distintos mecanismos dentro de la familia de procesos EET, los cuales han sido sub-divididos en procesos de transferencia *indirecta* (IET, por sus siglas en inglés) o *directa* (DET) (Rabaey, 2010). En el primer caso, los microorganismos excretan al medio extracelular compuestos orgánicos o inorgánicos solubles producidos en el interior celular (como, por ejemplo, ácidos húmicos, piocianinas, compuestos inorgánicos azufrados, entre otros) los cuales difunden finalmente hacia el aceptor insoluble. En el segundo caso, los microorganismos cuentan con complejos enzimáticos *redox* unidos a su membrana celular externa y/o apéndices proteicos conductores que actúan como nanocables (denominados *pili*), responsables de mediar la transferencia electrónica cuando están en contacto directo con la superficie externa.

Como se mencionó, en la naturaleza existen ejemplos de procesos microbiológicos de respiración anaeróbica en lodos sedimentarios utilizando óxidos metálicos como aceptores electrónicos finales. Esto ha conducido al estudio de los microorganismos y de los mecanismos involucrados en la reducción de dichos óxidos. En este contexto, las bacterias del género *Geobacter* y *Shewanella* han sido los microorganismos electro-activos que mayoritariamente se han encontrado como partícipes directos en estos procesos de reducción. Más allá del interés microbiológico *per sé* en el estudio de los mecanismos de transferencia electrónica, los conocimientos básicos que se han desprendido de dichos estudios fundamentales han desencadenado la exploración y utilización de diferentes superficies como aceptores electrónicos externos en contacto con bacterias electro-activas. El 'simple' hecho de que estos microorganismos puedan catalizar reacciones de óxido-reducción en contacto con sólidos, ha dirigido la atención en el área de la Ciencia de Materiales hacia la utilización deliberada de superficies conductoras como sumideros electrónicos finales. En particular, y como se abordó en el Capítulo 1, el uso de **electrodos en contacto con bacterias electro-activas** ha conducido al desarrollo de dispositivos bio-electroquímicos funcionales, lo que ha demostrado la posibilidad de conectar eficientemente las reacciones bioquímicas asociadas al metabolismo microbiano con el sistema externo conductor (Bond et al, 2002). Durante la secuencia de transformaciones que ocurren a nivel intracelular en el proceso de producción de carga eléctrica, los microorganismos utilizan las reacciones de transferencia electrónica entre los diferentes componentes de la cadena transportadora (quinonas, flavinas, centros *redox* de membrana, proteínas *redox* periplasmáticas, entre otros) para impulsar la translocación de protones a

## Corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito

través de la membrana celular interna, generando la fuerza electromotriz necesaria para la producción de energía en forma de ATP (Bartlett, 2008). Este proceso, que contempla desde la oxidación del dador electrónico (sustrato orgánico combustible, por ejemplo) hasta la reducción del aceptor electrónico final, constituye precisamente la *vía* que permite canalizar con fines prácticos los electrones provenientes del metabolismo catabólico hacia superficies conductoras.

La **Figura 4.1** muestra un esquema representativo de un proceso de transferencia electrónica directa (DET) a partir de la interacción de microorganismos electro-activos (por ejemplo, bacterias del género *Geobacter*) con la superficie de un electrodo colector (ánodo). Este proceso comienza con la oxidación intracelular de un compuesto orgánico (por ejemplo, acetato).



**Figura 4.1.** Esquema de un proceso de transferencia electrónica directa (DET) a partir de la oxidación microbiológica de acetato (dador electrónico) en el citoplasma de *Geobacter sulfurreducens* en contacto con un aceptor electrónico externo (electrodo colector). TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. NADH: nicotinamida adenina dinucleótido. La figura fue adaptada de la original en *Functional electrodes for enzymatic and microbial electrochemical systems* (Chapter 3 – Continuum in enzymatic and microbial bioelectrocatalysis).

Esta representación es una conceptualización más detallada del proceso mostrado en la Figura 1.4 (b) (Capítulo 1). El mecanismo mostrado en la **Figura 4.1** puede describirse en 5 grandes etapas: (i) transformación del dador electrónico (acetato) en acetil-CoA en el citoplasma de la célula, (ii) oxidación de acetil-CoA en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), (iii) producción de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) como primer eslabón de la cadena transportadora, (iv) transferencia electrónica entre centros *redox* (solubles y adheridos a membrana), y (v) transferencia electrónica extracelular hacia el electrodo colector (ánodo).

En términos generales, este mecanismo representa el núcleo subyacente a los fenómenos de transformación microbiológica de materia orgánica en carga eléctrica útil, y será la base conceptual de los procesos de producción de corriente a partir de orina que se estudiarán en este trabajo de Tesis.

### 4.2- Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina

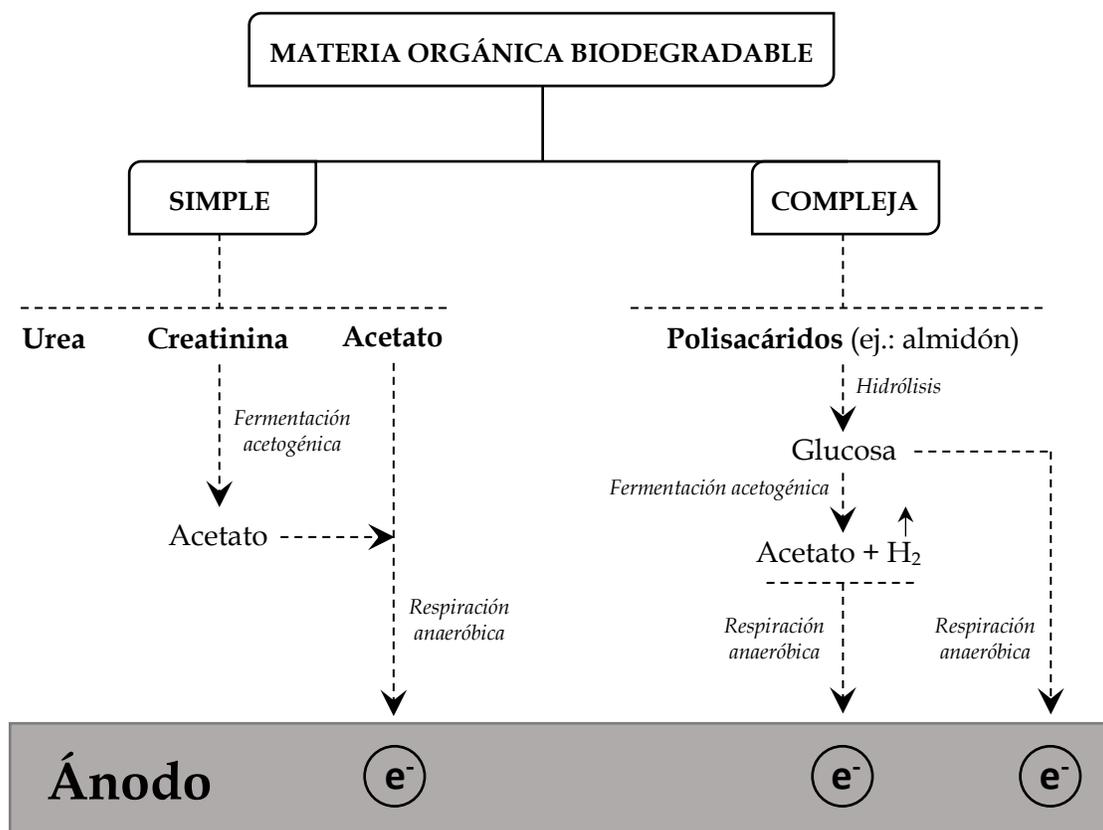
Como se mencionó en el Capítulo 1, la orina humana es un desecho corporal de composición química compleja que puede utilizarse como combustible para generar corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos (BESs). Si bien las características de la orina y los procesos que ocurren en los BESs confluyen en una combinación compleja de abordar, resulta atractivo trazar - dentro de las posibilidades y suposiciones pertinentes - un esquema de transformación que permita vincular la materia orgánica presente en la orina con la producción de corriente mediada por microorganismos electro-activos.

La materia orgánica soluble de los medios de cultivo con los que se alimentan habitualmente los BESs suele ser de naturaleza variada, especialmente si se utilizan aguas residuales y/o líquidos de composición compleja (como el caso de la orina). En este contexto, la **cantidad** de compuestos susceptibles de ser oxidados microbiológicamente debe analizarse en conjunto con su **calidad metabólica**, es decir, su bio-disponibilidad (o bio-degradabilidad). De acuerdo con este concepto, solo la fracción de materia orgánica de composición elemental adecuada para el crecimiento bacteriano (fundamentalmente C, H, O y N) será efectivamente utilizada y asimilada por los microorganismos. El rango de sustratos que pueden ser degradados en BESs (ya sea fermentados y/o utilizados en procesos respiratorios) resulta ser generalmente amplio, así como también la diversidad filogenética de microorganismos capaces de contribuir de forma conjunta al proceso de degradación (Freguia, 2010). En este escenario se desarrolla un proceso sintrófico complejo, en el cual una o más especies de microorganismos viven a expensas de los productos metabólicos de otra especie. Así, el proceso de producción de carga eléctrica responderá en última instancia a la variabilidad y complejidad de nutrientes y sustratos del medio, al mismo tiempo que dependerá de la diversidad microbiana presente.

Teniendo en cuenta estos aspectos, y de acuerdo con los pocos estudios que han abordado el tema en la literatura, es posible establecer una *vía* simplificada de transformación de la materia orgánica presente en la orina humana y su conversión en carga eléctrica en BESs. Para esto es posible considerar como punto de partida los principales compuestos orgánicos solubles que hay en la orina, de acuerdo con datos cuantitativos de estudios metabolómicos (Bouatra et al, 2013). En este enfoque, es importante no sólo considerar posibles fuentes de carbono y electrones para microorganismos electro-activos, sino también materia orgánica capaz de ser consumida por especies fermentadoras, contemplando, como se mencionó, aspectos cuantitativos (concentración) y cualitativos (composición elemental/bio-degradabilidad).

Los metabolitos orgánicos más abundantes presentes en la **orina** son (i) urea (22.5 mM/mM creatinina) y (ii) creatinina (10.5 mM) (Bouatra et al, 2013). Además, y de especial interés para su aplicación en la producción de corriente, la orina contiene también pequeñas cantidades de acetato (45  $\mu$ M/mM creatinina) las cuales pueden ser utilizadas directamente por la población electro-activa en contacto con el ánodo. Si bien es cierto que estos compuestos representan solo una fracción de la materia orgánica de la orina, su mayor concentración y su carácter bio-degradable hace que sean adecuados como punto de partida en un esquema de producción microbiológica de corriente. En el marco de esta Tesis, y de acuerdo con los objetivos trazados (uno de ellos vinculado a la determinación de la concentración óptima de orina necesaria para alcanzar el máximo rendimiento bio-electroquímico), es de particular interés contemplar además otras posibles fuentes de materia orgánica utilizables por los microorganismos, como por ejemplo los compuestos provenientes del medio líquido empleado para diluir la orina. En este trabajo se utilizó como diluyente un *efluente domestico sintético* (denominado **Syntho**) (Boeije et al, 1999), el cual ha sido habitualmente utilizado en estudios bio-electroquímicos para simular de manera reproducible las condiciones de un líquido residual doméstico (O'Flaherty et al, 2012; Capodaglio et al, 2013; Nopens et al, 2001). De esta forma, es necesario considerar también en nuestro esquema de producción de corriente a los principales compuestos solubles presentes en Syntho. Además de acetato, y a diferencia de la orina, Syntho contiene materia orgánica compleja (macromoléculas, como por ejemplo almidón) que podría ser degradada a sus monómeros constituyentes (glucosa en este caso) siendo estos últimos utilizados como fuente alternativa de carbono y electrones. Sobre esta base se propuso un esquema simplificado de los principales compuestos orgánicos que podrían ser utilizados en la producción de corriente eléctrica a partir de microorganismos fermentadores y/o electro-activos presentes en un ánodo microbiano, junto con posibles rutas de conversión metabólica en un esquema sintrófico.

La **Figura 4.2** muestra algunas de estas posibles rutas de vinculación entre la materia orgánica biodegradable de la orina y Syntho y su transformación microbiológica en corriente eléctrica.



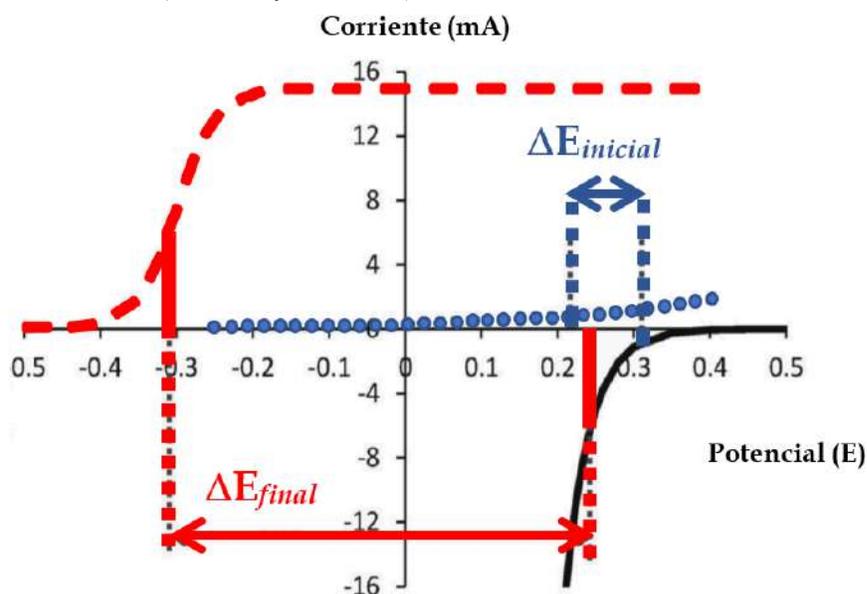
**Figura 4.2.** Diagrama de flujo de posibles vías de transformación de materia orgánica soluble biodegradable (presente en la orina humana y Syntho) en corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos. Se indican explícitamente los procesos de hidrólisis, fermentación y respiración asociados.

El esquema presentado sólo intenta mostrar, en esta etapa introductoria, la existencia de rutas metabólicas y posibles conexiones que permiten vincular la materia orgánica de los medios de cultivo utilizados en este trabajo de Tesis y su transformación en carga eléctrica sobre la superficie del ánodo. Este esquema será utilizado en la Sección 4.7, junto con posibles sumideros alternativos de electrones (que no conducen a la producción de corriente), como punto de partida para el estudio teórico de la simulación de corriente eléctrica en función de la concentración de orina.

### 4.3- Electroanálisis de ánodos microbianos

Independientemente del desarrollo que surja a partir de las nuevas tecnologías asociadas a los fenómenos microbiológicos de transferencia electrónica, la actividad microbiana electro-activa es indudablemente un concepto atractivo de cara al futuro. En este marco, los **ánodos microbianos** constituyen los pilares fundamentales de la mayoría de los procesos bio-electroquímicos y sus tecnologías derivadas, a excepción de las denominadas celdas de electrólisis microbianas (MEC), en las que el cátodo de la celda desempeña el rol principal.

Un ánodo microbiano está constituido básicamente por *biofilms* bacterianos (cepas puras electro-activas y/o comunidades mixtas) sobre la superficie de un electrodo colector. La mayoría de los estudios relacionados con ánodos microbianos se han llevado a cabo utilizando MFCs en su configuración tradicional de dos compartimientos (esquema mostrado en la Figura 1.4 (a), Capítulo 1). Debido a la diversidad de procesos que tienen lugar en una MFC, tanto la corriente ( $i$ ) que circula por la misma como la diferencia de potencial de la celda ( $\Delta E$ ) pueden variar durante el funcionamiento del sistema, especialmente durante las primeras etapas de colonización del ánodo (Rimboud et al, 2014). En la **Figura 4.3** se muestra un esquema de la respuesta en corriente y potencial de una MFC en dos estadios de evolución diferentes: (i) durante el crecimiento microbiano sobre el ánodo (curva azul), y (ii) en presencia de un *biofilm* maduro (curva roja a trazos).



**Figura 4.3.** Diagrama corriente ( $i$ )/potencial ( $E$ ) correspondiente a un ánodo microbiano (corriente positiva) conectado a un cátodo reductor de oxígeno (corriente negativa, curva negra) en una MFC. En azul se indica el comportamiento inicial del ánodo, durante la colonización microbiana. En rojo se indican las condiciones finales, correspondientes a un *biofilm* electro-activo maduro. La figura fue adaptada de la original en *Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives* (Rimboud et al, 2014).

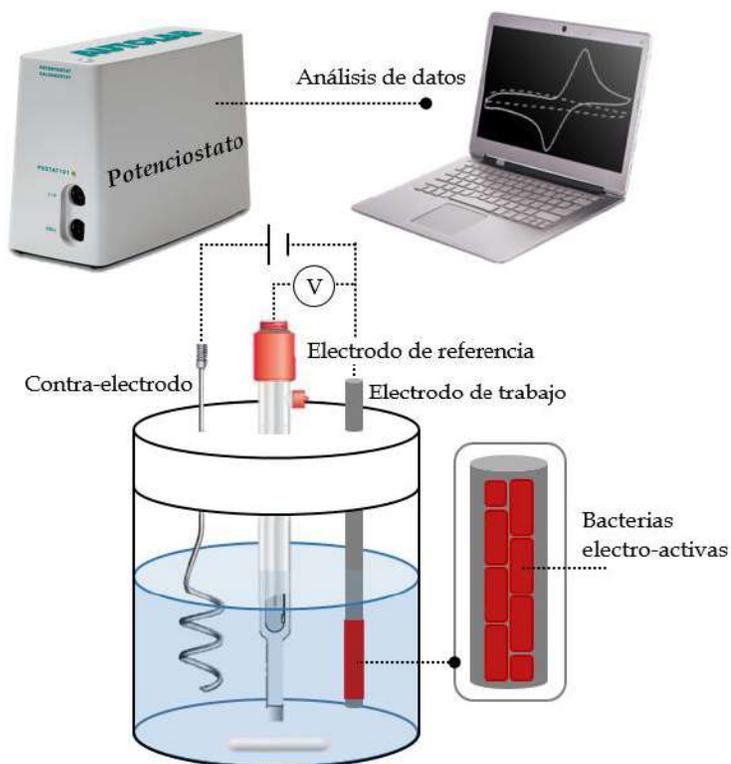
El comportamiento mostrado en la figura puede interpretarse de la siguiente manera. Durante la etapa inicial de su colonización el ánodo carece de suficiente biomasa bacteriana para oxidar materia orgánica de manera extensiva, obteniéndose bajas corrientes (cinética lenta de oxidación) a potenciales anódicos altos (línea azul punteada). En función de la corriente anódica, y de acuerdo con la forma en que varía la relación corriente/potencial para el cátodo en un proceso de reducción de oxígeno en condiciones abióticas (curva continua negra), es posible determinar la diferencia de potencial inicial ( $\Delta E_{inicial}$ ) en la celda. Así, para una corriente de, por ejemplo 1 mA, el potencial anódico será (en el ejemplo de la figura) de 0.22 V, mientras que el catódico será de 0.31 V, conduciendo a un  $\Delta E_{inicial}$  de sólo 0.09 V. La capacidad electrocatalítica del ánodo microbiano aumenta notablemente con la formación de un *biofilm* maduro sobre la superficie conductora (curva roja a trazos), lo que a menudo puede lograrse con el transcurso de los días, típicamente 5-7 días. Esto provoca un cambio sustancial del potencial del ánodo hacia valores más negativos. Así, para una corriente de, por ejemplo 6 mA, los potenciales anódico y catódico toman valores de -0.31 V y 0.24 V, respectivamente, conduciendo a un  $\Delta E_{final}$  de 0.55 V. En este contexto, siempre que se trabaje con una configuración de celda de dos compartimientos (ánodo y cátodo), uno de los objetivos principales estará dirigido al diseño de ánodos microbianos que produzcan una corriente elevada a un potencial anódico bajo, garantizando así una mayor diferencia de potencial en la celda y, en consecuencia, una potencia de salida elevada (Rimboud et al, 2014).

Si bien la configuración de **celda de dos compartimientos** es apropiada para evaluar aspectos del sistema 'como un todo', por ejemplo la propia arquitectura de la celda, la modalidad de alimentación (*batch*, continuo, semi-continuo), el arreglo funcional en serie/paralelo de una multiplicidad de celdas, entre otros, **no permite caracterizar exclusivamente el comportamiento intrínseco de los ánodos microbianos**. Las diferentes etapas físico-químicas y microbiológicas que se ponen en juego y que interactúan durante la operación de una MFC afectan en mayor o menor medida la velocidad del proceso global de recuperación de carga eléctrica, lo que repercute en el desempeño anódico y las conclusiones que del mismo puedan sacarse. Además, como se presentó en la **Figura 4.3**, el potencial del cátodo en una MFC y la cinética de la reacción de reducción asociada representan una fuerte limitante a la velocidad global del proceso, determinando la diferencia de potencial ánodo/cátodo y, en consecuencia, el flujo electrónico y desarrollo del propio *biofilm* sobre la superficie anódica. De acuerdo con los estudios realizados al respecto, la resistencia interna de la propia celda (resistencia eléctrica de las conexiones y resistencia iónica en solución) también ha sido identificada como otro factor que puede limitar la velocidad de los procesos involucrados. Debido a la variabilidad de todas estas condiciones, el potencial que 'experimenta' el ánodo puede variar considerablemente durante el funcionamiento de

una MFC, lo que dificulta la obtención de información del mismo a partir de medidas de corriente eléctrica. En este contexto, y de especial interés para este trabajo de Tesis, el valor efectivo del potencial del ánodo durante el desarrollo del *biofilm* electro-activo y durante su desempeño electroquímico debe ser cuidadosamente controlado. Si bien la mayoría de los estudios bio-electroquímicos reportados en la literatura aún utilizan celdas de dos compartimientos para analizar el comportamiento de sus partes individuales, la madurez en el área ha comenzado a inclinar la balanza hacia la implementación de otras aproximaciones electro-analíticas, como por ejemplo el uso de **celdas bio-electroquímicas de tres electrodos**.

La utilización de este tipo de celdas es fundamental a la hora de caracterizar *específicamente* el comportamiento de ánodos microbianos. Por un lado, permite asegurar que al ánodo en su conjunto constituya el único 'paso limitante' de la velocidad de transferencia electrónica, controlando así la corriente producida, la que puede utilizarse como una medida del desempeño anódico global. Por otro lado, este tipo de configuración permite controlar perfectamente el potencial del ánodo, utilizando para esto polarización externa mediante el uso de un potencióstato, lo que evita la variabilidad de potencial mostrada en la **Figura 4.3** durante la evolución microbiana. En la **Figura 4.4** se muestra un esquema general de una típica celda bio-electroquímica de tres electrodos.

Como se mencionó, debido a la importancia del control del potencial anódico, es necesario tener en cuenta algunos aspectos a la hora de diseñar y trabajar con este tipo de configuraciones, especialmente cuando se desea estudiar el comportamiento anódico en ensayos a largo plazo.



**Figura 4.4.** Celda de tres electrodos. Se representa el electrodo de trabajo (ánodo microbiano formado por un *biofilm* de bacterias electro-activas sobre una barra de grafito), el contra-electrodo (alambre de platino, por ejemplo) y el electrodo de referencia. Se muestra además el potenciostato utilizado para polarizar al electrodo de trabajo y el sistema de análisis de datos.

### 4.3.1- Diseño y operación de celdas bio-electroquímicas de tres electrodos

El potencial del ánodo en una celda de tres electrodos se controla externamente por polarización, a un valor determinado respecto de un electrodo de referencia. Por este motivo, uno de los aspectos a considerar es el control inicial y final del **potencial** del propio **electrodo de referencia**, garantizando de esta forma un correcto funcionamiento del mismo y, por lo tanto, del potencial efectivo de polarización del electrodo de trabajo a lo largo de todo el ensayo, el cual debe ser medido a su vez periódicamente. Bajo condiciones de **polarización**, *cepas electro-activas puras* (por ejemplo, las del género *Geobacter*) han demostrado una excelente capacidad de adaptación en diferentes condiciones electroquímicas, revelándose la existencia de diversas rutas metabólicas de transferencia electrónica directa (DET) a la superficie del ánodo en función del potencial aplicado. Por otro lado, cuando se utilizan *muestras ambientales* (lodos, por ejemplo) como fuente microbiana, se ha demostrado que **el potencial de polarización tiene relevancia directa sobre la diversidad microbiana resultante adherida a la superficie anódica**. Así, ánodos polarizados a potenciales ‘elevados’ (0-0.4 V *vs* SHE, electrodo estándar

de hidrógeno) han revelado la presencia de una gran diversidad microbiológica, debido al fuerte carácter aceptor del electrodo, soportando la viabilidad de una comunidad microbiana mixta de interés electro-analítico. Por el contrario, el empleo de potenciales de polarización 'bajos' (-0.15 V *vs* SHE) ha permitido el desarrollo y enriquecimiento preponderante de microorganismos del género *Geobacter* a partir de muestras ambientales, debido a la capacidad de esta especie electro-activa para adaptar sus rutas metabólicas de transferencia al potencial externo, lo que permite dejar 'fuera de competencia' - y del *biofilm* anódico - a todos aquellos microorganismos que no dispongan de la misma flexibilidad metabólica (Wagner et al, 2010). En este sentido, el potencial aplicado es un factor de relevancia central durante la operación de celdas bio-electroquímicas de tres electrodos, influyendo en el balance microbiano desarrollado sobre el ánodo y condicionando, en consecuencia, la respuesta electro-química final.

Excepto en los casos en que se trabaje con microorganismos halófilos (aquellos que toleran altas concentraciones de sales en el medio), la mayoría de los microorganismos electro-activos típicamente utilizados crecen en condiciones de salinidad moderada. Así, el control sobre la **conductividad iónica** del medio de cultivo utilizado en la celda es también fundamental para garantizar la viabilidad microbiológica. En este contexto se pueden reconocer dos extremos: (i) bajos valores de conductividad (por ejemplo, 0.5 mS/cm), beneficiosos desde el punto de vista microbiológico pero que conducen a altas resistencias iónicas en solución (lo que es perjudicial a la hora de 'cerrar' el circuito eléctrico de la celda); o (ii) altos valores conductividad (por ejemplo, 20 mS/cm), los que favorecen el transporte iónico en solución, pero pueden provocar la inactivación bacteriana.

Para propósitos electro-analíticos, la configuración de tres electrodos permite superar los obstáculos de conductividad iónica, al trabajar en ausencia de membranas separadoras ánodo/cátodo (lo que no ocurre en una MFC). Así, sólo el efecto de la caída de conductividad entre el ánodo microbiano y el electrodo de referencia debe tenerse presente para asegurar que el potencial *seteado* externamente sea el efectivo sobre la superficie anódica. Esto último se logra además colocando el electrodo de referencia en el centro de la configuración, lo más cercano posible al ánodo, lo que permite alcanzar una distribución homogénea de las líneas de corriente en solución. Aunque la configuración utilizada cumpla con todos estos requerimientos, es posible que aun así exista - fundamentalmente cuando se trabaja con ánodos de elevada área superficial y/o baja conductividad eléctrica - un gradiente de potencial local sobre su superficie. Para minimizar este efecto, debe garantizarse que la **superficie del contra-electrodo** (por ejemplo, un alambre de platino enrollado) posea una superficie electroquímica superior a la del ánodo microbiano (se suele tomar un valor de referencia de área de contra-

electrodo/área de ánodo  $\sim 10$ ). Con el fin de minimizar gradientes de composición química en la solución, el **volumen de la celda** debe ser relativamente pequeño en comparación con el volumen del ánodo microbiano, así como someterse a **agitación** continua durante el transcurso del ensayo, garantizando que no existan limitaciones al transporte de masa por convección hacia la superficie anódica. Estas condiciones pueden verse beneficiadas además cuando se utilizan sistemas de alimentación continua, con los cuales es posible mantener en estado estacionario la concentración de materia orgánica en la celda y renovar continuamente el medio de cultivo.

La **temperatura** por su parte ejerce un efecto significativo sobre la cinética del ánodo microbiano, controlando fundamentalmente la velocidad de los procesos metabólicos y la replicación celular. Por este motivo, la celda debe permanecer a temperatura constante (lo que se logra generalmente colocándola en una incubadora termostatazada) y en ausencia de luz, este último punto siendo fundamental para evitar posibles interferencias de microorganismos foto-tróficos durante el electroanálisis anódico.

Si bien la mayoría de las características de diseño y operación de las celdas de tres electrodos no difieren cuando se estudian comunidades bacterianas o cepas puras, existen algunos requisitos que deben tenerse en cuenta cuando se trabaja con microorganismos puros. En este último caso, las celdas deben esterilizarse al inicio de los ensayos, con el fin de evitar la proliferación de microorganismos indeseados. Respecto de la atmósfera del reactor, las celdas de tres electrodos operan generalmente con el suplemento (burbujeo) de gases estériles que dependen del medio de cultivo y los microorganismos electro-activos utilizados (la mayoría de ellos de carácter anaeróbico), así como también del objetivo final trazado. En este sentido suelen emplearse típicamente, para microorganismos electro-activos, gases inertes como  $N_2$  o mezclas  $N_2/CO_2$  en distintas proporciones volumétricas, las que se utilizan simultáneamente para el control del pH de la celda.

### 4.3.2- Formación de *biofilms* en ánodos microbianos

El proceso de colonización y proliferación bacteriana sobre la superficie de un ánodo polarizado puede iniciarse a partir de la **inoculación** de la celda (MFC o celda de tres electrodos) con la cepa particular bajo estudio (por ejemplo, la bacteria electro-activa modelo *G. Sulfurreducens*). También se han aplicado métodos de colonización a partir de **ánodos microbianos primarios**, es decir, a partir de la utilización de electrodos previamente colonizados (provenientes de MFCs o celdas de tres electrodos en funcionamiento), dando lugar al desarrollo de **ánodos secundarios**, siendo estos últimos los de interés

bajo estudio (Nam et al, 2011; Erable et al, 2011). Para esto, el *biofilm* presente en el ánodo primario suele, o bien ser removido deliberadamente de la superficie e inoculado en la celda, o bien utilizado adherido al ánodo primario para lograr la *colonización cruzada* de la superficie anódica secundaria. En esta colonización cruzada ambos electrodos (primario con *biofilm* adherido y secundario inicialmente sin *biofilm*) se colocan en la misma celda, permitiendo que los microorganismos del *biofilm* primario se desprendan y colonicen la superficie 'virgen' del ánodo secundario polarizado (Chen et al, 2011; He et al, 2011). Para el desarrollo de los ánodos primarios, generalmente se emplean inóculos provenientes de lodos naturales u obtenidos de sistemas bio-electroquímicos pre-existentes, lo que permite la selección de mejores fuentes de inóculo para el crecimiento del ánodo microbiano secundario de interés, siempre teniendo en cuenta los efectos de polarización mencionados en la sección precedente. Si bien los inóculos provenientes de fuentes naturales tienen una diversidad microbiana considerable, los procedimientos de colonización cruzada mencionados han conducido a resultados reproducibles, permitiendo además ganar tiempo en los ensayos debido a una colonización rápida de la superficie secundaria como consecuencia de microorganismos que ya se encuentran metabólicamente activos.

En cuanto a la modalidad de alimentación de las celdas para lograr la formación de *biofilms* electro-activos en condiciones controladas, los estudios electro-analíticos se han llevado a cabo generalmente bajo tres modalidades diferentes: *batch*, *semi-batch* o continua (Feng et al, 2013; Rousseau et al, 2013). En el primer caso, el contenido de materia orgánica se define y se fija inicialmente en la celda, finalizándose el ensayo una vez consumida la totalidad de la materia orgánica. En la modalidad *semi-batch*, una vez consumida la materia orgánica, esta se vuelve a renovar en el compartimiento anódico de la celda (en el caso de una MFC), reemplazando parte o la totalidad de la solución. En el caso de estudios bajo una modalidad de alimentación continua, ésta se lleva a cabo una vez que el *biofilm* anódico ya se encuentra en su estadio de madurez. Para esto suele utilizarse primero una modalidad *batch*, de manera de lograr la colonización bacteriana inicial, evitando remover de la celda microorganismos planctónicos (suspendidos en el medio de cultivo) necesarios para la colonización primaria. Una vez lograda esta fase, la celda es sometida a una alimentación continua, empleando para esto un sistema de bombas para lograr la circulación de medio de cultivo desde un reservorio 'aguas arriba' a la celda. En esta configuración, es posible controlar el tiempo de residencia en la celda y alcanzar, como ya se mencionó previamente, una composición química estable en el reactor, la cual puede controlarse fácilmente mediante modificaciones de la concentración en el reservorio de alimentación.

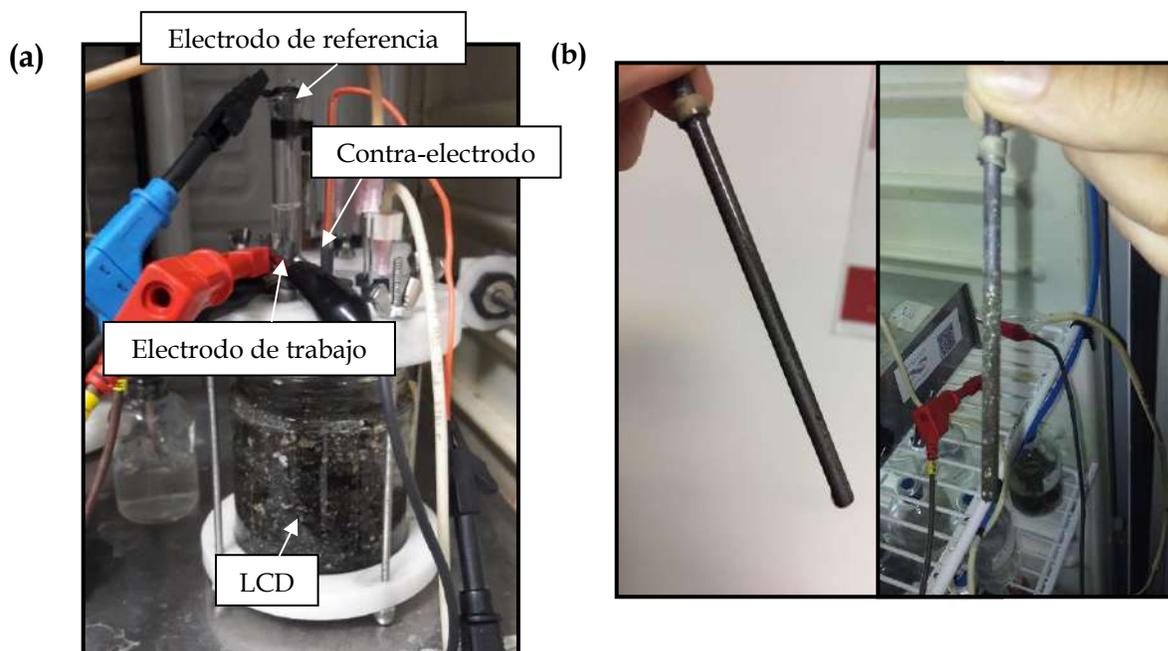
## Capítulo 4

En este trabajo de Tesis se empleó una configuración de *celda de tres electrodos*, bajo una modalidad de *alimentación continua*, para el estudio del desempeño bio-electroquímico de todos los ánodos microbianos evaluados en presencia de orina humana: desde los obtenidos a partir del crecimiento de bacterias electro-activas sobre barras no porosas de grafito (Secciones 4.4 a 4.6 en este capítulo) hasta los electrodos bio-híbridos porosos de  $Ti_4O_7$  evaluados en la parte final de la Tesis (Capítulo 6).

A continuación, se describen los principales resultados y conclusiones obtenidas en la primera parte experimental del trabajo.

### 4.4- Enriquecimiento e identificación de bacterias electro-activas a partir de lodos cloacales domésticos

Los microorganismos electro-activos - principalmente aquellos capaces de canalizar de manera directa los electrones producidos en su metabolismo hacia un material conductor - representan uno de los elementos clave en la dinámica de los sistemas bio-electroquímicos. El primer paso del estudio realizado consistió en la obtención e identificación de dichos microorganismos, con la intención de evaluar posteriormente (Sección 4.5) su capacidad para degradar compuestos orgánicos presentes en la orina humana. Como fuente de bacterias electro-activas se utilizó un lodo cloacal doméstico (LCD) obtenido de la planta de tratamiento de efluentes del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA, CONICET/UNMDP), por tratarse de un medio con alto contenido de desechos orgánicos corporales, lo que *a priori* representaría una fuente de microorganismos viables para el fin último perseguido. Para esto, el LCD se colocó en una celda bio-electroquímica de tres electrodos de 160 mL de capacidad, insertándose - como electrodo de trabajo - un electrodo de grafito no poroso (barra de grafito prensado, de área expuesta igual a  $8\text{ cm}^2$ ) en contacto con el lodo. La celda se completó con un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. La **Figura 4.5 (a)** muestra una fotografía de una de estas celdas.

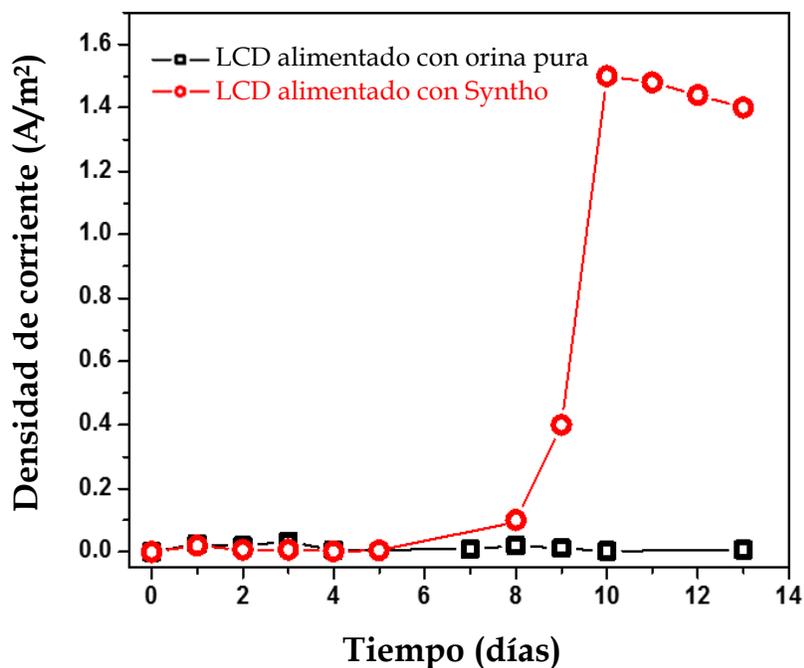


**Figura 4.5.** (a) Celda bio-electroquímica de tres electrodos conteniendo el LCD. (b) Izquierda - electrodo de trabajo al comienzo del experimento (superficie libre). Derecha - electrodo al final del experimento (superficie recubierta por lodo y microorganismos).

Para la colonización con microorganismos electro-activos, el electrodo de trabajo se sometió a polarización externa a un potencial de 0.2 V (Ag/AgCl), con el objeto de inducir la adherencia de un consorcio bacteriano sobre su superficie capaz de oxidar materia orgánica y de ceder los electrones al potencial seleccionado. Este potencial permitió además asegurar que el proceso de transferencia electrónica al ánodo no limite la producción máxima de corriente (Bulsalmen et al, 2010), y que no exista *a priori* una corriente eléctrica abiótica, es decir, una corriente generada por la oxidación de materia orgánica sobre la superficie del electrodo sin intervención microbiana. La corriente se registró continuamente en el tiempo (a partir de medidas de *cronoamperometría*) y se utilizó como una medida de la proliferación bacteriana sobre el ánodo. Los ensayos se realizaron bajo agitación mecánica (220 rpm) y temperatura controlada (30°C), empleando condiciones anaeróbicas generadas por el burbujeo de una mezcla gaseosa de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en relación volumétrica 80/20, respectivamente.

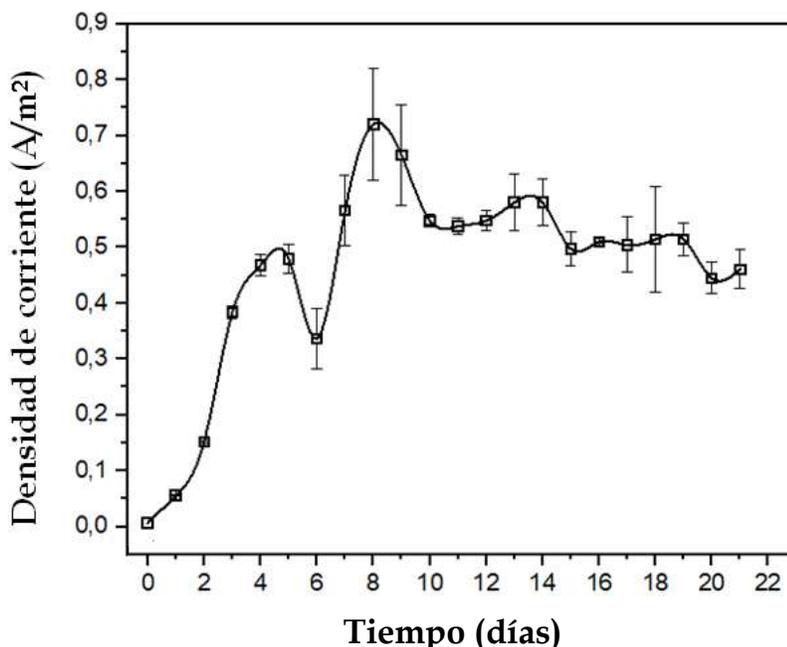
Para dar inicio a la producción de corriente se abordaron dos estrategias de alimentación en *batch*. Por un lado, la celda fue suplementada con *orina pura* como fuente única de materia orgánica disponible para los microorganismos. Por otro lado, se utilizó un *efluente doméstico sintético* (Syntho) (Boeije et al, 1999). En acuerdo con estudios de la literatura, la celda alimentada con orina pura no generó corrientes significativas capaces de ser sostenidas en el tiempo; lo que se atribuyó (como se abordará en la Sección 4.5 de este capítulo) a efectos inhibitorios sobre los microorganismos. Por el contrario, la utilización de

Syntho como medio de cultivo permitió efectivamente iniciar y mantener en el tiempo el proceso de producción de corriente. En la **Figura 4.5 (b)** se muestran fotografías de uno de los electrodos de trabajo utilizados, al comienzo y al final del ensayo (luego de dos semanas de colonización en presencia de Syntho). La **Figura 4.6** muestra la comparación de la evolución temporal de la densidad de corriente anódica (en  $A/m^2$ , tomando como referencia la superficie de ánodo sumergida en el medio de cultivo) correspondiente a un LCD alimentado con orina pura o Syntho.



**Figura 4.6.** Densidad de corriente anódica en función del tiempo para un LCD alimentado con orina o Syntho.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió emplear Syntho - bajo una modalidad de tipo *batch* - para dar inicio a los ensayos de evolución microbiana sobre la superficie del ánodo a partir del LCD. Una vez lograda la colonización inicial del electrodo de trabajo (definida arbitrariamente a partir de la generación de una densidad de corriente mínima de  $0.5 A/m^2$ ), se empleó una modalidad de alimentación continua (utilizando una bomba peristáltica para el bombeo de medio de cultivo a un caudal promedio de  $3.5 mL/h$ ), con el fin de garantizar la operación estable de la celda en el tiempo. La **Figura 4.7** muestra un perfil típico de evolución de densidad de corriente en un ensayo con LCD alimentado de manera continua con Syntho. Los ensayos fueron realizados en todos los casos por triplicado.

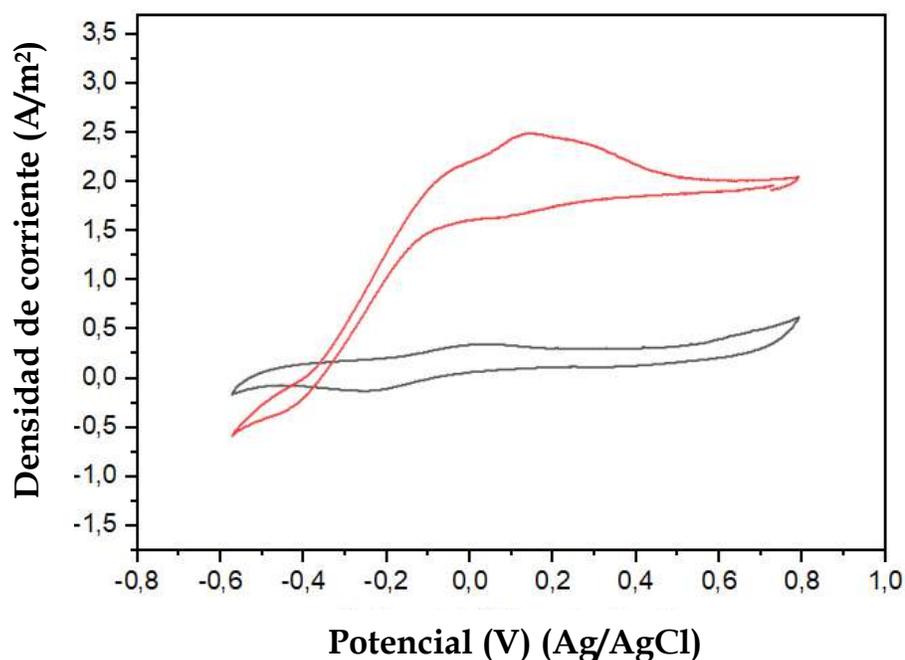


**Figura 4.7.** Ensayo de cronoamperometría (densidad de corriente en función del tiempo) para un ánodo microbiano (bacterias/barra de grafito) en una celda de tres electrodos conteniendo LCD alimentado con Syntho. Se reportan los valores promedio (n=3).

En todos los ensayos realizados se observó el crecimiento paulatino de la densidad de corriente a partir de la implementación de la modalidad de alimentación continua hasta alcanzar valores estables (a partir de aproximadamente una semana), momento en el cual el sistema bio-electroquímico ingresa en un régimen de estado estacionario. La densidad de corriente promedio obtenida en este estadio fue de aproximadamente 0,5 A/m². Las tendencias y valores de densidad de corriente en este tipo de ensayos fueron reproducibles a lo largo de todo el trabajo experimental realizado. Estos ensayos permitieron definir las condiciones de ‘puesta en marcha’ de la celda en todos los experimentos realizados en el trabajo de Tesis.

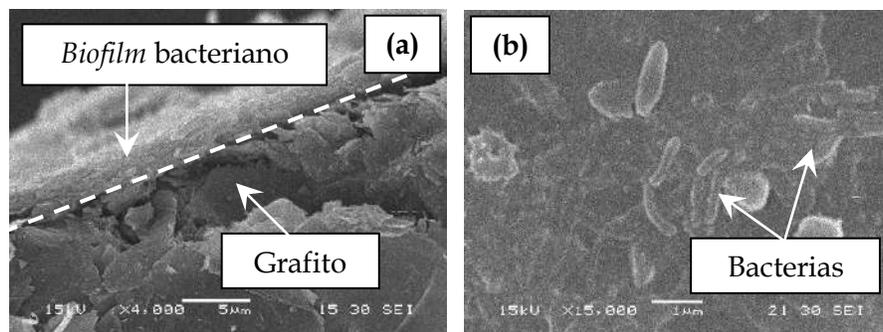
Con el fin de determinar si la respuesta eléctrica detectada por cronoamperometría (**Figura 4.7**) se debió efectivamente a la presencia de microorganismos electro-activos adheridos al ánodo (y no a la oxidación electroquímica directa de compuestos presentes en el medio de cultivo sobre la superficie de grafito), se realizaron ensayos de voltametría cíclica (CV) (variación del potencial del electrodo de trabajo y seguimiento de la corriente desarrollada) sobre las barras de grafito colonizadas, obtenidas luego de dos semanas de ensayo. Con el objeto de contar con un parámetro de referencia, se llevaron a cabo también ensayos de CV sobre electrodos de grafito sin colonizar. Ambos estudios se realizaron en

celdas de tres electrodos (en ausencia de LCD) utilizando Syntho como única fuente de materia orgánica. La **Figura 4.8** muestra la comparación de los voltagramas obtenidos.



**Figura 4.8.** Ensayos de CV sobre electrodos de grafito alimentados con Syntho. Se muestra la respuesta del ánodo colonizado (rojo) y sin colonizar (negro). La velocidad de barrido de potencial utilizada fue de 1 mV/s.

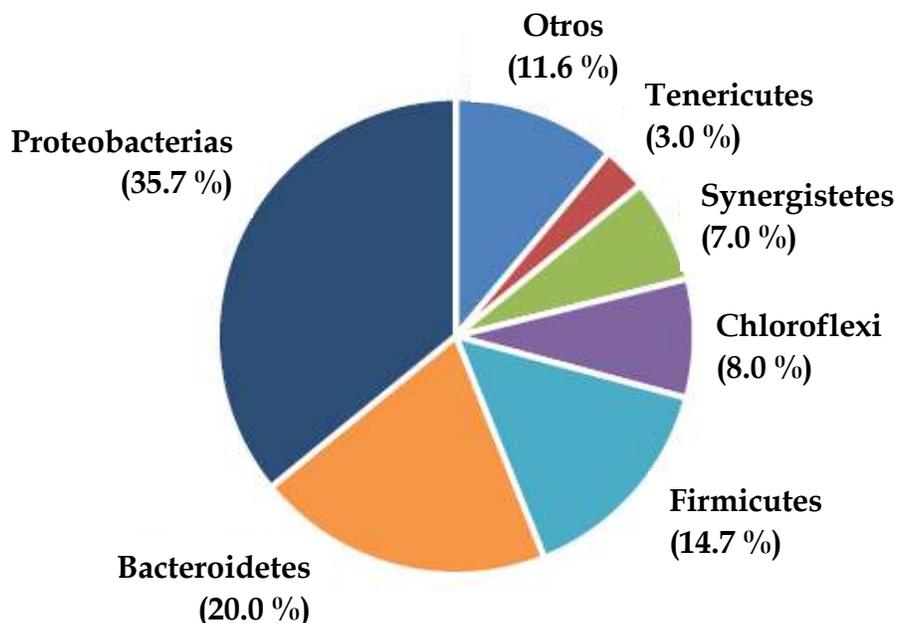
Al potencial de trabajo utilizado (0.2 V *vs* Ag/AgCl) la densidad de corriente obtenida en ausencia de microorganismos es despreciable ( $\sim 0.15$  A/m<sup>2</sup>) comparada con la obtenida para el electrodo colonizado ( $\sim 2.5$  A/m<sup>2</sup>, densidad máxima detectada). Asimismo, y como rasgo distintivo característico del voltagrama en presencia de microorganismos, la forma de tipo sigmoidea de la respuesta eléctrica en función del potencial (con un potencial de media onda de  $\sim -0.3$  V (Ag/AgCl)) remitió a la presencia de bacterias electro-activas adheridas al ánodo (en particular, bacterias del género *Geobacter*) efectuando procesos de transferencia electrónica directa (Marsili et al, 2010). En este contexto, se indagó posteriormente la formación de *biofilms* sobre los electrodos de trabajo, para lo que se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). En la **Figura 4.9** se muestran imágenes representativas obtenidas a partir del electrodo colonizado mostrado en la **Figura 4.5 (b)**.



**Figura 4.9.** Imágenes SEM de electrodos de grafito al final del proceso de colonización a partir de un LCD, utilizando Syntho como fuente de materia orgánica. **(a)** Corte transversal del electrodo, con el *biofilm* desarrollado sobre la superficie externa del mismo (la línea punteada representa la interfase *biofilm*/grafito). **(b)** Detalle de la presencia de bacterias individuales en el *biofilm*.

De acuerdo con los resultados de voltametría y microscopía, la respuesta eléctrica detectada en los ensayos cronoamperométricos podría ser efectivamente atribuida al desarrollo de bacterias electro-activas sobre el ánodo de la celda. Para complementar estos resultados, se llevó a cabo la identificación de la población microbiana presente en el LCD, buscando caracterizar, por un lado, la fuente de microorganismos, y de detectar simultáneamente la presencia de bacterias electro-activas responsables de la respuesta bio-electroquímica. El estudio de la composición microbiana se llevó a cabo por secuenciación genómica. Para esto, se efectuó la extracción del ADN genómico total (Kit comercial Qiagen) a partir de una muestra del LCD utilizado. Una vez aislado el ADN se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, y fue finalmente secuenciado (INDEAR, Rosario). De acuerdo con los resultados obtenidos pudieron detectarse, como era de esperar, una gran diversidad de microorganismos en el lodo de partida (**Figura 4.10**).

Dentro de las comunidades dominantes encontradas se destacaron los filos correspondientes a *Proteobacterias* (~ 36%), *Bacteroidetes* (20%) y *Firmicutes* (~ 15%). Éstos, junto con *Chloroflexi* (8%), ya han sido reportados no solo en medios conteniendo orina, como barros y líquidos provenientes de efluentes cloacales (Björnsson et al, 2002); sino también en orina fresca (recién obtenida) (Obata et al, 2020), lo que refuerza en primera instancia la idea de utilizar el LCD como fuente de microorganismos capaces de producir corriente a partir de orina.



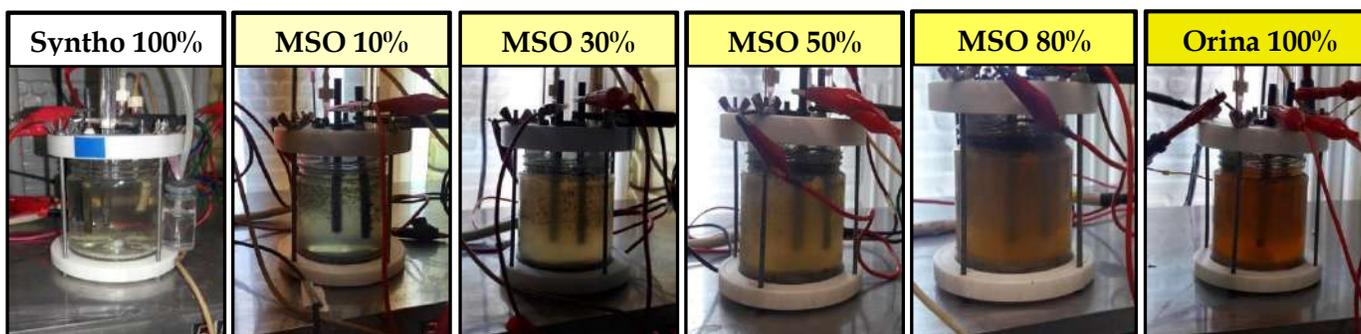
**Figura 4.10.** Distribución porcentual de la comunidad bacteriana obtenida a partir del LCD, de acuerdo con el análisis genómico realizado.

A su vez, y de acuerdo con el análisis de cada uno de los filos mencionados, fue posible determinar la presencia de bacterias del género *Geobacter* (dentro del filo *Proteobacterias*) como parte de la población presente en el lodo, las cuales, como ya se ha mencionado, tienen probada capacidad para degradar moléculas orgánicas simples y canalizar de manera directa los electrones hacia aceptores extracelulares, tanto solubles (por ejemplo, moléculas de fumarato) como insolubles (óxidos de hierro, electrodos polarizados, entre otros). De acuerdo con la caracterización genómica, y en contexto con la respuesta bio-electroquímica obtenida por CV, la corriente generada en los estudios de cronoamperometría se relacionó con la presencia particular de estos microorganismos sobre las superficies de grafito, colonizadas a partir de la población presente en el lodo de partida. Si bien la utilización de lodos cloacales domésticos como inóculo de bacterias electro-activas para la producción de corriente eléctrica sobre electrodos de grafito ya ha sido abordada en la literatura (Yoshizawa et al, 2014; Yusoff et al, 2013), el estudio realizado en esta parte del trabajo resultó fundamental para validar el procedimiento experimental que se utilizó a lo largo de la Tesis bajo las condiciones y *set-ups* empleados.

A partir de estos resultados, se procedió a evaluar posteriormente la capacidad de los ánodos microbianos para producir corriente eléctrica en medios con contenidos variables de orina.

#### 4.5- Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina

Los estudios de producción de corriente a partir de orina se realizaron por triplicado ( $n=3$ ) en celdas de tres electrodos a temperatura controlada ( $30^{\circ}\text{C}$ ). Se utilizaron como ánodos de partida los electrodos de grafito colonizados a partir del LCD (**Figura 4.5 (b)**, derecha). De acuerdo con el protocolo adoptado, una vez alcanzada la densidad de corriente anódica de colonización en presencia del lodo cloacal ( $\sim 0.5 \text{ A/m}^2$ , **Figura 4.7**), los electrodos fueron retirados de la celda y utilizados en una nueva celda, esta vez en ausencia de lodo, de manera de emplear el *biofilm* generado sobre las barras de grafito como única fuente de microorganismos (ánodo microbiano primario). Los ánodos fueron polarizados a un potencial de  $0.2 \text{ V}$  ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) y sometidos a un cambio gradual del medio de cultivo, iniciando los ensayos con Syntho y aumentando paulatinamente la cantidad de orina suministrada a la celda. En este ensayo, denominado *Ensayo de Aclimatación Secuencial* (EAS), se modificó gradualmente la composición del medio de cultivo desde 100% Syntho hasta 100% orina, pasando por distintas mezclas Syntho/Orina (MSO) correspondientes a 10%, 30%, 50% y 80% orina (porcentaje en volumen). La concentración de orina se incrementó en la celda cada dos semanas, de manera de garantizar la adaptación microbiana a los cambios en el medio de cultivo. En todos los casos se utilizó un modo de alimentación continua de la celda, empleando para esto un caudal promedio de  $3.5 \text{ mL/h}$  (al igual que los estudios realizados en presencia del LCD). La **Figura 4.11** muestra fotografías de las celdas para las distintas concentraciones mencionadas.



**Figura 4.11.** Ensayo de aclimatación secuencial (EAS). Celda de tres electrodos con contenidos crecientes de orina en el medio de cultivo. El diluyente utilizado en todos los casos fue Syntho.

Durante el ensayo se monitoreó el pH del sistema, la conductividad iónica y la concentración total de nitrógeno amoniacal (TAN, por sus siglas en inglés). A partir de las medidas de TAN y los valores de pH, se calculó finalmente la concentración de amoníaco libre (FAN, por sus siglas en inglés), parámetro fundamental relacionado con la viabilidad de los microorganismos. Este análisis fue

complementado con la detección (por observación visual) de precipitados en la celda. A fin de establecer además una comparación en términos del contenido de materia orgánica *inicial* en cada medio de alimentación, se determinó para cada uno de ellos la demanda química de oxígeno (DQO, medida de la cantidad de compuestos orgánicos oxidables presentes en el medio). Por último, se calculó la concentración de urea en cada medio de cultivo, con el fin de relacionar esta variable con el contenido de FAN desarrollado en la celda.

La **Tabla 4.1** muestra los valores de cada uno de estos parámetros (medidos en la celda durante su funcionamiento en estado estacionario), en comparación con los valores correspondientes a orina fresca (recién obtenida) y Syntho.

**Tabla 4.1**

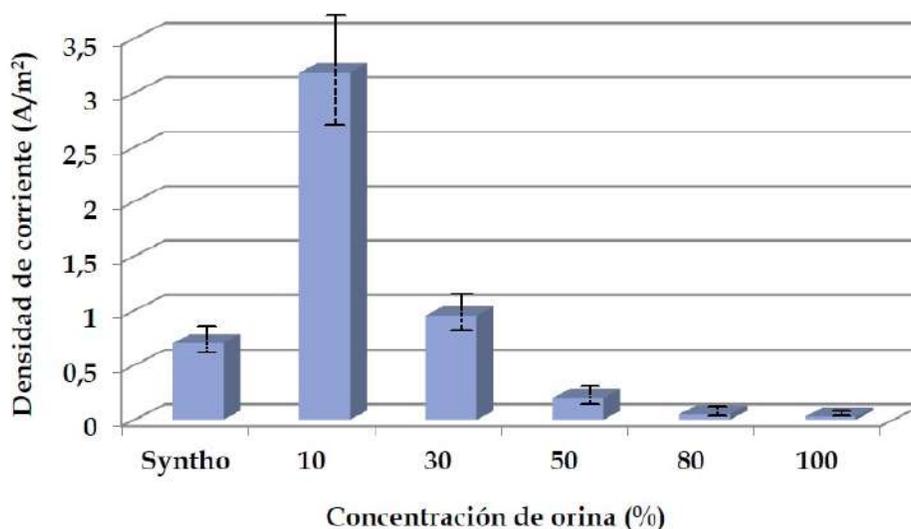
Conductividad iónica, TAN, FAN, pH promedio y presencia de precipitados en el medio de cultivo durante el ensayo de aclimatación secuencial (EAS). Medidas de DQO y concentración de urea para los medios de alimentación antes de su ingreso a la celda.

	Conductividad (mS/cm)	[TAN] (g/L, como N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	[FAN] (mM de NH <sub>3</sub> )	DQO	pH	Urea (mM)	Precipitado
<b>Syntho</b>	0.4	0.02	Despreciable	0.5	6.75	1.62	-
<b>Orina (Fresca)</b>	18	0.89	Despreciable	8	6.25	220-280	-
<b>MSO 10 %</b>	11	1.5	11.7	0.81	8.4	23-29	-
<b>MSO 30 %</b>	22	5	28.5	1.58	8.25	67-85	+
<b>MSO 50 %</b>	46	7.45	58	3.5	8.4	110-140	++
<b>MSO 80 %</b>	64	9.25	72	3.96	8.4	175-225	+++
<b>100 % orina</b>	69	13	124	7.99	8.5	220-280	+++

De acuerdo con el mismo procedimiento descrito en la Sección 4.4, la producción de corriente eléctrica fue monitoreada mediante cronoamperometría. La **Figura 4.12** muestra la evolución de la densidad de corriente en función de la concentración de orina del medio para cada condición en estado estacionario.

La relación entre la densidad de corriente y la concentración de orina siguió un patrón en forma de ‘campana’, evidenciándose un rango de concentraciones - alrededor de 10% - donde la corriente que es posible extraer del sistema es máxima. De acuerdo con la dinámica del sistema frente a los cambios de concentración, se observó inicialmente un marcado incremento en la densidad de corriente (más de cuatro veces) al introducir orina en la celda (de  $0.68 \pm 0.07$  A/m<sup>2</sup> para Syntho a  $3.08 \pm 0.53$  A/m<sup>2</sup> para 10% orina). A fin de justificar esta diferencia se determinaron los valores de DQO de ambos medios de alimentación (~ 0.8 g/L para 10% orina y 0.5 g/L para Syntho, **Tabla 4.1**), sin embargo el aumento en el

contenido total de compuestos oxidables en la celda no permitiría justificar *per se* la diferencia de corriente observada.



**Figura 4.12.** Densidad de corriente eléctrica estacionaria ( $j$ ) en función de la concentración de orina durante el EAS.

Como se mencionó en la Sección 4.2, además de analizar la cantidad de materia orgánica presente en el medio de cultivo debe tenerse en cuenta además la bio-degradabilidad o calidad metabólica de la misma. De acuerdo con la composición elemental de la orina humana - en función de sus principales metabolitos orgánicos (**Figura 1.6**, Capítulo 1) - fue posible estimar *a priori* la bio-degradabilidad de la misma. Teniendo en cuenta la composición porcentual de dichos metabolitos, se determinó la relación molar elemental entre C, H, O y N para la orina. La **Tabla 4.2** muestra esta relación en comparación con la correspondiente a Syntho y a cada medio MSO utilizado.

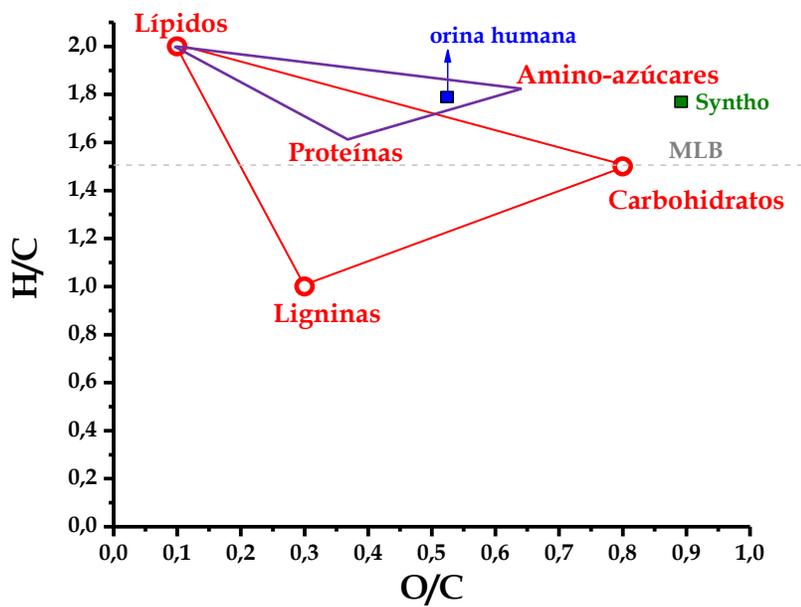
**Tabla 4.2**

Relación molar elemental para los medios de cultivo utilizados en el EAS

	H/C	O/C	N/C
Syntho	1.77	0.89	0.032
MSO 10%	1.79	0.58	0.3
MSO 30%	1.79	0.53	0.36
MSO 50%	1.79	0.52	0.38
MSO 80%	1.79	0.52	0.39
Orina	1.79	0.51	0.39

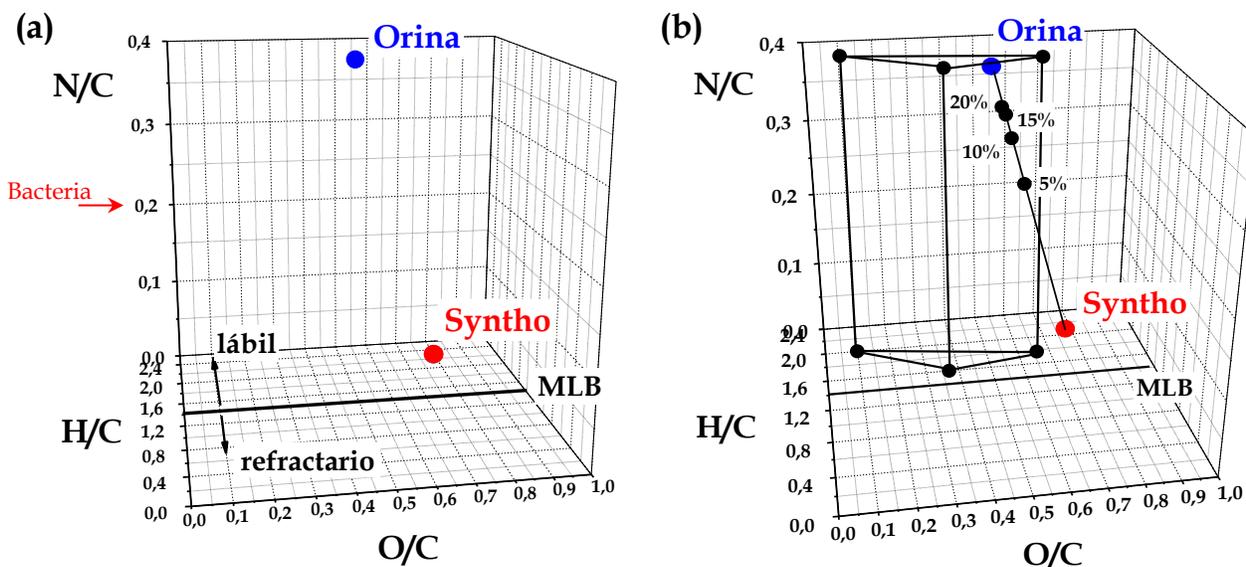
## Capítulo 4

Una de las maneras más utilizadas para evaluar la bio-degradabilidad de una muestra a partir de su composición elemental es mediante la utilización de diagramas - denominados diagramas de *van Krevelen* - que permiten visualizar gráficamente dicha composición en relación con zonas/regiones de mayor o menor degradabilidad biológica (Visser, 1983; D'Andrilli et al, 2015). Los diagramas se representan generalmente de manera bidimensional (2D), donde uno de los ejes (ordenada) muestra la relación molar H/C y el otro la relación O/C. De acuerdo con estas relaciones para la muestra de interés, el diagrama permite ubicar su composición respecto a familias de compuestos de bio-degradabilidad conocida (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, proteínas). La ventaja de esta aproximación es que permite a su vez simplificar el análisis de la muestra vinculando su composición elemental promedio respecto a una *región de máxima bio-degradabilidad*, correspondiente a compuestos ricos en heteroátomos que actúan como fuente de electrones y carbono para el metabolismo microbiano (triángulo composicional comprendido por la familia de lípidos, proteínas y amino-azúcares) (D'Andrilli et al, 2015). La **Figura 4.13** muestra el diagrama de van Krevelen 2D construido a partir de las composiciones elementales de orina y Syntho mostradas en la **Tabla 4.2**. Es interesante notar en nuestro caso que la composición promedio de la orina humana cae dentro de la región de máxima bio-degradabilidad, lo que no ocurre con Syntho. A pesar de tener una relación H/C similar a la de la orina, Syntho muestra una relación O/C considerablemente mayor, lo que es indicativo (en promedio) de un medio más oxidado y, consecuentemente, con menor disponibilidad de electrones y energía para ceder.



**Figura 4.13.** Diagrama de van Krevelen 2D. Se indica la composición elemental promedio de la orina humana (azul) y Syntho (verde). Se indican además las composiciones típicas correspondientes a las familias de carbohidratos, proteínas, lípidos, amino-azúcares y ligninas (triángulo rojo). El triángulo violeta (lípidos/proteínas/amino-azúcares) representa la región composicional correspondiente a la materia orgánica de mayor bio-degradabilidad. La línea gris punteada (para la relación  $H/C=1.5$ ) demarca el denominado *límite de labilidad molecular* (MLB), debajo del cual se encuentran aquellos compuestos con comportamiento más refractario a la degradación biológica.

Debido a que la mayoría de los medios de cultivo que se utilizan en estudios de desarrollo microbiano contienen además compuestos nitrogenados, se ha propuesto la extensión de los diagramas de van Krevelen a tres dimensiones (3D), incorporando a la discusión la relación molar  $N/C$  de la muestra (Sleighter y Hatcher, 2007; Rivas-Ubach et al, 2018). La **Figura 4.14 (a)** muestra el diagrama 3D construido de acuerdo con las relaciones mostradas para orina y Syntho en la **Tabla 4.2**. El análisis tridimensional permitió extender la discusión y poner aún más en evidencia la diferencia entre orina y Syntho. La principal distinción entre ambos medios reside en la relación  $N/C$  (0.39 para orina y 0.032 para Syntho), lo que impacta directamente - de acuerdo con estudios de la literatura - sobre la bio-degradabilidad de la materia orgánica asociada a cada medio, y condiciona la cantidad de microorganismos capaces de crecer en cada uno de ellos.



**Figura 4.14.** Diagrama de van Krevelen 3D. **(a)** Se observa la diferencia fundamental entre orina y Syntho en el eje N/C. La flecha roja indica la relación N/C (0.2) correspondiente a la composición elemental promedio de una bacteria ( $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ ). **(b)** Efecto del incremento de la concentración de orina en la composición promedio del medio de alimentación (MSO), respecto del triángulo de máxima bio-disponibilidad. En ambas figuras MLB corresponde a la relación H/C que determina el *límite de labilidad molecular*.

Los estudios mencionados han revelado que la asimilación de materia orgánica, y el consecuente crecimiento microbiano, dependen fuertemente de la composición elemental del medio de cultivo respecto de la relación N/C correspondiente a la composición bacteriana promedio ( $\text{N/C} = 0.2$ ) (Goldman et al, 1987; Vallino et al, 1996). Así, medios de alimentación con relaciones N/C superiores a la de la estructura bacteriana han demostrado inducir un crecimiento microbiano preferencial, independientemente de la naturaleza de la fuente de C y N (siempre y cuando, por supuesto, el compuesto nitrogenado empleado no resulte tóxico para la población microbiana). En este contexto es interesante notar también cómo, para el ensayo de aclimatación realizado, las composiciones de los distintos medios de orina utilizados permiten al sistema ‘desplazarse e ingresar’ progresivamente al triángulo de mayor bio-degradabilidad (**Figura 4.14 (b)**), generando condiciones de menor relación O/C (menor grado de oxidación, mayor cantidad de electrones disponibles) y de relación N/C por encima de la correspondiente a la estructura microbiana promedio (lo que favorecería el crecimiento bacteriano).

Este análisis permitiría suponer inicialmente un incremento en la cantidad de microorganismos desarrollados al incorporar orina en la celda, lo que fue comprobado experimentalmente a partir de medidas de ADN y conteo bacteriano sobre el *biofilm* anódico ( $8.6 \times 10^8$  bacterias electro-activas cuando el sistema se alimentó con Syntho frente a  $2.62 \times 10^9$  en 10% orina). Además de su elevada bio-

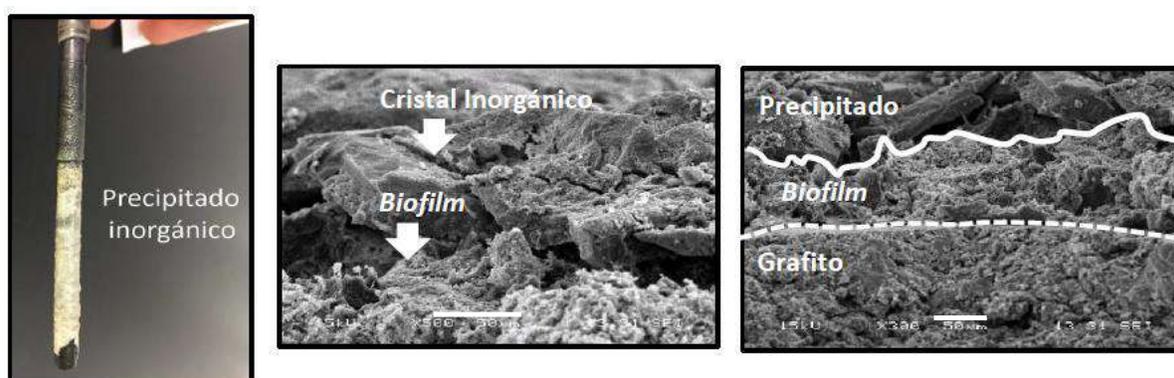
degradabilidad en términos generales, la orina contiene moléculas capaces de ser aprovechadas para la producción de corriente eléctrica (acetato y creatinina, por ejemplo, como se mencionó en la Sección 4.2 y se discutirá en la Sección 4.7), lo que redundaría en los notorios efectos observados por cronoamperometría al suplementar 10% orina como medio de alimentación en comparación con Syntho.

En este contexto, se hubiera esperado un incremento continuo y sostenido en el tiempo de la corriente producida al trabajar con concentraciones de orina en aumento. Sin embargo, la producción de corriente se vio fuertemente comprometida al utilizar concentraciones iguales y/o mayores al 30% ( $0.90 \pm 0.10 \text{ A/m}^2$ , **Figura 4.12**), observándose una caída exponencial de la carga entregada por el sistema hasta alcanzar los valores más bajos en presencia de orina pura ( $0.05\text{-}0.1 \text{ A/m}^2$ ). Estos últimos se corresponden en excelente acuerdo con los reportados en estudios previos para MFCs alimentadas con orina (Ieropoulos et al, 2013; Pant et al, 2010).

A fin de dar una explicación a la caída de corriente eléctrica para concentraciones de orina en aumento, se analizaron los parámetros determinados en la celda durante el funcionamiento de la misma (**Tabla 4.1**). De acuerdo con este análisis, la disminución en el desempeño bio-electroquímico fue atribuida principalmente a la inhibición de la población microbiana sobre el ánodo, como consecuencia de fenómenos físico-químicos desencadenados en la celda a partir de concentraciones de orina superiores al 10%. Uno de estos eventos se encuentra directamente relacionado con el aumento en el contenido inicial de urea en el reactor. Este compuesto es degradado enzimáticamente en la celda, conduciendo a un aumento del pH del medio como consecuencia de la generación de amoníaco libre (el pH alcanza valores estables de  $\sim 8.3\text{-}8.5$  bajo las condiciones del experimento, correspondientes a la formación de un sistema buffer amonio/amoniaco). De acuerdo con los valores reportados en la **Tabla 4.1**, puede apreciarse la relación que existe entre el contenido de amoníaco libre (FAN) y la concentración de urea del medio de cultivo utilizado como alimentación. En particular, y de relevancia para los fines del experimento, el amoníaco ha sido identificado en diversos estudios como un compuesto esencialmente tóxico frente a microorganismos (principalmente bacterias), debido a su capacidad para penetrar las membranas celulares y alterar el pH interno bacteriano (con la consecuente inactivación metabólica) (Kadam y Boone, 1996; Müller et al, 2006; Delgado et al, 2016; Tian et al, 2018). Es interesante notar que, para concentraciones de orina de 30% y/o superiores (donde la caída de la corriente es particularmente notoria), los niveles de amoníaco libre producidos resultaron ser ampliamente superiores a los reportados en bibliografía para los límites de viabilidad microbiológica en sistemas similares (Sprot et al, 1986; Kadam y Boone, 1996; Rajagopal et al, 2013).

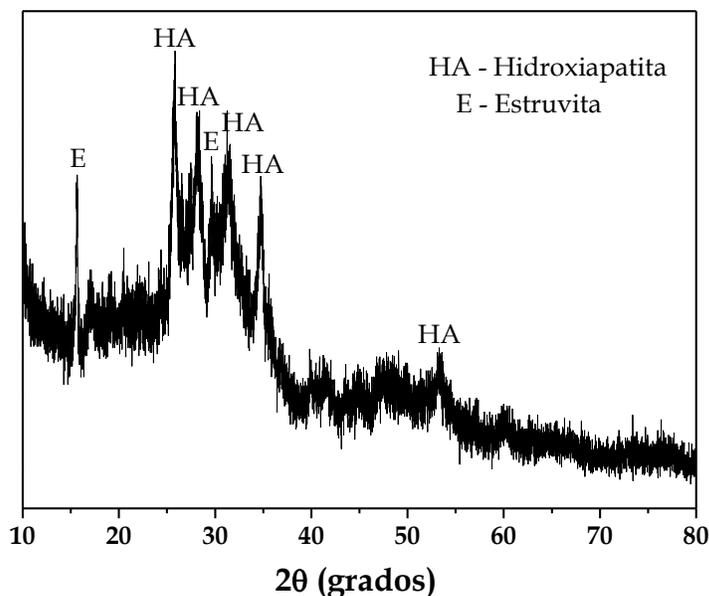
Además de los efectos provocados por las altas concentraciones de amoníaco, el proceso microbiológico de generación de corriente se vio también afectado por la precipitación de sales inorgánicas al pH del medio, como consecuencia del aumento en el contenido de iones (fundamentalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) con el incremento en la proporción de orina. Los precipitados, observados a partir de una concentración de 30% (**Tabla 4.1**), se depositaron tanto sobre las paredes de la celda como sobre la superficie de todos los electrodos de la celda. Esto condujo, en el caso particular del electrodo de trabajo, al ‘aislamiento’ del *biofilm* (lo que podría asemejarse a un proceso de ‘pasivado’ anódico) y a la consecuente disminución de la actividad microbiológica. Asimismo, la pérdida de superficie efectiva del contra-electrodo también fue identificado como otro de los efectos contraproducentes para el normal funcionamiento de la celda.

La **Figura 4.15** muestra una fotografía del ánodo ‘pasivado’ por precipitación obtenido en un medio conteniendo 30% orina, así como imágenes de microscopía SEM de un corte transversal del mismo



**Figura 4.15.** Fotografía del ánodo cubierto por precipitados generados en un medio MSO 30%. Las imágenes SEM muestran un corte transversal del electrodo donde se observa la presencia de cristales facetados depositados sobre el *biofilm*. Barras: 50 µm

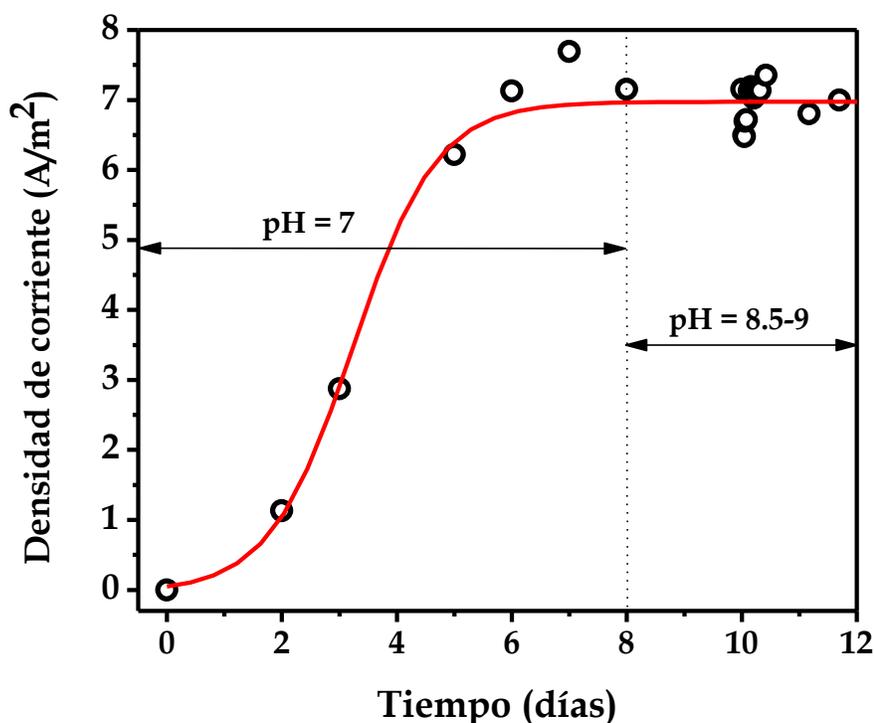
El material adherido a la barra de grafito (*biofilm* + precipitado) fue extraído para su análisis por difracción de rayos X (XRD). La **Figura 4.16** muestra el difractograma obtenido, a partir del cual se determinaron las principales fases inorgánicas cristalinas depositadas: *estruvita* ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e *hidroxiapatita* ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_6)(\text{OH})_2$ ). Este resultado está en acuerdo con estudios previos de modelado computacional de sistemas de recolección de orina. En éstos, se ha demostrado que, de acuerdo con las condiciones de pH asociadas a la hidrólisis de urea y en función de la concentración y solubilidad de las sales presentes en un medio conteniendo orina, tanto la *estruvita* como la *hidroxiapatita* son las principales fases inorgánicas generadas por precipitación, a concentraciones de orina comparables a las estudiadas en esta Tesis (Udert et al, 2003).



**Figura 4.16.** Difractograma del ‘material’ adherido al ánodo obtenido en un medio conteniendo 30% orina. Los patrones correspondientes a las principales fases cristalinas (*estruvita* e *hidroxiapatita*) se observan sobre un ‘fondo’ de baja cristalinidad, el que podría estar asociado al material biológico del *biofilm* (células + matriz extracelular).

Además de los efectos de inhibición microbiana por exposición a altas concentraciones de amoníaco y fenómenos de precipitación, se analizó por último el efecto producido *per se* por el aumento del pH en la celda, de manera de desacoplar los efectos de pH de aquellos desencadenados por hidrólisis de la urea. Para esto, se realizó un experimento con la cepa bacteriana modelo *G Sulfurreducens* (DM12127, DSMZ, Alemania), la cual se inoculó en celdas de tres electrodos como las empleadas para los estudios en presencia de orina, utilizando barras de grafito no porosas como electrodo de trabajo y bajo la misma modalidad de operación (período inicial en *batch* y posterior alimentación en modo continuo). En este caso se empleó un medio de cultivo típico para *G. Sulfurreducens* (conteniendo acetato como fuente de materia orgánica) en lugar de orina. Para modificar el pH del sistema libremente, se eliminó de la formulación del medio de cultivo el  $\text{NaHCO}_3$ , evitando así la formación del sistema *buffer*  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ . De esta forma, el cambio de pH se llevó a cabo de manera controlada en la celda a partir de la modificación de la proporción de gases  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  utilizados para el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas del sistema. El ensayo se llevó a cabo a un pH inicial de 7, el cual - una vez estabilizado el sistema - se modificó a valores correspondientes a los medidos en la celda en presencia de orina (8.5-9, **Tabla 4.1**). La **Figura 4.17** muestra los resultados obtenidos por cronoamperometría.

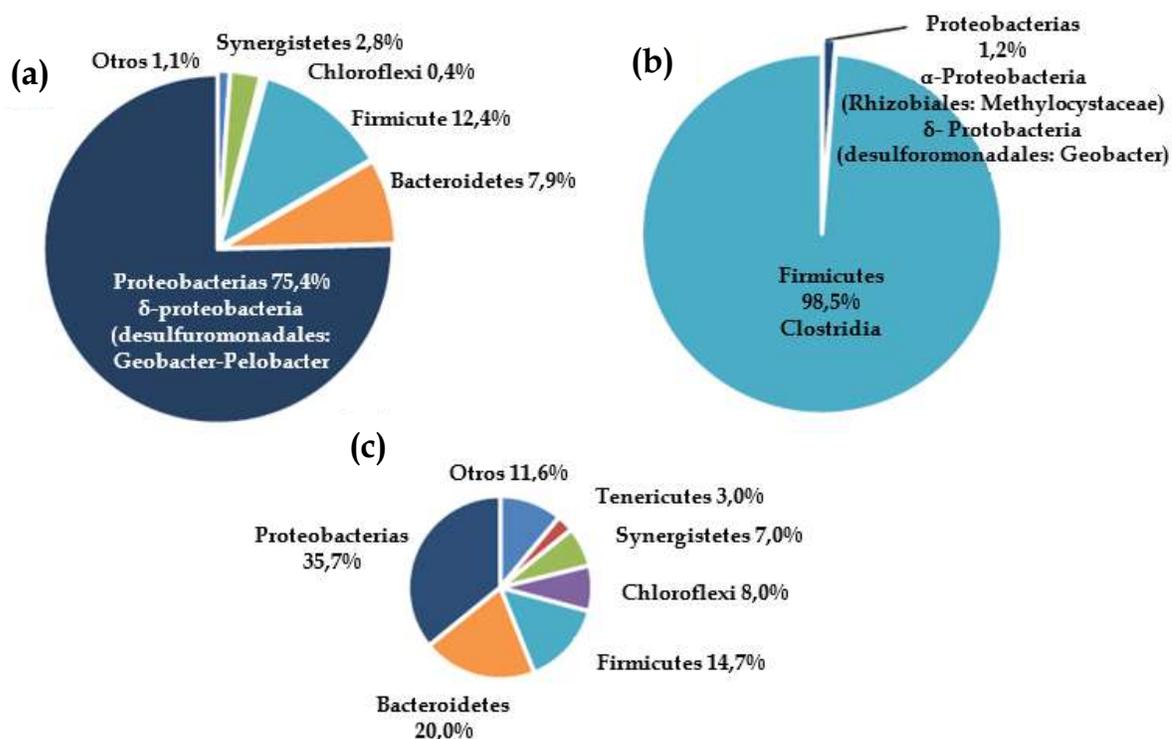
Como puede observarse, una vez estabilizada la densidad de corriente, el cambio de pH del medio no condujo a modificaciones significativas de la misma, manteniendo valores de  $\sim 7 \text{ A/m}^2$  típicos para esta cepa bacteriana bajo condiciones de polarización. Este ensayo, en conjunto con el hecho de que a 10% orina el sistema - aun desarrollando un pH de  $\sim 8.5$  - no evidenció caída en la corriente, demostró que el efecto de inhibición microbiana no puede ser justificado sólo por el valor de pH, reforzando la propuesta de inhibición conjunta por efectos citotóxicos y de precipitación de sales inorgánicas.



**Figura 4.17.** Cronoamperometría correspondiente al crecimiento de *G. sulfurreducens* y su desempeño bioelectroquímico a diferentes valores de pH.

A fin de identificar las poblaciones microbianas presentes sobre los ánodos para distintas concentraciones de orina, y de relacionarlas con los eventos inhibitorios mencionados, se llevaron a cabo estudios genómicos de los *biofilms* desarrollados. Para esto se realizaron extracciones y secuenciaciones del ADN genómico total para cada condición, de manera análoga a los estudios presentados en la Sección 4.4. Las muestras seleccionadas para este fin fueron: (i) el *biofilm* anódico en el sistema alimentado con 10% orina (lo que permitió evaluar la población microbiana correspondiente al máximo de densidad de corriente); y (ii) el *biofilm* desarrollado en el sistema suplementado con 100% orina (con el objeto de determinar la población presente bajo condiciones de inhibición extrema).

La **Figura 4.18** muestra las comunidades bacterianas correspondientes a los estadios mencionados. Se incorpora además en esta figura, para facilitar la comparación, la distribución de microorganismos presentes en el LCD, mostrada originalmente en la **Figura 4.10**.



**Figura 4.18.** Composición de la comunidad bacteriana presente en el *biofilm* de (a) un ánodo microbiano proveniente de un medio conteniendo 10% orina, y (b) un ánodo proveniente de un medio conteniendo 100% orina. En (c) se muestra (a modo comparativo) la comunidad bacteriana original presente en el LCD.

Mientras que el lodo utilizado como inóculo mostró una gran variedad de *filos* en su composición, los ánodos colonizados luego del período de aclimatación en 10% orina mostraron un enriquecimiento preferencial en *Proteobacterias* (de 35.7% en el lodo a 75.4% luego de la aclimatación, **Figura 4.18 (a)**), con *Geobacter* y *Pelobacter* como los principales géneros encontrados. Este enriquecimiento en bacterias electro-activas se reflejó directamente en el incremento de la densidad de corriente eléctrica al incorporar orina en el reactor. Sin embargo, el análisis de la comunidad bacteriana en presencia de orina pura mostró una clara pérdida de *Proteobacterias*, alcanzando niveles de tan sólo 1.2% (**Figura 4.18 (b)**). Un aspecto interesante a remarcar en este último caso es el notable enriquecimiento del filo *Firmicutes* en la composición del *biofilm* anódico (98,5%), con *Tissierella* como el principal género encontrado. La presencia de este género bacteriano (no electro-activo) ya ha sido reportada en sistemas conteniendo orina humana pura, demostrándose su capacidad para metabolizar creatinina, utilizándola como única

fuelle de carbono y produciendo acetato como producto metabólico final (Barbosa et al, 2017). Como se mencionó, el acetato es la principal fuente de carbono y de electrones utilizada en el metabolismo de microorganismos electro-activos (como *Geobacter*, por ejemplo). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de secuenciación, las densidades de corriente detectadas durante el EAS podrían ser directamente atribuidas a la colaboración sinérgica de microorganismos no electro-activos capaces de producir acetato en el *biofilm* anódico (*Tissierella*) y microorganismos electro-activos capaces de transformar el acetato en corriente eléctrica (*Geobacter*). Estos resultados pueden así relacionarse, por un lado, con las bajas densidades de corriente frecuentemente reportadas en sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina pura (fuerte inhibición de bacterias electro-activas en el *biofilm* anódico); y, por otro, permitir proponer un método de mitigación de estos efectos (Sección 4.5), con el objeto de superar las limitaciones encontradas en la producción de corriente.

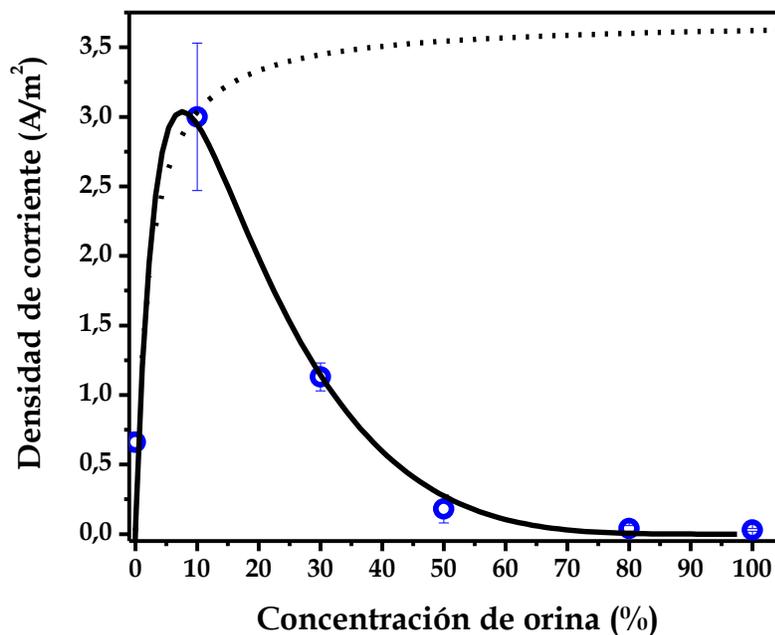
El intercambio de electrones con el electrodo y, en consecuencia la densidad de corriente eléctrica, puede ser utilizado como parámetro efectivo para cuantificar la velocidad de procesos metabólicos mediante una expresión simple similar a la propuesta por Monod (Franzetti et al, 2017). La ecuación de Monod, adaptada al sistema de trabajo, puede representarse de la siguiente forma:

$$j([\text{orina}]) = j_{\text{max}} \cdot \frac{[\text{orina}]}{K_M + [\text{orina}]}$$

donde  $j$  es la densidad de corriente,  $[\text{orina}]$  es la concentración de orina (%) y,  $K_M$  y  $j_{\text{max}}$  son constantes empíricas del modelo. De acuerdo con un sistema microbiológico metabólicamente inhibido, se llevó a cabo un ajuste de los resultados de densidad de corriente en función de la concentración de orina (**Figura 4.12**), empleando un modelo matemático que tiene en cuenta eventos inhibitorios por efecto de la concentración de sustrato (modelo de Han/Levenspiel) (Han y Levenspiel, 1998). Este modelo, a diferencia del modelo empírico de Monod (que se emplea habitualmente para representar la dinámica de crecimiento bacteriano en condiciones *no inhibidas*), toma la forma de:

$$j = j_{\text{max}} \cdot \left(1 - \frac{[\text{urine}]}{[\text{urine}]^*}\right)^n \cdot \frac{[\text{urine}]}{[\text{urine}] + K_M \cdot \left(1 - \frac{[\text{urine}]}{[\text{urine}]^*}\right)^m}$$

donde  $[\text{orina}]^*$  es la concentración de orina a densidad de corriente tendiendo a cero ( $j \rightarrow 0$ ), y  $n$  y  $m$ , son constantes de ajuste. Este modelo permitió modelar de manera satisfactoria los puntos experimentales. La **Figura 4.19** muestra el ajuste obtenido y la curva de crecimiento teórica correspondiente a un sistema no inhibido simulada con el modelo de Monod.



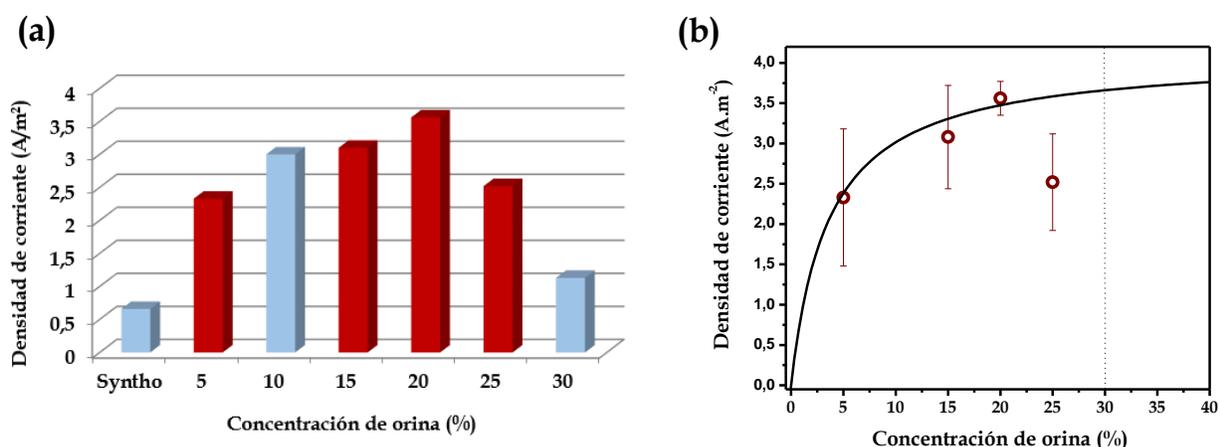
**Figura 4.19.** Valores experimentales del EAS (símbolos azules) ajustados con el modelo de Han/Levenspiel correspondiente a un crecimiento microbiano inhibido (línea continua). En la figura se simula a modo comparativo un perfil de crecimiento no inhibido de acuerdo con el modelo de Monod (línea punteada).

Si bien los modelos tradicionales de cinética de crecimiento microbiano han sido desarrollados en su gran mayoría para sistemas suplementados con un único sustrato (compuesto orgánico único) y/o cepas puras (no consorcios), la aproximación semi-empírica utilizada en este trabajo permitió demostrar que el modelo de Han/Levenspiel puede ser efectivamente empleado para reproducir el comportamiento resultante de nuestro sistema durante el proceso de aclimatación, de acuerdo con un patrón de inhibición en un medio conteniendo una multiplicidad de sustratos orgánicos. Como puede verse en la figura, este modelo permite simular, para concentraciones superiores a 10%, la desviación del comportamiento microbiano respecto a un crecimiento no inhibido.

Sobre la base de estos resultados, se decidió estudiar el efecto de la concentración de orina en un rango acotado en torno a la concentración correspondiente al máximo de densidad de corriente observado. El objetivo fue detectar una concentración óptima que permita generar la mayor cantidad de carga eléctrica bajo las condiciones experimentales ensayadas, evitando simultáneamente los efectos inhibitorios mencionados.

#### 4.6- Producción de corriente a partir de orina: estudio de la concentración óptima

Para evaluar las concentraciones de orina en torno al 10 % se llevó a cabo un EAS utilizando el mismo *set-up* experimental presentado en la Sección 4.5. Esto permitió determinar una concentración más precisa a partir de la cual los efectos inhibitorios juegan un papel dominante, y por lo tanto establecer una concentración de trabajo capaz de producir la mayor densidad de corriente en el sistema estudiado. Se evaluaron cuatro concentraciones adicionales, una por debajo de 10% (5%) y tres por encima (15, 20 y 25%), cubriendo de esta manera el rango comprendido hasta 30%, concentración esta última a partir de la cual los efectos inhibitorios condicionaron la producción de corriente eléctrica. La **Figura 4.20 (a)** muestra el perfil de densidad de corriente obtenido al trabajar en esta ventana de concentraciones.

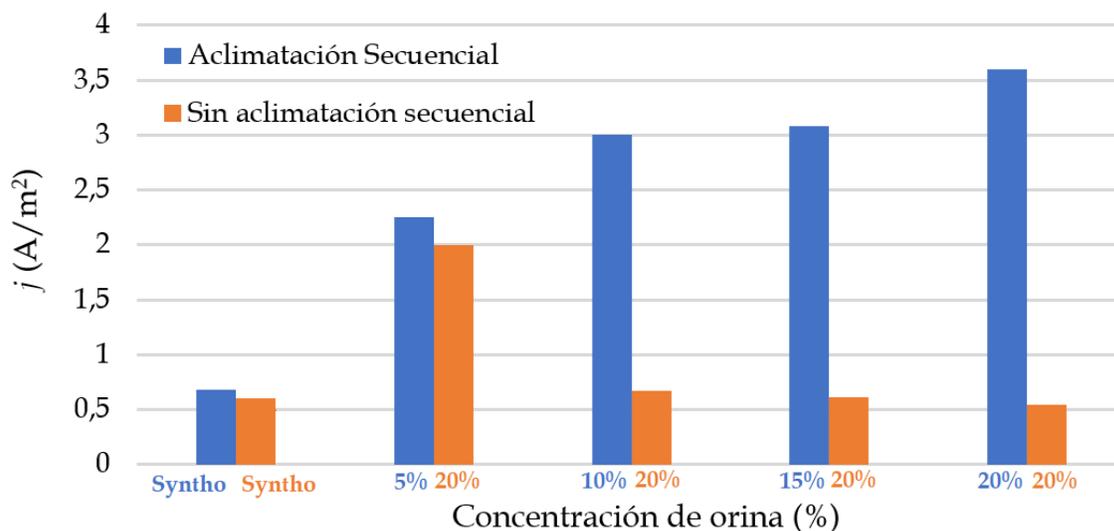


**Figura 4.20. (a)** Densidad de corriente eléctrica para el rango de concentraciones acotadas. Las barras *bordó* corresponden a las nuevas concentraciones evaluadas. **(b)** Ajuste de los nuevos puntos experimentales con el modelo de Monod.

Los resultados mostraron la posibilidad de extender la concentración de orina hasta un 20% sin evidenciar efectos inhibitorios. Esto condujo efectivamente a un incremento continuo en la densidad de corriente, esta vez de acuerdo con un perfil no inhibido de tipo Monod (**Figura 4.20 (b)**). Las densidades más elevadas ( $3.6 \pm 0.2$  A/m² para 20% orina) representaron un aumento significativo (más 35 veces) respecto de los valores obtenidos a partir de orina pura (0.1 A/m², **Figura 4.12**). En este rango de concentraciones - hasta 20% - fue posible evitar la producción excesiva de amoníaco libre (~ 13 mM para 20% orina) y simultáneamente la precipitación extensiva de sales en la celda, lo que repercutió en el aprovechamiento más eficiente de los compuestos presentes en la orina. Cuando se evaluó el sistema para una concentración de 25%, la densidad de corriente se apartó de la tendencia en aumento, conduciendo a una caída ( $\sim 2.5 \pm 0.6$  A/m²) en transición hacia los valores correspondientes a 30%. De acuerdo con los efectos inhibitorios discutidos, concentraciones de 25% o superiores hacen inviable el

proceso de aclimatación microbiana en el sistema estudiado, ya sea tanto desde un punto de vista bioquímico (concentración de amoníaco libre ~ 20 mM para 25% orina) como físico (comienzo de los eventos de precipitación).

Como último paso del proceso de optimización se evaluó la posibilidad de reducir los tiempos de obtención de la máxima densidad de corriente (30-35 días considerando todas las etapas experimentales). Para esto se determinó, dentro del rango libre de inhibición, si el protocolo de aclimatación secuencial (aumento progresivo de la concentración de orina en el medio de cultivo) es un factor relevante o podría prescindirse del mismo. Para esto, los resultados obtenidos durante la aclimatación se compararon con los de un nuevo ensayo en donde el cambio a la concentración de orina 'óptima' (20%) se llevó a cabo en una sola etapa, pasando directamente de Syntho a MSO 20% (sin contemplar las concentraciones previas). De igual manera a los ensayos anteriores, se siguió la corriente eléctrica en el tiempo mediante cronoamperometría en una celda de tres electrodos bajo las mismas condiciones experimentales. La **Figura 4.21** muestra los resultados obtenidos, contrastados con los mostrados en la **Figura 4.20** hasta la concentración óptima encontrada.



**Figura 4.21.** Densidad de corriente en función de la concentración de orina evaluada bajo dos modalidades: con (azul) y sin (naranja) aclimatación secuencial.

En la figura se observa como la densidad de corriente máxima obtenida con 20% orina en ausencia de aclimatación (2 A/m²) es considerablemente menor a la máxima obtenida al aclimatar la población microbiana (3.6 A/m²). Con el fin de evaluar si el tiempo podía ser responsable de los elevados valores obtenidos en el proceso de aclimatación, el ensayo 'no aclimatado' se mantuvo durante cuatro semanas (desde el pasaje de Syntho a 20% orina). Con el paso del tiempo se observó claramente la caída en la

producción de corriente eléctrica, estabilizándose para valores promedio de  $\sim 0.5 \text{ A/m}^2$ . En consecuencia, para la obtención de los resultados mostrados en la **Figura 4.20** (densidades de corriente máximas de  $3.6 \text{ A/m}^2$ ) es efectivamente necesario un proceso de aclimatación previa.

De acuerdo con los resultados mostrados en esta sección, la adopción de un protocolo de dilución de orina en una ventana de concentración adecuada, en conjunto con una estrategia de aclimatación microbiológica a concentraciones de orina crecientes, conduce efectivamente a la optimización de los procesos bio-electroquímicos de producción de corriente cuando se emplea orina como fuente de materia orgánica bio-degradable.

### 4.7- Simulación bio-termodinámica de las densidades de corriente

Sobre la base de los resultados mostrados en la Sección 4.6 se llevó a cabo una aproximación teórica al sistema bajo estudio, con el objeto de simular las densidades de corriente en función de la concentración de orina en el rango en el que el sistema se encuentra libre de inhibición.

Si bien existe en la literatura una gran variedad de modelos que permiten simular *parámetros de salida* de BESs (por ejemplo, densidades de corriente, potencias, gradientes de concentración de sustrato en el *biofilm* bacteriano, entre otros) (Piciooreanu et al, 2007; Torres et al, 2008; Kato Marcus et al, 2011), todos ellos utilizan una cierta cantidad de *variables de entrada* (datos de alimentación de los modelos) obtenidas a partir de resultados experimentales (por ejemplo, velocidades máximas de crecimiento microbiano para géneros bacterianos específicos, constantes cinéticas de los procesos de degradación de materia orgánica, entre otros), las que aún no están disponibles en la literatura para sistemas alimentados con orina. Con el objeto de sortear este obstáculo - y como aporte adicional del trabajo de Tesis - se llevó a cabo un estudio de la dinámica microbiana a partir de leyes de primeros principios, empleando una *interpretación termodinámica del metabolismo de bacterias electro-activas*. Esto permitió vincular la densidad de energía catabólica presente en el medio de cultivo (para cada concentración de orina en el rango 0-20%) con la velocidad de crecimiento de los microorganismos, la que se utilizó finalmente para calcular la velocidad de consumo de materia orgánica y la carga eléctrica generada por unidad de tiempo y unidad de área de electrodo (densidad de corriente).

El modelado matemático es una de las herramientas más útiles para el estudio teórico de los BESs. Permite, por un lado, disminuir el tiempo experimental invertido en ensayos de tipo 'prueba y error', simplificando a su vez los diseños experimentales de acuerdo con las variables críticas que emerjan del estudio teórico (Jadhav et al, 2020). La versatilidad de los modelos matemáticos permite condensar

además la complejidad fenomenológica de los BESs en una serie de ecuaciones acopladas, a partir de las cuales es posible describir el efecto de las variables del sistema sobre la respuesta final de salida. Los modelos que han sido utilizados hasta el momento en el área bio-electroquímica pueden dividirse en dos grandes familias: (i) **modelos estadísticos**, y (ii) **modelos ingenieriles/bio-físicos** (Luo et al, 2016). Los primeros se focalizan en relaciones de tipo 'input-output', haciendo uso de una gran cantidad de datos experimentales como parámetros de alimentación de los mismos, renunciando de cierta forma a la 'visualización' de la física subyacente a los fenómenos involucrados (motivo por el cual son generalmente denominados modelos de tipo 'caja negra'). Contrariamente, los modelos bio-físicos abordan la 'imagen física' del sistema bajo estudio, construyendo las interfases del mismo a partir de dominios que contemplan los aspectos físico-químicos, microbiológicos y electroquímicos que gobiernan la dinámica del proceso de producción de corriente (Kato Marcus 2007; Torres et al, 2008).

Si bien existe en la literatura una gran variedad modelos que se han empleado con éxito para la simulación de densidades de corriente de BESs, éstos han abordado generalmente medios de cultivo tradicionales (por ejemplo, medios sintéticos conteniendo acetato como única fuente de materia orgánica) y cepas puras de microorganismos electro-activos (por ejemplo, *Shewanella* o *Geobacter*), lo que ha servido para validar la estructura de los modelos bajo condiciones simplificadas, dejando la puerta abierta a su utilización en escenarios más complejos. Estos sistemas más complejos han comenzado a abordarse en los últimos años, demostrando la validez de las aproximaciones y enfoques propuestos (Littfinski et al, 2022). Muy recientemente han aparecido las primeras aproximaciones teóricas a BESs alimentados con orina. Sin embargo, los modelos empleados - todos de tipo estadístico - se han basado en análisis numéricos, lo que ha dejado de lado posibles interpretaciones y visualizaciones físico-químicas de los sistemas estudiados (de Ramón-Fernández et al, 2019; de Ramón-Fernández, 2020). Claramente, la manera de alcanzar tal interpretación es recurrir a aproximaciones de tipo bio-físicas. La estructura teórica desarrollada a la fecha dentro de este tipo de modelos es robusta; sin embargo, también hace uso de una mínima cantidad de parámetros experimentales para realizar los cálculos de interés (por ejemplo, velocidades máximas de crecimiento microbiano, constantes cinéticas de degradación de sustrato, cantidad de microorganismos electro-activos presentes en el ánodo, coeficientes de difusión, entre otros) (Picioreanu et al, 2007; Korth et al, 2015). Es justamente debido a la falta de estos parámetros, obtenidos experimentalmente en presencia de orina, que no existen a la fecha simulaciones de BESs alimentados con orina basadas en interpretaciones ingenieriles/bio-físicas.

## Capítulo 4

*El objetivo en esta parte del trabajo de Tesis fue proponer una alternativa al respecto, elaborando una aproximación 'visualizable' del sistema estudiado que permita reproducir las densidades de corriente obtenidas en función de la concentración de orina, en la ventana composicional donde la población electro-activa se encuentra libre de inhibición.*

Para lograr esto se trabajó en el marco del área conocida como **bio-termodinámica**. La bio-termodinámica - desarrollada en la década de los años 1990 de la mano de los trabajos de von Stockar, Heijnen y van Loosdrecht - sienta sus bases en la aplicación de leyes termodinámicas al metabolismo microbiano (**termodinámica de procesos irreversibles**). En este marco teórico es posible predecir el comportamiento del sistema biológico, en cuanto a rendimiento (cantidad de microorganismos capaces de crecer bajo condiciones experimentales definidas) y velocidad de crecimiento, abordando tanto la estequiometría como la cinética del proceso de replicación celular. En las siguientes secciones se introducen los conceptos más relevantes vinculados con ambos dominios (estequiometría y cinética), los que fueron empleados para el desarrollo del modelo propuesto.

### 4.7.1- Estequiometría del crecimiento microbiano

De acuerdo con los conceptos discutidos en la Sección 4.1, los procesos microbiológicos pueden ser interpretados como una reacción química convencional (reactivos  $\rightarrow$  productos). Así, teniendo en cuenta el metabolismo microbiano (catabolismo/anabolismo) y los balances energéticos asociados ( $\Delta G_{\text{catabólico}}$ ,  $\Delta G_{\text{anabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ ), las transformaciones a nivel celular pueden visualizarse más detalladamente - para el caso particular de una bacteria - de la siguiente manera (**Figura 4.22**):

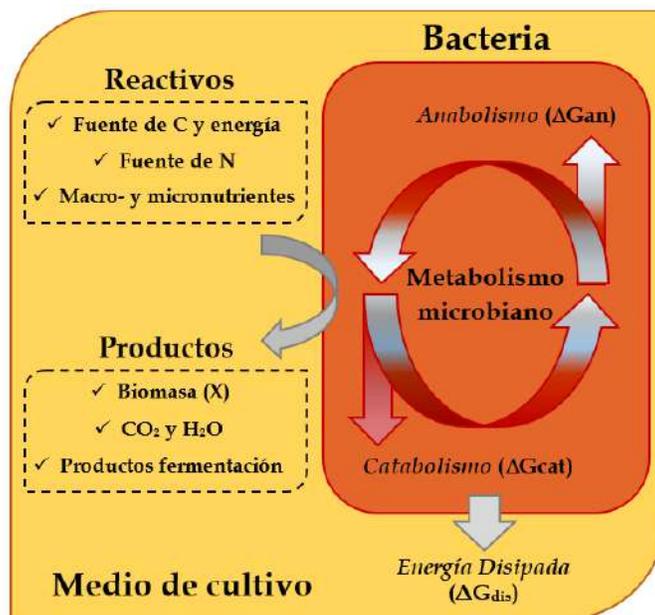


Figura 4.22. Representación del metabolismo bacteriano como una 'reacción química'.

De las variables representadas en el esquema, es de importancia para nuestro modelo la fuente de carbono y energía que será empleada por los microorganismos electro-activos del *biofilm* bacteriano, así como también la cantidad de biomasa formada (X, de acuerdo con la simbología utilizada en la literatura) y cada uno de los parámetros termodinámicos asociados al metabolismo ( $\Delta G_{catabólico}$ ,  $\Delta G_{anabólico}$  y  $\Delta G_{disipación}$ ) (von Stockar, 2010).

En este contexto, y sobre la base de la Primera Ley de la Termodinámica, la bio-termodinámica ha hecho posible la interpretación de los fenómenos de generación de calor en cultivos celulares a partir de balances energéticos, vinculando éstos últimos con la cantidad de bacterias capaces de desarrollarse en condiciones específicas. Tanto la cantidad de bacterias desarrolladas como la velocidad de crecimiento, han representado los principales intereses de la bio-termodinámica en el campo de la biotecnología (von Stockar, 2010). De la misma forma, la aplicación de la Segunda Ley - considerando la fuerza impulsora del crecimiento microbiano ( $\Delta G_{disipación}$ ) - ha permitido evaluar la relación entre la producción de entropía asociada al desarrollo bacteriano y la viabilidad y dirección del proceso de división celular (proceso espontáneo e irreversible) (von Stockar et al, 2006). En este marco, la bio-termodinámica se ha transformado en una herramienta capaz predecir el comportamiento de sistemas microbianos (no exclusivamente electroquímicos), respaldada por una gran cantidad de datos validados experimentalmente (von Stockar, 2010).

Teniendo en cuenta el balance de masa extracelular (considerando cada microorganismo como un bio-reactor), es posible plantear una **ecuación macroquímica de crecimiento microbiano** para el proceso de interés. En nuestro caso, considerando el crecimiento anaeróbico de bacterias electro-activas a partir de acetato (fuente de carbono y electrones) es posible plantear de manera simplificada la siguiente ecuación para la producción de 1 mol de biomasa:



donde  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$  representa la fórmula elemental (por mol de C) asociada a la composición bacteriana promedio (Heijnen y Kleerebezem, 2010; Picioreanu et al, 2007), considerando los electrones cedidos al electrodo (coeficiente estequiométrico  $f$ ) como uno de los ‘productos’ de interés de la reacción. Los coeficientes ( $a-f$ ) pueden ser calculados a partir de ecuaciones de balance elemental, así como también a partir de balances de carga y de energía libre de Gibbs. Como es usual, los macro- y micronutrientes (así como los factores de crecimiento) no se incluyen en las ecuaciones de crecimiento; no por ser irrelevantes, sino porque son constituyentes minoritarios en la composición microbiana, teniendo poco impacto en el tratamiento matemático final (Castañeda, 2019).

Parte de la tarea realizada durante el desarrollo del modelo propuesto consistió en, a partir de la fuente de carbono y electrones utilizada y de la estequiometría de la reacción de crecimiento (catabolismo y anabolismo considerados por separado), determinar cada uno de los parámetros termodinámicos vinculados al metabolismo ( $\Delta G_{\text{catabólico}}$ ,  $\Delta G_{\text{anabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ ). Finalmente, dichos parámetros fueron relacionados con la *velocidad de crecimiento bacteriano* y con la *velocidad de producción de electrones* sobre el ánodo (densidad de corriente).

### 4.7.2- Cinética del crecimiento microbiano

La producción de carga eléctrica depende del desarrollo de microorganismos electro-activos sobre el electrodo, por lo que es fundamental conocer no sólo la cantidad de bacterias presentes en función de la concentración de orina (en nuestro modelo), sino también la velocidad a la que éstas crecen. La velocidad de crecimiento está directamente asociada con la velocidad de consumo de sustrato (materia orgánica), y puede ser descripta microscópicamente considerando a un microorganismo como la unidad básica del sistema. En este caso, dicha velocidad se denomina *velocidad específica* de crecimiento, y se simboliza con la letra griega  $\mu$ .

En la década de los años 1940, Jacques Monod desarrolló una expresión fenomenológica que relaciona  $\mu$  con la concentración del compuesto limitante del crecimiento (Liu et al, 2003). Esta limitación

no necesariamente está vinculada con la concentración de dicho compuesto en el medio de cultivo, sino que contempla también los requerimientos nutricionales de los microorganismos en cuestión. La expresión - denominada *ecuación de Monod* - toma la forma de:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot [S]}{(K_s + [S])} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde [S] representa la concentración del compuesto limitante,  $\mu_{\text{máx}}$  la velocidad máxima a la que pueden crecer los microorganismos bajo las condiciones de cultivo, y  $K_s$  la constante de saturación media, equivalente a la concentración de sustrato para la cual la velocidad de crecimiento es  $\frac{\mu_{\text{máx}}}{2}$ .

En el caso particular de nuestro sistema, el proceso catabólico asociado al metabolismo microbiano electro-activo transforma materia orgánica en carga eléctrica, parte de la cual es finalmente transferida al ánodo. Este proceso dependiente del tiempo representa una medida cinética del desempeño bio-electroquímico global (Rabaey, 2010). En la mayoría de los modelos bio-físicos de simulación, la velocidad de producción de electrones se calcula a partir de valores de velocidad de consumo de materia orgánica (Picioreanu et al, 2007; Kato Marcus et al, 2007; Renslow et al, 2013), considerando que ésta última depende de las concentraciones del dador y del aceptor electrónico, a través de ecuaciones acopladas de manera multiplicativa (Torres et al, 2008; Renslow et al, 2013). En el caso de un aceptor electrónico insoluble (por ejemplo, un electrodo), la velocidad de consumo de materia orgánica ha sido relacionada con la velocidad de crecimiento microbiano mediante el uso de una extensión de la ecuación de Monod, denominada ecuación de Nernst-Monod, la que permite tener en cuenta simultáneamente la concentración de materia orgánica limitante (dador electrónico) y el potencial del electrodo de trabajo (aceptor electrónico) (Picioreanu et al, 2007; Kato Marcus et al, 2007; Renslow et al, 2013). Sin embargo, para proceder de esta manera, los modelos requieren parámetros validados experimentalmente en condiciones particulares, como por ejemplo valores de velocidad máxima de consumo de sustrato ( $q_{\text{máx}}$ ), constantes de saturación media ( $K_s$ ), velocidades máximas de crecimiento microbiano ( $\mu_{\text{máx}}$ ), entre otros, *información no disponible aún para BESs alimentados con orina humana*. En este punto es donde, en el marco propuesto, se aplicaron las herramientas de la bio-termodinámica al metabolismo bacteriano electro-activo para vincular la estequiometría y la energética metabólica con la cinética de crecimiento y de consumo de materia orgánica.

Las leyes termodinámicas son utilizadas habitualmente en estudios metabólicos para determinar la factibilidad y/o direccionalidad de una reacción particular de interés. Sin embargo, para sistemas fuera del equilibrio (estados estacionarios, por ejemplo), la Termodinámica también puede vincularse con

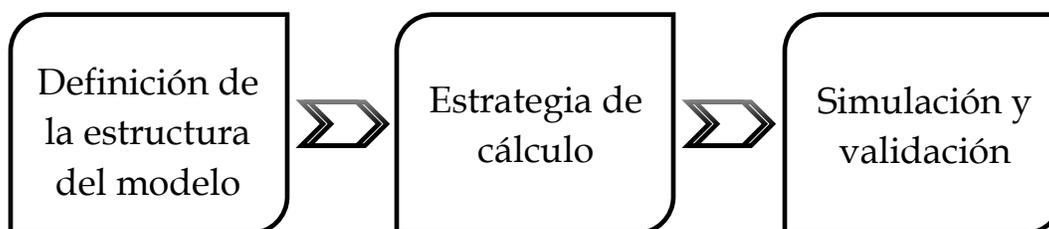
aspectos cinéticos del proceso a partir de relaciones de tipo *fuerza-flujo* (Noor et al, 2014). Este aspecto constituye el núcleo central de modelos que describen la dinámica de crecimiento microbiano incorporando en su tratamiento fenómenos de termodinámica de no-equilibrio, teniendo en cuenta los procesos catabólicos y anabólicos involucrados. Esto ha conducido a una conceptualización física profunda del metabolismo (von Stockar y Liu, 1999; von Stockar 2006), permitiendo relacionar los procesos catabólicos y anabólicos a través del parámetro de disipación de energía de Gibbs ( $\Delta G_{\text{disipación}}$ ).

Debido a que el proceso de replicación bacteriana obedece leyes físicas fundamentales, es posible en principio describirlo dentro del campo de la Termodinámica Estadística (Saadat et al, 2020). Utilizando esta aproximación, y empleando el concepto de  $\Delta G_{\text{disipación}}$ , Le Quéméner y Bouchez (2014) desarrollaron una expresión que permite calcular la velocidad específica de crecimiento microbiano en términos de balances energéticos. Esta expresión toma la siguiente forma:

$$\mu = \mu_{\text{max}} \cdot \left[ \exp \left( - \frac{(\Delta G_{\text{anabólico}} + \Delta G_{\text{disipación}})}{V_{\text{harv}} \cdot [S] \cdot \Delta G_{\text{catabólico}}} \right) \right] \quad \text{Ecuación 4.3}$$

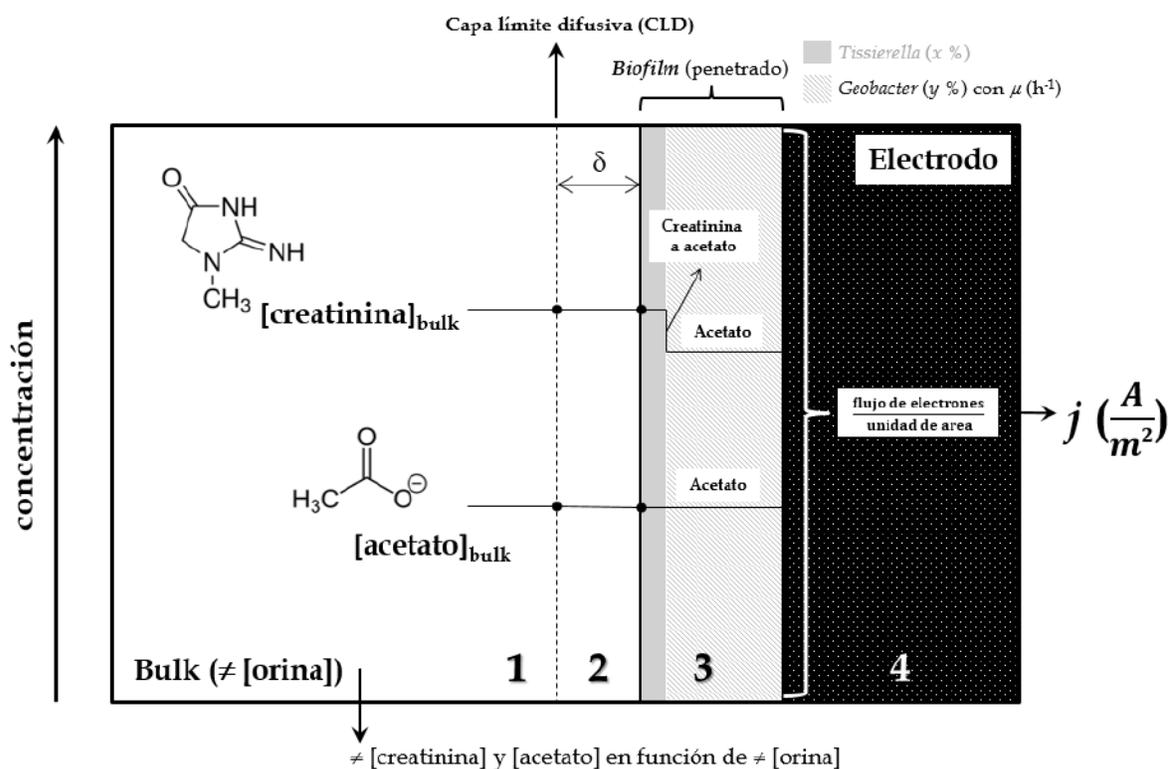
donde, como se observa, la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) depende de cada uno de los parámetros termodinámicos asociados al metabolismo bacteriano (mostrados en la **Figura 4.22**), así como también de la concentración de materia orgánica limitante ( $[S]$ ). En la **Ecuación 4.3**,  $\mu_{\text{máx}}$  representa la velocidad máxima de crecimiento. La ventaja de utilizar esta ecuación - la que se describirá en la Sección 4.7.4.1.1 - radica en que permite determinar  $\mu$  a partir de parámetros energéticos, calculados a su vez a partir de la estequiometría de la reacción catabólica y anabólica. Asimismo, permite tratar a  $\mu_{\text{máx}}$  en términos termodinámicos, lo que facilita el análisis, prescindiendo de valores de literatura.

Sobre la base teórica descrita se abordó el estudio del sistema presentado en la Sección 4.6, vinculando los aspectos energéticos del metabolismo microbiano electro-activo con la cinética de replicación bacteriana y la producción de corriente eléctrica para cada concentración de orina (en el rango de concentraciones en que el sistema se encuentra libre de inhibición). En las siguientes secciones se detalla la aproximación propuesta de acuerdo con la siguiente 'ruta' de trabajo:



### 4.7.3- Estructura del modelo

La complejidad de los BESs hace inviable el abordaje simultáneo - a partir de primeros principios - de todos y cada uno de los aspectos involucrados en el proceso de generación de carga eléctrica. Estos sistemas dinámicos *no lineales* evolucionan en el tiempo y suelen ser descriptos a partir de modelos que contemplan dominios en la micro/macro escala, vinculando la concentración de la materia orgánica limitante con la producción de carga (Torres et al., 2008; Lee et al., 2009; Picioreanu et al., 2010). En nuestro estudio, el sistema fue visualizado de la misma manera, considerándolo compuesto de sub-dominios unidimensionales interrelacionados (**Figura 4.23**): (1) líquido 'bulk', (2) capa límite difusiva (CLD), (3) *biofilm* bacteriano (adherido a la barra de grafito utilizada como ánodo) y (4) electrodo de trabajo (ánodo).



**Figura 4.23.** Esquema simplificado de los sub-dominios propuestos: (1) líquido 'bulk', (2) capa límite difusiva, (3) *biofilm* bacteriano, (4) electrodo.

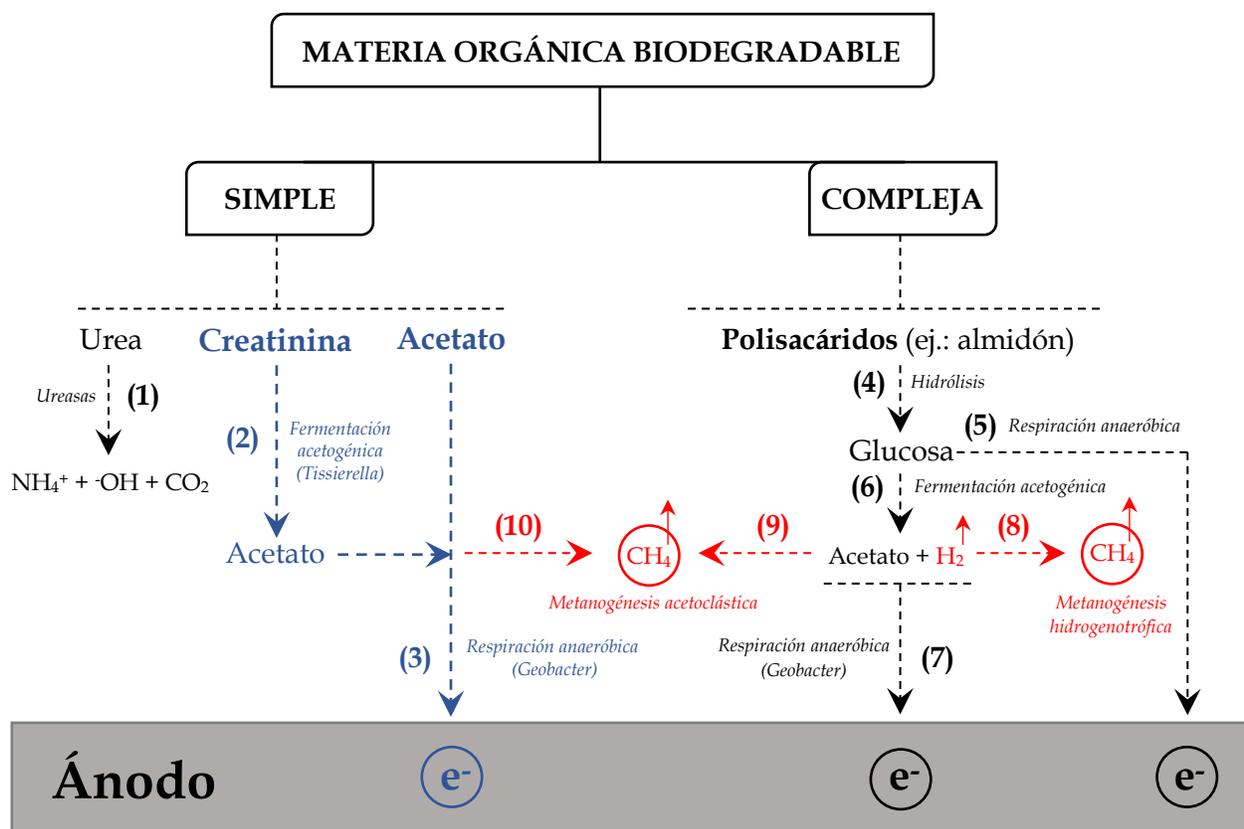
De acuerdo con estudios de análisis de sensibilidad (es decir, cuán sensibles son los resultados del modelo respecto a cambios en los parámetros de entrada), se ha demostrado que la cantidad de microorganismos electro-activos (biomasa,  $X$ ), la fracción de electrones susceptibles de ser recuperados como corriente eléctrica ( $fe^-$ ) y la velocidad específica de consumo de materia orgánica ( $q$ ) son los parámetros críticos de mayor relevancia a la hora de simular corrientes eléctricas en BESs (Lee et al,

2009; Renslow et al, 2013). Teniendo en cuenta esto, y de manera similar a como se procede en los modelos tradicionales para sistemas en ausencia de orina, cada uno de los dominios considerados (**Figura 4.23**) fueron abordados haciendo simplificaciones pertinentes de manera de facilitar el tratamiento de los datos. En las secciones siguientes se detallan las aproximaciones consideradas.

### 4.7.3.1- Primer dominio (líquido 'bulk')

De acuerdo con lo expuesto en la Sección 4.2 (*Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina*) es posible plantear una simplificación del sistema bajo estudio a la hora de seleccionar posibles dadores electrónicos en el medio de cultivo.

Es posible considerar inicialmente el aporte a la producción de corriente de microorganismos tanto planctónicos (suspendidos en el medio de cultivo) como presentes en el *biofilm* bacteriano desarrollado sobre el electrodo. En este punto podemos realizar la primera aproximación, ya que se ha demostrado que la contribución de los primeros a la generación de carga eléctrica es despreciable en comparación con la de los microorganismos sésiles (*biofilm*) (Picioreanu et al, 2007; Chae et al, 2009; Picioreanu et al, 2010). Además, debido a la utilización de un sistema de flujo continuo de medio de cultivo - que permite mantener en estado estacionario la concentración de materia orgánica, pero provoca la remoción de microorganismos planctónicos del reactor - es posible asumir que la corriente producida en los EAS se debe principalmente a la presencia del *biofilm* bacteriano (lo que fue comprobado experimentalmente a partir de medidas de voltimetría cíclica). Teniendo en cuenta esto, y en conjunto con el análisis genómico de la población anódica (Sección 4.5), fue posible proponer un esquema simplificado de transformación de materia orgánica y su conversión en carga eléctrica en el *biofilm*. Para esto se partió de los principales compuestos orgánicos solubles presentes en la orina y en Syntho (**Figura 4.2**), extendiendo el diagrama de conversión metabólica contemplando además potenciales rutas de pérdida de electrones (sumideros alternativos al ánodo). La **Figura 4.24** muestra este esquema de transformación extendido.



**Figura 4.24.** Posibles rutas sintróficas para la transformación de los principales compuestos orgánicos del medio de cultivo Syntho/orina (MSO) en corriente eléctrica. En azul se indican las vías utilizadas para los cálculos de simulación (ver texto). En rojo se indican posibles fuentes de pérdida de electrones en el sistema.

De los compuestos orgánicos simples, la **urea** fue descartada como posible fuente de carbono, ya que - como se demostró en la Sección 4.5 - hidroliza rápidamente en el reactor (**Figura 4.24, ruta (1)**), no pudiendo ser utilizada por las bacterias (Udert et al, 2006; Barbosa et al, 2017). Además, la urea no tiene poder reductor (es decir, el carbono de su estructura no tiene electrones que puedan ser cedidos), lo cual también descarta la posibilidad de que actúe como fuente de electrones (Heijnen y Kleerebezem, 2010).

En cuanto a la **creatinina**, se ha demostrado en publicaciones recientes de BESs alimentados con orina que la misma es fermentada dentro de *biofilms* constituidos por consorcios bacterianos en presencia de microorganismos del género *Tissierella* (**Figura 4.24, ruta (2)**), generándose acetato como producto final (fermentación acetogénica). El **acetato** producido de esta forma puede ser luego utilizado por bacterias electro-activas (por ejemplo, *Geobacter*) para producir directamente corriente eléctrica (**ruta (3)**) (Barbosa et al, 2017). Considerando así el proceso sintrófico *Tissierella/Geobacter* (fermentación acetogénica/respiración anaeróbica, con el electrodo como aceptor electrónico final), es posible plantear en el modelo la utilización de creatinina en el *biofilm* como fuente directa de acetato (ver Sección 4.7.3.3,

Tercer dominio). En este contexto, se determinó en primer lugar la cantidad de acetato que sería posible obtener por fermentación de creatinina para cada concentración de orina utilizada. Luego, se determinó la cantidad total de acetato con la que sería posible contar, sumando la cantidad generada por fermentación y la cantidad presente naturalmente en la orina. A partir de este contenido total de acetato, se estimó la máxima carga eléctrica que sería posible recuperar en el ánodo por oxidación directa mediada por microorganismos del género *Geobacter*. La combinación de estas rutas se indica en color azul en la **Figura 4.24**.

En el sistema estudiado el medio de cultivo contiene también materia orgánica compleja, fundamentalmente almidón proveniente de Syntho. En este caso, el camino de recuperación de carga debe iniciarse con un proceso de hidrólisis de la macromolécula (**Figura 4.24, ruta (4)**), lo que impone *a priori* un retardo temporal con respecto a la utilización directa de materia orgánica simple. Si la hidrólisis efectivamente ocurriera, sería posible contar con azúcares simples (glucosa, por ejemplo) que podrían ser empleados como fuente de carbono y electrones. Particularmente, la glucosa podría o bien ser utilizada en procesos de respiración anaeróbica (ánodo como aceptor electrónico final) para producir directamente corriente (**ruta (5)**), o bien ser fermentada (**ruta (6)**). Si bien la utilización directa de glucosa es conveniente desde un punto de vista energético (Freguia et al, 2008), la diversidad de microorganismos capaces de llevar a cabo la respiración anódica directa utilizando glucosa como dador electrónico es acotada, por lo que los procesos fermentativos son los que suelen prevalecer en *biofilms* mixtos (Freguia, 2010). De los procesos de fermentación posibles, la fermentación acetogénica es la más favorable desde el punto de vista energético (mayor cantidad de ATP generada por mol de glucosa) y consecuentemente la que ocurre en este tipo de sistemas (Freguia et al, 2008), generándose acetato e hidrógeno molecular como productos de reacción (**ruta (6)**). En este proceso, tanto el acetato como el hidrógeno podrían ser utilizados por microorganismos electro-activos como fuente directa de electrones (**ruta (7)**). Sin embargo, el hidrógeno así producido solo puede ser utilizado para producir carga eléctrica si no se pierde en rutas alternativas. Éstas últimas son principalmente de dos tipos: (i) producción de metano a partir de hidrógeno (metanogénesis hidrogenotrófica, **ruta (8)**), o (ii) expulsión de hidrógeno del medio de cultivo por venteo gaseoso. En ambos casos el resultado es una pérdida efectiva de electrones, que no pueden recuperarse en el ánodo. Independientemente de la presencia de metanógenos en el sistema, se ha demostrado que la remoción de hidrógeno por venteo gaseoso bajo agitación continua suprime efectivamente la producción de corriente en el *biofilm* (Bond y Lovley, 2003). Así, de acuerdo de acuerdo con el *set-up* experimental utilizado en nuestro sistema - burbujeo continuo

## Corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito

de gases ( $N_2/CO_2$ ) bajo agitación mecánica - es posible descartar inicialmente en el modelo la producción de corriente por oxidación microbiológica de hidrógeno.

En el esquema planteado debe tenerse en cuenta además la posible pérdida de electrones por producción de metano a partir de acetato - metanogénesis acetoclástica - (**rutas (9) y (10)**). Al respecto, estudios de bibliografía han demostrado la posibilidad de suprimir estos procesos (así como también otros sumideros de carga alternativos, como nitratos y/o sulfatos) mediante el control de dos variables: (i) el potencial anódico, y (ii) la concentración de acetato (Sleutels et al, 2016). Trabajando con altos sobrepotenciales y bajas concentraciones de acetato es posible lograr la prevalencia de microorganismos electro-activos por sobre los metanógenos, suprimiendo a estos últimos. Asimismo, a potenciales anódicos suficientemente elevados (como los utilizados en nuestro estudio) es posible minimizar reacciones de desnitrificación y reducción de sulfato (Sleutels et al, 2016). Esto último se debe a que la oxidación microbiológica de acetato en el *biofilm* depende del potencial aplicado, mientras que los procesos metanogénicos - así como los procesos de reducción de nitratos y/o sulfatos - son independientes de dicha variable, haciéndose importantes solo a altas concentraciones de acetato (y/o de nitrato y sulfato) y bajos potenciales anódicos, donde los microorganismos electro-activos ya no pueden competir con los metanógenos (y/o bacterias desnitrificadoras y reductoras de sulfato) (Sleutels et al, 2016). Así, de acuerdo con los sobrepotenciales utilizados en nuestro sistema bajo polarización y a las bajas concentraciones de acetato presentes en el medio de cultivo, se despreciaron inicialmente en el modelo dichos sumideros alternativos de carga (Lee et al, 2009; Sleutels et al, 2016). En el caso particular de los procesos metanogénicos, las medidas experimentales de secuenciación genómica soportaron esta aproximación, demostrando que, bajo las condiciones utilizadas, no hay presencia de metanógenos en el *biofilm*.

La cadena compleja de eventos descritos, asociados a la hidrólisis y degradación de materia orgánica macromolecular, es la razón principal por la que los BESs alimentados con, por ejemplo almidón (e incluso con monómeros como la glucosa), arrojan valores de recuperación de carga eléctrica considerablemente bajos (Pant et al, 2010). En consecuencia, en el modelo abordado se priorizó inicialmente la materia orgánica simple (creatinina y acetato) como vía directa para la producción de electrones para cada concentración de orina (**Figura 4.23 - dominio 1**), con posibilidad de ampliar los sustratos de partida en función de los resultados de simulación obtenidos. Debido a la modalidad de agitación continua del reactor, la concentración de compuestos en el medio de cultivo se consideró homogénea, en línea con estudios tradicionales de simulación (Picioareanu et al, 2010; Renslow et al, 2013). La utilización de un potencial anódico elevado en los experimentos realizados permitió generar

condiciones favorables para los microorganismos electro-activos, beneficiando los procesos de generación de corriente tanto desde el punto de vista energético (elevado  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  por mol de acetato consumido) como cinético, de acuerdo con la reacción de crecimiento microbiano involucrada (como se verá en la Sección 4.7.4).

### 4.7.3.2- Segundo dominio (capa límite difusiva)

El flujo de sustrato desde el medio de cultivo hacia el *biofilm* es controlado en última instancia por difusión molecular a través de la capa límite difusiva (CLD -  $\delta$  - en la **Figura 4.23**). Esto es así siempre que no exista limitación al transporte en el seno del líquido, lo que puede evitarse por agitación mecánica (convección forzada). Diferentes estudios han incorporado capas límites difusivas de distintos espesores en los modelos de simulación, evaluando el efecto de este parámetro sobre la concentración efectiva de sustrato sobre la superficie del *biofilm* (Kato Marcus et al, 2007; Lee et al, 2009). Estos estudios, en conjunto con modelos de análisis de sensibilidad, han demostrado que - dentro de los órdenes de magnitud experimentales para condiciones de agitación típicas - el espesor de la CLD no impone limitaciones significativas a la densidad de corriente final calculada. Esto ha llevado a considerar, en diversos modelos, concentraciones de sustrato sobre la superficie del *biofilm* iguales a las del seno del líquido, con el objeto de simplificar el abordaje del sistema (Piciooreanu et al, 2010; Renslow et al, 2013). De manera análoga hemos considerado en nuestro caso perfiles de concentración de creatinina y acetato constantes en la CLD de nuestro modelo (**Figura 4.23 - dominio 2**).

Otro factor que podría contribuir al transporte de sustrato hacia la superficie del *biofilm* es la electromigración de especies cargadas, como por ejemplo acetato. Sin embargo, debido a la elevada fuerza iónica del medio en presencia de orina, este fenómeno de transporte no contribuye significativamente y puede ser despreciado (Torres et al, 2008).

### 4.7.3.3- Tercer dominio (*biofilm*)

La cantidad de bacterias electro-activas que forman parte del *biofilm* constituye uno de los parámetros de simulación de mayor impacto sobre la densidad de corriente final (Lee et al, 2009; Renslow et al, 2013). En la mayoría de los modelos reportados suelen utilizarse valores promedio de biomasa bacteriana (obtenidos de literatura) para representar la evolución de la población responsable de la producción de corriente. Sin embargo, esta simplificación suele no tener en cuenta la posibilidad de que exista una comunidad mixta adherida al electrodo (microorganismos electro-activos y no electro-

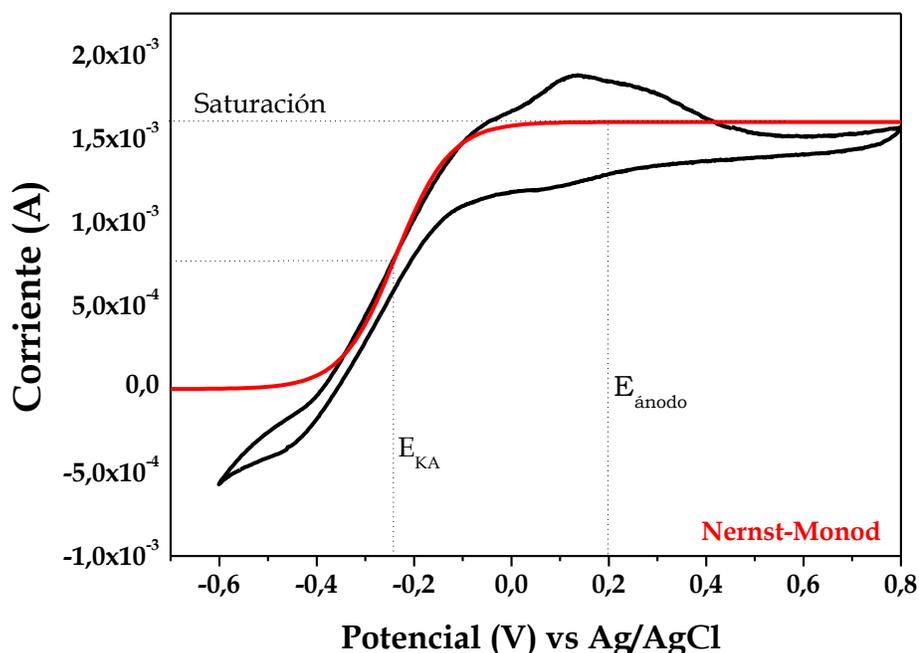
activos), lo que puede llevar a la sobreestimación de la corriente final (Luo et al, 2016). Por este motivo, en la aproximación propuesta, no se utilizaron valores teóricos para la cantidad de biomasa electro-activa presente en el *biofilm*, sino valores experimentales determinados a partir de la cuantificación de ADN para nuestro sistema particular. Debido a que las medidas de ADN contemplan la totalidad de microorganismos del *biofilm*, se emplearon resultados de análisis genómico para estimar la cantidad de microorganismos específicamente electro-activos.

De acuerdo con la secuenciación genómica, y teniendo en cuenta la materia orgánica considerada como fuente de carbono y electrones (creatinina y acetato), la estructura del *biofilm* se simplificó asumiendo una composición binaria, con *Tissierella* y *Geobacter* como los principales géneros bacterianos participantes del proceso de generación de carga ( $x\%$  *Tissierella* e  $y\%$  *Geobacter*, **Figura 4.23 - dominio 3**). Esta selección está soportada además con resultados de literatura, en los que se ha demostrado que *Tissierella* es uno de los géneros mayoritarios presentes en *biofilms* anódicos de sistemas alimentados con orina, lo que está asociado directamente a la degradación de creatinina (Barbosa et al, 2017). La producción de acetato por fermentación de creatinina da cuenta a su vez de la presencia de *Geobacter* en el *biofilm* mixto, aún en condiciones extremas de concentración de orina (tal como se demostró en la Sección 4.5). Sobre esta base se asumió un esquema simplificado de dos etapas para la dinámica de consumo de materia orgánica en el *biofilm*. Se consideró en primer lugar la fermentación de creatinina para generar acetato (por parte de los microorganismos del género *Tissierella*, **Figura 4.24, ruta (2)**) y luego la degradación de acetato (el generado por fermentación y el presente naturalmente en la orina) a partir de *Geobacter*, con la consecuente producción de carga eléctrica sobre el electrodo (**ruta (3)**). Esta dinámica en serie se definió sólo a fin de ordenar y simplificar los cálculos, reconociendo las diferencias que existen respecto a la dinámica real en un *biofilm* mixto. Para esto, se representó el *biofilm* de manera estratificada, con *Tissierella* en la parte más externa (en contacto con el medio de cultivo) y *Geobacter* en contacto directo con el electrodo de trabajo (**Figura 4.23 - dominio 3**). La estequiometría de la reacción de fermentación acetogénica de creatinina se abordó de acuerdo con la ruta metabólica correspondiente a *Tissierella creatinophila* (Harms et al, 1998), a partir de la cual se producen 0.8 moles de acetato por mol de creatinina fermentada. Esta estrategia se basa en la aproximación de Heijnen y Kleerebezem (2010), de acuerdo con la cual es posible - y conveniente - utilizar datos de conversión metabólica de sustratos no convencionales (creatinina en este caso) en sustratos primarios (acetato), para los que se conoce en última instancia el número exacto de electrones involucrados en el proceso de recuperación de carga (8 moles de electrones por mol de acetato consumido en el caso de *G. sulfurreducens*).

Las densidades de corriente simuladas correspondieron en todos los casos a condiciones de estado estacionario. En el rango de concentraciones de orina estudiado se trabajó con un *biofilm* anódico no superior a 15  $\mu\text{m}$  de espesor, tal como fue revelado por microscopía SEM. En consecuencia, se asumió un *biofilm* completamente penetrado (*fully-penetrated biofilm*); es decir, sin gradiente de concentración de materia orgánica en su interior, de acuerdo con estudios de literatura (Lee et al, 2009). El bajo espesor de los *biofilms* permitió además descartar gradientes de pH en su interior, como ha sido asumido en otros modelos bio-físicos (Renslow et al, 2013) y demostrado a partir de cálculos (Korth et al, 2015). La dinámica electro-activa del *biofilm* - velocidad específica de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ ) y velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) - se describirá en detalle en las Secciones 4.7.4.1 y 4.7.4.1.1, respectivamente.

### 4.7.3.4- Cuarto dominio (ánodo)

El electrodo colector (barra de grafito) representa un elemento clave en el proceso de respiración anaeróbica, debido a su rol como aceptor electrónico final en contacto con el *biofilm* (**Figura 4.23 - dominio 4**). Los ensayos de voltametría cíclica realizados sobre el electrodo colonizado por microorganismos electro-activos (**Figura 4.8**) permitieron determinar la disponibilidad de potencial anódico bajo las condiciones de polarización empleadas (Torres et al ,2008). De acuerdo con el ajuste de los datos experimentales, se demostró que la saturación de corriente para el sistema estudiado ocurre a partir de un potencial de  $\sim -0.1$  V (Ag/AgCl), con un potencial de media onda ( $E_{KA}$ , potencial al cual  $i = \frac{i_{max}}{2}$ ) de  $\sim -0.24$  V (Ag/AgCl) (**Figura 4.25**).



**Figura 4.25.** Ajuste Nernst-Monod de los datos de voltametría cíclica mostrados originalmente en la Figura 4.8. Se indica el potencial de media onda ( $E_{KA}$ ), el potencial de polarización ( $E_{\text{ánodo}}$ ) y las condiciones de saturación.

Para el potencial de trabajo utilizado ( $0.2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , equivalente a un sobrepotencial  $\eta = E_{\text{ánodo}} - E_{KA} = 0.44 \text{ V}$ ), se comprobó que no existen limitaciones de aceptor electrónico en el sistema, pudiéndose despreciar las caídas de potencial a lo largo del *biofilm* (lo que se conoce como condición de *ánodo saturado*) (Lee et al, 2009). En este contexto, y debido a que no se detectaron cambios en la corriente con la velocidad de agitación del medio, la corriente obtenida depende sólo de la velocidad a la que los microorganismos electro-activos consumen acetato.

De acuerdo con el marco teórico/experimental para cada dominio descrito se construyó el modelo propuesto, condensando las diferentes contribuciones en cada dominio del sistema de manera de transformar el contenido teórico de acetato en carga eléctrica recuperada por unidad de tiempo y unidad de área de electrodo. En las siguientes secciones se introducen los *parámetros cinéticos* del proceso.

#### 4.7.4- Cinética de consumo de acetato y densidad de corriente

La cantidad total de electrones recuperados en el ánodo depende del flujo efectivo de dador electrónico (acetato) en el *biofilm*. En este esquema, la velocidad a la que el dador electrónico es consumido es proporcional a la velocidad a la que los electrones son transferidos al electrodo, lo que es equivalente a la densidad de corriente ( $j$ ) (Lee et al, 2009). Considerando que  $j$  depende sólo de la velocidad de consumo de acetato (lo que es cierto para un *biofilm* anódico saturado), es posible calcular  $j$  como el producto de la velocidad específica de utilización de acetato ( $q_{Ac}$ ) y la cantidad de biomasa electro-

## Capítulo 4

activa (X) por unidad de área de electrodo (A), de acuerdo con (Torres et al, 2008; Lee et al, 2009; Renslow et al, 2013):

$$j = [q_{Ac} \cdot \left(\frac{X}{A}\right)] \cdot fe^{-} \cdot \gamma_{conv} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

En esta ecuación, el producto entre corchetes representa el flujo de dador electrónico en el *biofilm*; donde  $q_{Ac}$  es la velocidad específica de consumo de acetato (en unidades de  $\frac{\text{mol acetato}}{\text{mol de C de X} \cdot \text{h}}$ ), X es la cantidad de microorganismos electro-activos (en unidades de mol de C de X) y A es el área del electrodo ( $8.04 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ , de acuerdo con el área experimental expuesta). El término  $fe^{-}$  representa la fracción de electrones recuperados como carga eléctrica (con un valor de 0.93 utilizado en nuestro modelo para *G. sulfurreducens*, de acuerdo con valores promedio de literatura - Kato Marcus et al, 2007). Por su parte, el parámetro  $\gamma_{conv}$  representa un factor de conversión ( $\frac{1 \text{ mol acetato}}{\text{h}} = 214.4 \text{ amperes}$ , de acuerdo con la estequiometría de la reacción de oxidación anaeróbica de acetato mediada por *G. sulfurreducens*), utilizado finalmente para transformar las unidades de  $\frac{\text{mol acetato}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}}$  en densidad de corriente,  $j$  ( $\frac{\text{A}}{\text{m}^2}$ ).

En este contexto, el cálculo de  $j$  a partir de la **Ecuación 4.4** se reduce a la determinación de la velocidad de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ ) para cada concentración de orina (ya que X fue medido experimentalmente). En las siguientes secciones se detallará la estrategia de cálculo de  $q_{Ac}$  a partir de parámetros termodinámicos asociados al metabolismo microbiano electro-activo para cada condición ensayada.

### 4.7.4.1- Velocidad específica de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ )

Como se mencionó en la Sección 4.7.2, la cinética de crecimiento bacteriano suele ser modelada a partir de la ecuación de Monod (**Ecuación 4.2**). Esta expresión se ha utilizado además en la literatura para calcular la velocidad de consumo de materia orgánica mediante el empleo de expresiones duales, las que tienen en cuenta tanto el dador electrónico (materia orgánica) como el aceptor electrónico (sea éste soluble o no). En el caso particular de un electrodo utilizado como aceptor electrónico, se ha utilizado una expresión modificada - denominada ecuación de Nernst-Monod - para describir la velocidad de consumo de sustrato bajo la influencia del potencial del electrodo (Kato Marcus et al, 2011; Korth et al, 2015). La expresión de Nernst-Monod captura simultáneamente el efecto de la concentración de dador electrónico y la 'concentración' de aceptor electrónico, esta última representada por el potencial de trabajo. Esta ecuación toma la siguiente forma:

$$q = q_{\text{máx}} \cdot \phi_X \cdot \left( \frac{[S]}{K_S + [S]} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + \exp\left[-\frac{F}{RT} \eta\right]} \right) \quad \text{Ecuación 4.5}$$

donde la velocidad de consumo de materia orgánica ( $q$ ) queda expresada en función de la velocidad máxima de consumo ( $q_{\text{máx}}$ ), la fracción de biomasa electro-activa en el *biofilm* ( $\phi_X$ ), la concentración de materia orgánica ( $[S]$ ) y el sobrepotencial del electrodo ( $\eta = E_{\text{ánodo}} - E_{K_A}$ ).

Los modelos que han empleado esta expresión hacen uso de parámetros ( $q_{\text{máx}}$ ,  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $\phi_X$ ,  $K_S$ ) que dependen de los microorganismos específicos bajo estudio y de la materia orgánica utilizada en condiciones experimentales particulares (Picioreanu et al, 2007; Picioreanu et al, 2010). Como se mencionó, estos parámetros no se conocen aún para microorganismos electro-activos en presencia de orina humana.

Uno de los mayores logros de la microbiología ha sido la identificación de relaciones generales entre parámetros macroscópicos asociados al crecimiento microbiano, independientes de la especie de microorganismo estudiada. Esto ha hecho posible el desarrollo de expresiones *fenomenológicas* que permiten vincular aspectos como el rendimiento microbiano con variables como los requerimientos energéticos de mantenimiento celular, velocidades de crecimiento, afinidad por nutrientes, entre otros (Pirt, 1965). Una de las primeras expresiones desarrolladas (propuesta en 1965) que permite acoplar la velocidad de consumo de materia orgánica ( $q$ ) con la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), es la ecuación de Pirt (o Herbert-Pirt, como también se la conoce en la literatura) (Bachmann et al, 2016), la que además permite formalizar el proceso de consumo de sustrato contemplando el mantenimiento celular. Esta ecuación ha sido utilizada en diferentes modelos bio-físicos de simulación (Korth et al, 2015; Bachmann et al, 2016), y toma la forma de:

$$q_{Ac} = \frac{1}{Y_{Ac,X}^{max}} \cdot \mu + m_{Ac} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde  $q_{Ac}$  representa - para nuestro caso particular - la velocidad específica de consumo de acetato (en unidades de  $\frac{\text{mol acetato}}{\text{mol de C de X} \cdot \text{h}}$ ),  $Y_{Ac,X}^{max}$  representa el coeficiente de rendimiento celular máximo ( $\frac{\text{mol de C de X}}{\text{mol acetato}}$ ) y  $m_{Ac}$  el coeficiente de mantenimiento celular ( $\frac{\text{mol acetato}}{\text{mol de C de X} \cdot \text{h}}$ ). Este último es la velocidad de consumo de acetato necesaria para generar el flujo de energía requerido para los procesos de mantenimiento celular independientes del crecimiento (Heijnen y Kleerebezem, 2010).

En el modelo propuesto se utilizó la **Ecuación 4.6** para determinar los valores de  $q_{Ac}$ . La ventaja de utilizar esta aproximación es la posibilidad de expresar la velocidad de consumo de acetato como una función de parámetros ( $Y_{Ac,X}^{max}$  y  $m_{Ac}$ ) que pueden ser calculados - a partir de balances de energía y electrones - aplicando leyes termodinámicas al metabolismo microbiano. La utilización de la ecuación

de Pirt requiere además la determinación de  $\mu$  (velocidad específica de crecimiento) para cada concentración de orina, lo que se hizo a partir de la energética microbiana asociada a las reacciones metabólicas de interés. Debido a que los parámetros termodinámicos a utilizar dependen de la estequiometría de las reacciones catabólica y anabólica, la velocidad de replicación celular emerge en este modelo como un nexo entre termodinámica y cinética del consumo de materia orgánica.

En la siguiente sección se introduce el tratamiento de  $\mu$  en relación con dichos parámetros termodinámicos.

### **4.7.4.1.1- Velocidad de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) en función de parámetros termodinámicos**

Los desarrollos modernos en el área de la *termodinámica de procesos fuera del equilibrio* han dado lugar a la aparición de modelos no lineales de tipo fuerza-flujo para la descripción de la evolución temporal de *sistemas disipativos*, de acuerdo con el desarrollo introducido por el premio Nobel de Química (1977) Ilya Prigogine (Prigogine, 1977). En este contexto, los sistemas disipativos constituyen estructuras que emergen - y sólo pueden existir - a partir de la disipación continua de materia y energía (Prigogine y Stengers, 1997).

La célula, como unidad biológica, constituye uno de los principales núcleos de interés en el área de las estructuras disipativas, combinando orden con actividad, en manifiesto contraste con los estados de equilibrio. Esto ha permitido el abordaje de aspectos cinéticos de procesos irreversibles vinculados con la actividad metabólica celular. En este contexto, Le Quéméner y Bouchez (2014) han propuesto un tratamiento mecánico-estadístico de un conjunto de células en crecimiento consideradas como unidades que incorporan energía a partir del consumo de materia orgánica, vinculando aspectos termodinámicos (energéticos) y cinéticos del proceso de replicación. En el tratamiento propuesto - y sobre un modelo de tipo *estado de transición* - se considera que cada microorganismo debe incorporar una determinada cantidad de materia orgánica para alcanzar la energía de activación umbral para desencadenar la división celular. De manera análoga a una reacción química convencional, este proceso puede visualizarse - para cada célula individual - como una evolución a lo largo de una coordenada de 'reacción'; en este caso, la coordenada de división celular. Así, el proceso de crecimiento puede describirse como una sucesión de dos etapas: (i) una reversible, dada por la captura de energía por parte del microorganismo; y (ii) una irreversible, que conduce a la división celular una vez alcanzada la cima del estado de transición. En este esquema se asume que el primer paso es un proceso cercano al

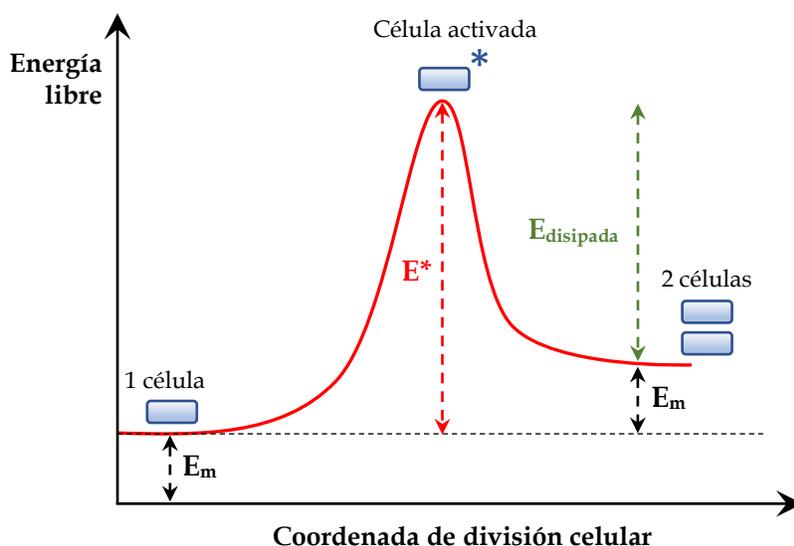
equilibrio, y el segundo es el que limita la velocidad del proceso global. La división celular individual puede simbolizarse de la siguiente manera:



donde célula\* representa el estado microbiano intermedio activado, en el cual el microorganismo está en condiciones de (y tiene la energía necesaria para) dividirse.

Considerando que el crecimiento está limitado por la cantidad de energía provista a partir de la incorporación de materia orgánica, el nivel umbral necesario para lograr la división celular - que se corresponde con la energía del estado de transición ( $E^*$ ) - puede estimarse utilizando balances de energía libre de Gibbs y relacionarse con la estequiometría de la reacción macroquímica de crecimiento (catabolismo y anabolismo por separado).

La **Figura 4.26** muestra la representación de este proceso y las variables energéticas asociadas.



**Figura 4.26.** Representación del proceso de replicación microbiana a lo largo de la coordenada de división celular. Se indican las variables energéticas puestas en juego.

Durante la primera etapa, cada microorganismo - con una energía  $E_m$  - tiene acceso a una cierta cantidad de energía (energía libre de Gibbs catabólica), dada por la cantidad y naturaleza de la materia orgánica que consume. En función de esta energía, el microorganismo podrá o no alcanzar el estado activado, caracterizado por una energía ( $E^*$ ). Una vez alcanzado el estado de transición (célula\*), el microorganismo evolucionará irreversiblemente hacia la división celular. Como se mencionó, para que este proceso ocurra en acuerdo con la Segunda Ley de la Termodinámica, el mismo debe estar acompañado por una determinada cantidad de energía disipada a los alrededores ( $\Delta G_{\text{disipación}}$ ).

## Capítulo 4

Para el caso de una población de microorganismos, y en función de las consideraciones energéticas introducidas en la Sección 4.7.1, la expresión desarrollada por Le Quéméner y Bouchez para calcular la velocidad específica de crecimiento en términos de balances energéticos toma la forma mostrada en la **Ecuación 4.3**:

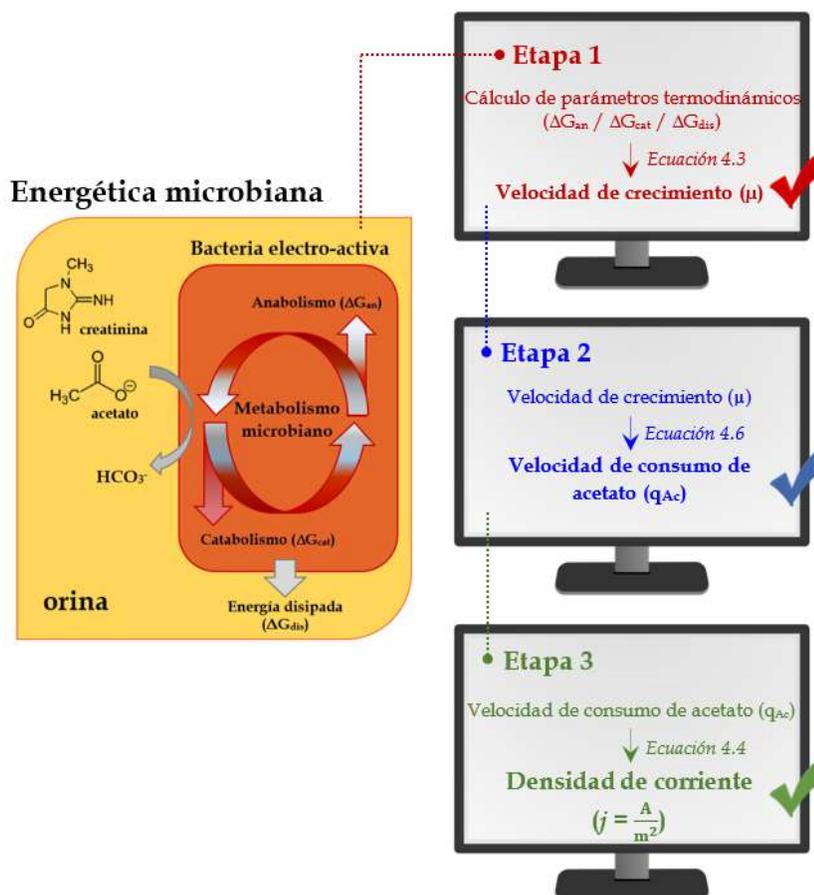
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left[ \exp \left( - \frac{(\Delta G_{\text{anabólico}} + \Delta G_{\text{disipación}})}{V_{\text{harv}} \cdot [S] \cdot \Delta G_{\text{catabólico}}} \right) \right]$$

En dicha expresión,  $\mu_{\max}$  representa la velocidad máxima de crecimiento microbiano (en unidades de  $\text{h}^{-1}$ ), equivalente a la máxima velocidad a la que la división celular elemental ocurre (paso irreversible, desde la célula en estado activado en la cima del estado de transición hasta el valle de energía, donde aparece una nueva célula). Por su parte,  $\Delta G_{\text{anabólico}}$  es la variación de energía libre de Gibbs ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol C de X}}$ ) que ocurre durante el crecimiento de los microorganismos ( $E_m$  en la **Figura 4.26**),  $\Delta G_{\text{disipación}}$  es la energía disipada ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol C de X}}$ ) ( $E_{\text{disipada}}$  en la **Figura 4.26**),  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  es la variación de energía libre de Gibbs asociada a la reacción de oxidación de sustrato ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol sustrato}}$ ) (a partir de la cual la célula alcanzará el estado de transición activado),  $[S]$  es la concentración de sustrato ( $\frac{\text{mol sustrato}}{\text{L}}$ ) y  $V_{\text{harv}}$  es el volumen a partir del cual cada microorganismo incorpora sustrato ( $\frac{\text{L}}{\text{mol C de X}}$ ) (con un valor de  $5400 \frac{\text{L}}{\text{mol C de X}}$ , para un sistema celular planctónico) (Le Quéméner y Bouchez, 2014).

Esta expresión para la velocidad específica de crecimiento bacteriano introduce efectivamente una relación de tipo fuerza-flujo entre la densidad de energía catabólica presente en el medio de cultivo (*fuerza*,  $[S] \cdot \Delta G_{\text{catabólico}}$ ) y  $\mu$  (*flujo*, velocidad del proceso irreversible), contemplando explícitamente la dependencia no lineal entre el crecimiento y la concentración de sustrato. La dependencia de la velocidad de crecimiento con el potencial del electrodo está considerada a su vez dentro de  $\Delta G_{\text{catabólico}}$ . La **Ecuación 4.3** revela además que la velocidad de crecimiento depende del contenido energético de las moléculas involucradas en el metabolismo microbiano, dado por el grado de reducción del sustrato ( $\delta$ ). El cálculo de  $\mu$  involucra, además de cada uno de los parámetros termodinámicos mencionados, la utilización de una constante,  $\mu_{\max}$ . Como se mencionó, no se dispone aún de valores de  $\mu_{\max}$  obtenidos en sistemas conteniendo orina. Sin embargo, otra de las ventajas de calcular  $\mu$  a partir de la **Ecuación 4.3** es que  $\mu_{\max}$  puede también ser determinada a partir de parámetros termodinámicos asociados al metabolismo celular.

### 4.7.5- Estrategia de cálculo

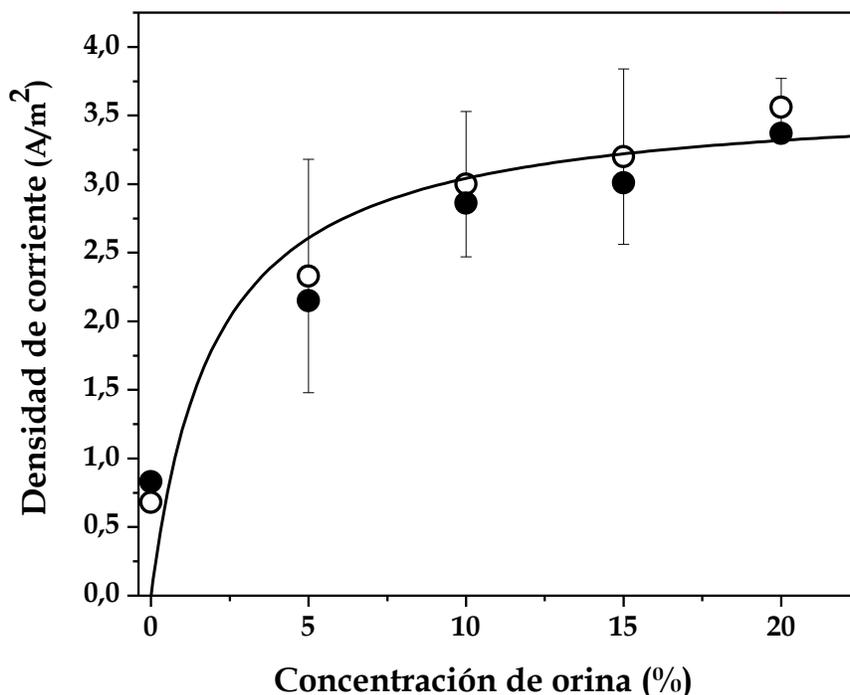
La diferencia en escala temporal correspondiente a los procesos involucrados en la generación de carga eléctrica (difusión y velocidad de consumo de materia orgánica, conducción electrónica en el *biofilm*, entre otros; del orden de los segundos/minutos) y el tiempo requerido para el crecimiento microbiano (horas/días), permite tratar estos fenómenos de manera separada para cada cantidad de microorganismos electro-activos desarrollados en función de la concentración de orina (Kissel et al, 1984; Picioeanu et al, 2000; Kato Marcus et al, 2007). Esto se asumió en la estrategia de cálculo, de acuerdo con el siguiente procedimiento: (1) cálculo de cada uno de los parámetros termodinámicos de la **Ecuación 4.3** ( $\Delta G_{\text{anabólico}}$ ,  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ , incluido  $\mu_{\text{máx}}$ ) para determinar  $\mu$ ; (2) cálculo de  $q_{\text{Ac}}$  a partir de  $\mu$ , utilizando la **Ecuación 4.6** (Pirt); y (3) estimación de  $j$  (a partir de  $q_{\text{Ac}}$ ) empleando la **Ecuación 4.4**. La **Figura 4.27** muestra un diagrama que resume los pasos mencionados.



**Figura 4.27.** Estrategia de cálculo en tres etapas: (1) determinación de la velocidad de crecimiento microbiano a partir de los parámetros termodinámicos asociados al metabolismo electro-activo, (2) estimación de la velocidad de consumo de acetato en función de la velocidad de crecimiento, (3) determinación de la densidad de corriente a partir de la velocidad de consumo de acetato.

#### 4.7.6- Validación de las densidades de corriente ( $j$ ) teóricas

La **Figura 4.28** muestra los valores calculados con el modelo, superpuestos con los resultados experimentales obtenidos (**Figura 4.20**). El detalle de todos los cálculos realizados para la determinación de cada uno de los parámetros termodinámicos ( $\Delta G_{\text{anabólico}}$ ,  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ ) y cinéticos ( $\mu_{\text{máx}}$ ), así como de las densidades de corriente asociadas, se detallan en el **Anexo A**.



**Figura 4.28.** Densidad de corriente ( $j$ ) en función de la concentración de orina. Círculos vacíos: resultados experimentales. Círculos plenos: valores simulados.

Como se observa, la producción de corriente aumenta en respuesta a la concentración de dador electrónico, siguiendo un patrón de tipo saturación en la ventana de concentraciones analizada. Este comportamiento es típico de *biofilms* electro-activos, en presencia o ausencia de orina, siempre y cuando no existan procesos de inhibición bacteriana (Barbosa et al, 2017; Prudente et al, 2021). Las densidades de corriente simuladas mostraron buen acuerdo con los resultados experimentales, con valores localizados dentro de los límites de error determinados. Sobre la base de estos resultados, es posible decir que las aproximaciones adoptadas en la construcción del modelo son válidas dentro del marco experimental abordado. La estrategia propuesta permitió estimar la velocidad específica de utilización de acetato, esta última acotada dentro del rango teórico de velocidades de crecimiento limitadas por la mínima cantidad de calor disipada - necesaria para la replicación celular - y la máxima velocidad de disipación de energía de Gibbs durante la formación de biomasa (Niebel et al, 2019; Saadat et al, 2020).

Este aporte del trabajo de Tesis ha representado el primer modelo bio-físico publicado en la literatura para BESs de producción de corriente eléctrica a partir de orina, empleando fundamentos energéticos y cinéticos asociados al metabolismo microbiano dentro del marco de la bio-termodinámica de sistemas disipativos.

#### **4.8- Conclusiones parciales**

En este capítulo se describió el estudio de la producción de corriente eléctrica a partir de orina humana mediada por microorganismos electro-activos, utilizando electrodos no porosos de grafito como soportes para el crecimiento microbiano y la recolección de carga. A continuación, se destacan las conclusiones parciales obtenidas de los cuatro bloques de trabajo abordados:

- ❖ Es posible enriquecer, a partir de un lodo cloacal doméstico, consorcios bacterianos capaces de producir corriente eléctrica a partir de orina humana empleando electrodos no porosos de grafito como ánodos microbianos en celdas bio-electroquímicas de tres electrodos.
- ❖ Bajo las condiciones experimentales utilizadas, el empleo de orina como medio de alimentación permite generar densidades de corriente anódicas (corriente por unidad de área de ánodo microbiano) mayores a las obtenidas empleando un efluente doméstico sintético (Syntho), pero sólo en un rango de concentraciones de orina acotado (hasta 20% en volumen, utilizando Syntho como diluyente).
- ❖ La densidad de corriente eléctrica, en ensayos de aclimatación secuencial, muestra una relación de tipo ‘campana’ con la concentración de orina, con un máximo alrededor de 20% en volumen (utilizando Syntho como diluyente).
- ❖ La caída de la densidad de corriente para concentraciones de orina superiores a 20% se debe a dos eventos principales que conducen a la pérdida progresiva de la actividad microbiana electro-activa: (i) aumento de la concentración de amoníaco libre (compuesto citotóxico) en el medio de cultivo, y (ii) precipitación de sales inorgánicas (principalmente *estruvita* e *hidroxiapatita*) sobre el *biofilm* anódico.
- ❖ El aumento de la densidad de corriente eléctrica (respecto a Syntho) para concentraciones de orina menores a 20% se debe al enriquecimiento preferencial de microorganismos electro-activos (filo *Proteobacterias*, género *Geobacter* y *Pelobacter*) sobre la superficie anódica, asociado a la mayor bio-degradabilidad de la orina respecto a Syntho. La caída de la densidad de corriente para

## Capítulo 4

concentraciones de orina superiores se debe a la pérdida progresiva de la población microbiana electro-activa (con un mínimo de 1% en orina pura).

- ❖ La máxima densidad de corriente obtenida, de acuerdo con el protocolo de optimización establecido (aclimatación microbiana secuencial hasta una concentración de orina de 20%), es 35 veces superior a la obtenida utilizando orina pura (independientemente de la aclimatación en este último caso).
- ❖ El modelo bio-físico desarrollado permite reproducir, a partir de consideraciones energéticas, las densidades de corriente obtenidas en función de la concentración de orina, dentro del rango de concentraciones donde los microorganismos se encuentran libres de inhibición. La estructura del modelo permite prescindir de parámetros experimentales necesarios como valores 'semilla', los que aún no se encuentran reportados en la literatura para sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina.

Como se mencionó, los estudios llevados a cabo en esta parte de la Tesis se focalizaron en encontrar las condiciones óptimas de generación de corriente a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito como ánodos microbianos. Esto permitió definir, para las condiciones de trabajo utilizadas, un rango de concentraciones de orina hasta 20% en volumen (empleando Syntho como diluyente) en el cual evaluar los electrodos porosos de  $Ti_4O_7$  como plataformas para el crecimiento microbiano en presencia de orina (Capítulo 6). En el próximo capítulo se describirá la preparación y caracterización de estos electrodos cerámicos.

# Capítulo 5

## Preparación y caracterización de electrodos porosos de $\text{Ti}_4\text{O}_7$

*En este capítulo se describe la preparación y caracterización fisicoquímica de electrodos porosos de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  con porosidad anisotrópica, haciendo foco en las variables de procesamiento que controlan las características químico-estructurales de los mismos.*

*La parte introductoria del capítulo (Secciones 5.1-5.3) aborda conceptos vinculados a la física del estado sólido de óxidos de titanio y su relación con las propiedades eléctricas de los mismos, describiendo las características generales del  $\text{TiO}_2$  y como éstas pueden utilizarse como plataforma para obtener fases eléctricamente conductoras de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ . Los resultados experimentales se presentan en dos secciones. La primera (Sección 5.4) describe la preparación de electrodos de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  con porosidad anisotrópica (estructura laminada) a partir de un método de procesamiento criogénico (congelamiento direccional), centrándose en cada una de las etapas involucradas y en cómo la modificación de las variables experimentales permite modular el espaciado interlaminar de los electrodos. La segunda parte (Sección 5.5) aborda la caracterización de los electrodos a partir de medidas de conductividad eléctrica y determinación de su superficie específica, trazando una correlación entre estas medidas y las características químico-estructurales de los electrodos.*

### 5.1- Materiales electro-cerámicos

Los **materiales cerámicos** pueden definirse en términos generales como *compuestos inorgánicos no metálicos* con enlaces químicos de naturaleza iónico/covalente, donde el carácter del enlace dependerá de su grado de polarizabilidad (Carter y Norton, 2013). Estos materiales presentan un espectro amplio de propiedades, desde eléctricas y magnéticas, hasta ópticas, refractarias, electro/magneto-mecánicas y bio-compatibles, entre otras. Los materiales **electro-cerámicos** son materiales cerámicos en los que la conducción electrónica y/o iónica (asociada a la carga libre) o la polarizabilidad del material (asociada a fenómenos de 'deformación' de 'carga atrapada') desempeñan el rol central de interés de acuerdo con la aplicación buscada (Moulson y Herbert, 2003).

En las últimas décadas, la investigación en materiales electro-cerámicos ha experimentado un crecimiento sin precedentes gracias al avance de la electrónica. Desde el desarrollo de los primeros componentes en el siglo pasado, los científicos han explorado y descubierto una amplia variedad de materiales que presentan propiedades eléctricas y ópticas únicas, capaces de satisfacer las demandas de una extensa gama de aplicaciones. Los avances en la síntesis y caracterización de estos materiales han permitido la creación de dispositivos cada vez más pequeños, rápidos y eficientes, lo que ha llevado a su vez a fomentar aún más su investigación. Estos materiales incluyen materiales magnéticos, dieléctricos, semiconductores, conductores y superconductores, los que han encontrado aplicaciones en campos tan diversos como el monitoreo ambiental y la biomedicina, así como también en áreas centradas en el desarrollo de microsensores y microactuadores de alto rendimiento (Setter y Waser, 2000), dispositivos de almacenamiento de datos de estado sólido (DRAM) (Setter, 2001), sistemas de captación energética a partir de fuentes de energía ambiental aprovechable (calor residual, vibraciones u ondas electromagnéticas), entre otros (Anton y Sodano, 2007).

En todas sus aplicaciones, los materiales electro-cerámicos se caracterizan por dos aspectos que se desprenden de su particular configuración atómica: (i) excelente estabilidad químico/estructural, es decir, comportamiento refractario a temperatura elevada y/o condiciones extremas de pH, y (ii) sus ya mencionadas propiedades eléctricas. Dentro de la variedad de materiales electro-cerámicos que existe, es de interés particular dentro del marco de esta Tesis hacer foco en una de las familias de compuestos más versátiles desde el punto de vista de su aplicación: los **óxidos de titanio**. Éstos ofrecen un variado abanico de propiedades que dependen de la relación estructural oxígeno/titanio (O/Ti), lo que ha llevado al uso de estos óxidos como plataformas para el desarrollo de dispositivos fotocatalíticos,

mecánicos y ópticos, así como también a su uso en aplicaciones electroquímicas (Ren et al, 2012; Fujishima y Zhang, 2006; Munirathinam y Neelakantan, 2016; Tang et al, 1994).

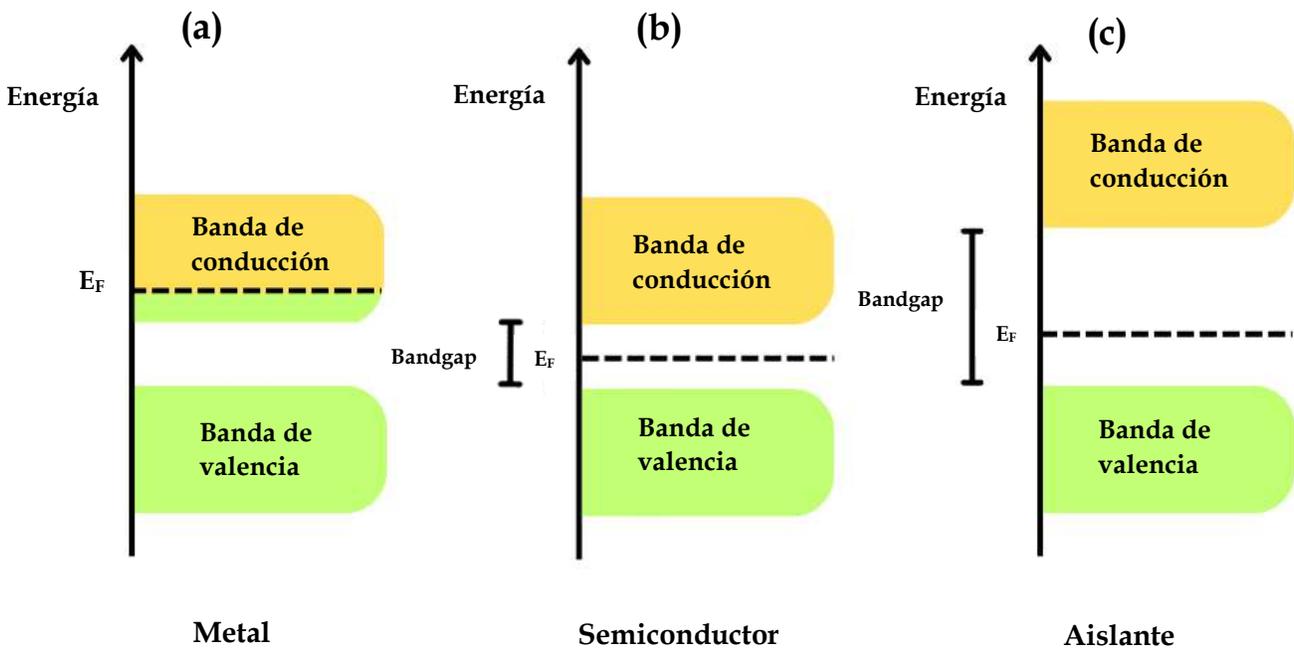
En la siguiente sección se describirán las principales características de los óxidos de titanio, haciendo hincapié en la relación estructura/propiedades eléctricas. Para esto se abordará inicialmente la discusión considerando a su principal representante, el  $TiO_2$ , de manera de trazar luego una transición hacia la estructura de óxidos más complejos (óxidos de titanio de valencia mixta), abarcando en este último caso las fases de interés en este trabajo de Tesis: las **fases de Magnéli**.

## 5.2- Óxidos de titanio

Los óxidos de titanio son compuestos formados a partir de la combinación de los elementos Ti y O. Dentro de esta familia, los más comunes son el  $TiO_2$  (óxido de titanio (IV)) y el  $Ti_2O_3$  (óxido de titanio (III)), aunque también existen otros óxidos menos comunes de los que se hablará más adelante. El  $TiO_2$  y el  $Ti_2O_3$  se encuentran en la naturaleza en forma de minerales, aunque también pueden ser sintetizados industrialmente. El  $TiO_2$ , quizás el representante más importante de esta familia de óxidos, suele disponerse en forma de polvo blanco cristalino, utilizándose frecuentemente como pigmento en la fabricación de pinturas, plásticos, cosméticos y alimentos, así como también como recubrimiento de materiales metálicos para protegerlos de la corrosión (Haider et al, 2019). De acuerdo con sus características estructurales (las que a su vez afectan la estructura electrónica del material), el  $TiO_2$  pertenece al extenso universo de **materiales semiconductores**. Las propiedades eléctricas de estos últimos, cuya conductividad aumenta con la temperatura y es significativamente menor que la de los metales, pueden explicarse en términos relativamente simples dentro del esquema teórico de la *Teoría de Bandas*, en el marco de la física del estado sólido.

De acuerdo con esta interpretación, los átomos que constituyen a los sólidos cristalinos forman una red tridimensional 'infinita' que permite el solapamiento extendido de orbitales atómicos a lo largo de toda la red (dependiendo de la distancia entre los átomos involucrados y las propiedades de simetría de los orbitales participantes), resultando en una configuración de estados energéticos deslocalizados muy próximos entre sí que forman *bandas 'continuas' de estados electrónicos permitidos*. Dependiendo del tipo de orbital resultante a partir del solapamiento de los orbitales atómicos, es posible distinguir dos tipos de bandas: (i) *bandas de valencia* (asociadas a los orbitales enlazantes, de menor energía), y (ii) *bandas de conducción* (asociadas a los orbitales antienlazantes, de mayor energía). Entre estas bandas hay intervalos de energía en los cuales no existen estados electrónicos permitidos, dando lugar a la denominada 'banda de energía prohibida' o *bandgap*. La mayoría de las propiedades químicas y físicas

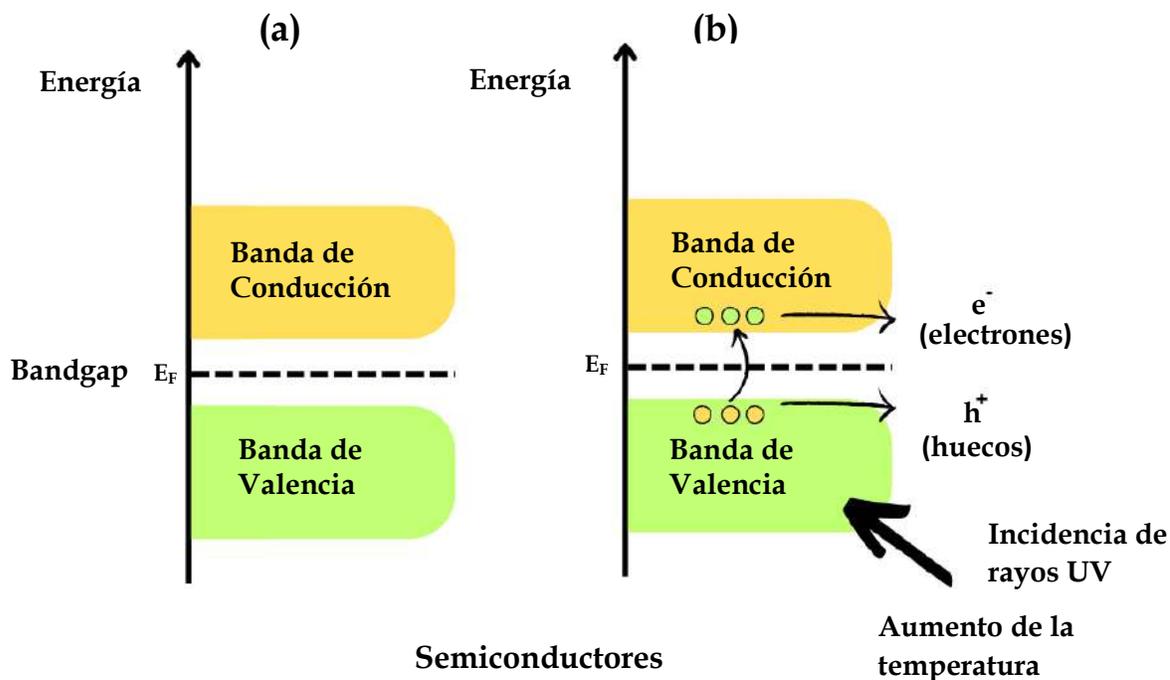
de los sólidos, entre éstas la conducción electrónica, pueden comprenderse conociendo el grado de ‘ocupación electrónica’ (densidad de estados) de las bandas de valencia y de conducción. En el estado fundamental, y a una temperatura teórica de 0K, los electrones ocupan estos estados electrónicos hasta un determinado valor de energía, denominado energía o nivel de Fermi ( $E_F$ ) (Candal et al, 2001). La posición de  $E_F$  con respecto a las bandas de valencia y de conducción distingue a los metales de los semiconductores y de los aislantes. Para los primeros,  $E_F$  cae dentro de la banda de conducción, mientras que, para semiconductores y aislantes, cae dentro del *bandgap*, como se representa en la **Figura 5.1**. La diferencia entre un semiconductor y un aislante está dada por el ancho de la banda de energía prohibida. Para los semiconductores este ancho es suficientemente pequeño como para que sea posible excitar (térmicamente, con luz o con descargas eléctricas) electrones de la banda de valencia a la de conducción.



**Figura 5.1.** Estructura de bandas y distribución de electrones a 0K para un metal (a), para un semiconductor intrínseco (b) y para un aislante (c). El color verde indica los estados ocupados por electrones;  $E_F$  es la energía de Fermi. Figura adaptada de Candal et al, 2001.

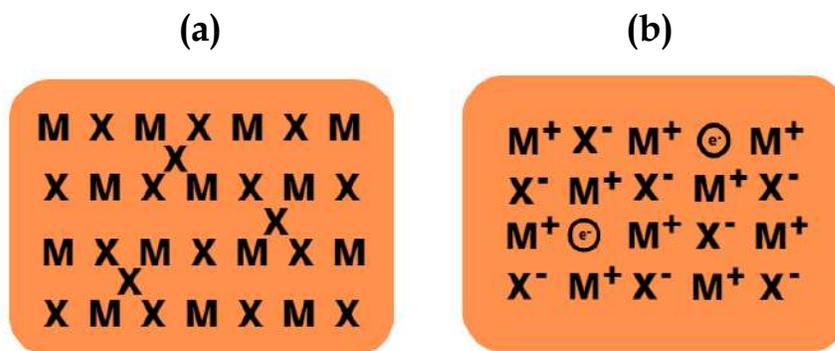
De acuerdo con esta interpretación, la conductividad eléctrica de un material está directamente relacionada con la existencia de **portadores de carga** en las bandas de los estados energéticos. En los metales, los portadores son los electrones cuya energía se localiza en la banda de conducción parcialmente llena (**Figura 5.1 (a)**), mientras que en los semiconductores los portadores son los electrones de la banda de conducción y los ‘huecos’ resultantes en la banda de valencia.

De acuerdo con su estructura electrónica de bandas, el  $\text{TiO}_2$  es un semiconductor, el cual ha despertado particular interés en el campo de la *fotocatálisis*. Cuando la luz incide sobre el  $\text{TiO}_2$ , los electrones en la banda de valencia pueden absorber energía suficiente para ‘ser excitados’ a la banda de conducción, creando un par electrón-hueco, como se esquematiza en la **Figura 5.2**. Una vez formados, y de no ocurrir procesos de recombinación, estos pares pueden participar en reacciones químicas que conducen a la degradación de contaminantes (Malato et al, 2009), así como también a la producción de energía cuando la separación de cargas es aprovechada, por ejemplo, en celdas fotovoltaicas (O'Regan y Grätzel, 1991). La eficiencia fotocatalítica depende de la energía de la luz incidente, de la brecha de la banda prohibida del  $\text{TiO}_2$  (3.0-3.2 eV, dependiendo de su estructura cristalográfica) y de la cantidad de imperfecciones en la estructura cristalina del material.



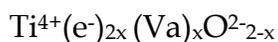
**Figura 5.2.** Esquema de la estructura de bandas y la distribución de electrones para un semiconductor intrínseco a 0 K (a), y a  $T \gg 0 \text{ K}$  o en presencia de luz UV (b). En el caso del  $\text{TiO}_2$ , la incidencia de rayos UV genera la formación de los portadores de carga:  $e^-$  y  $h^+$ . Figura adaptada de Candal et al, 2001.

La existencia de redes cristalinas defectuosas (con imperfecciones) permite explicar teóricamente algunos fenómenos físicos y químicos característicos que hacen atractivo al  $\text{TiO}_2$  desde el punto de vista de su estructura electrónica. Entre los defectos permanentes que puede poseer un cristal, la presencia de átomos en posiciones anómalas (átomos intersticiales) o la ausencia de átomos en la celda unitaria de la red (vacancias) son dos de los más comunes (**Figura 5.3**).



**Figura 5.3.** Defectos típicos en redes cristalinas. **(a)** Átomos intersticiales en la red. **(b)** Vacancias aniónicas. Estas últimas son generalmente compensadas por electrones ‘atrapados’ y localizados en dichas vacancias.

Compuestos como el  $\text{TiO}_2$  tienden a presentar comúnmente *composiciones no estequiométricas*, debido generalmente a una deficiencia estructural en el elemento no metálico (vacancias de oxígeno). Así, el cristal iónico - con exceso de cationes - debe poseer al mismo tiempo un exceso de electrones, de manera de garantizar la electroneutralidad del mismo. El  $\text{TiO}_2$  es uno de los ejemplos más representativos de óxidos deficitarios en oxígeno, con una estructura que combina vacancias aniónicas y electrones *localizados*. La razón iónica 2:1 (O:Ti) correspondiente a una estequiometría ‘perfecta’ raras veces se mantiene, adoptando generalmente una relación de tipo  $(2-x):1$ , donde  $x$  hace referencia a la deficiencia de aniones  $\text{O}^{2-}$  (vacancias aniónicas). Así, la fórmula general para la descripción estequiométrica correcta de este óxido es:



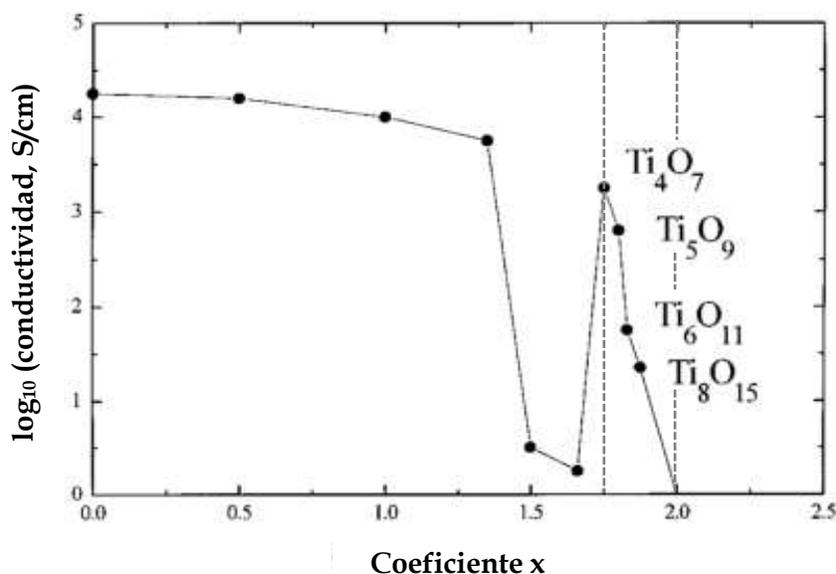
donde se expresa que el número de electrones ( $\text{e}^-$ ) es el doble del número de vacancias aniónicas existentes (compensación de cargas). De esta forma se explica que la aparición de desviaciones estequiométricas en cristales iónicos esté acompañada de un cambio, a veces profundo, en las propiedades eléctricas de los mismos, así como también de modificaciones asociadas a su reactividad química, en este último caso debido a una estructura deficitaria sensible a los cambios en la presión de oxígeno (Verdusch, 1964).

Las características estructurales descriptas (y la estructura electrónica asociada) representan la razón principal por la cual el  $\text{TiO}_2$  ha surgido en las últimas décadas como uno de los materiales de elección tanto para su uso directo (como fotocatalizador, por ejemplo) o como punto de partida para la obtención de estructuras con conductividad eléctrica variable. En este último caso, la generación deliberada de defectos estructurales *extendidos* en su red cristalina permite obtener materiales que, dependiendo de las condiciones experimentales, pueden comportarse ya no como semiconductores, si

no como **conductores eléctricos**. Es precisamente en este contexto en el que el  $TiO_2$  - en particular el polimorfo de estructura *rutilo* - emerge como un excelente material precursor de una familia de óxidos de titanio sub-estequiométricos de conductividad eléctrica variable, conocidos como **fases de Magnéli**.

### 5.3- Óxidos de titanio eléctricamente conductores: *fases de Magnéli*

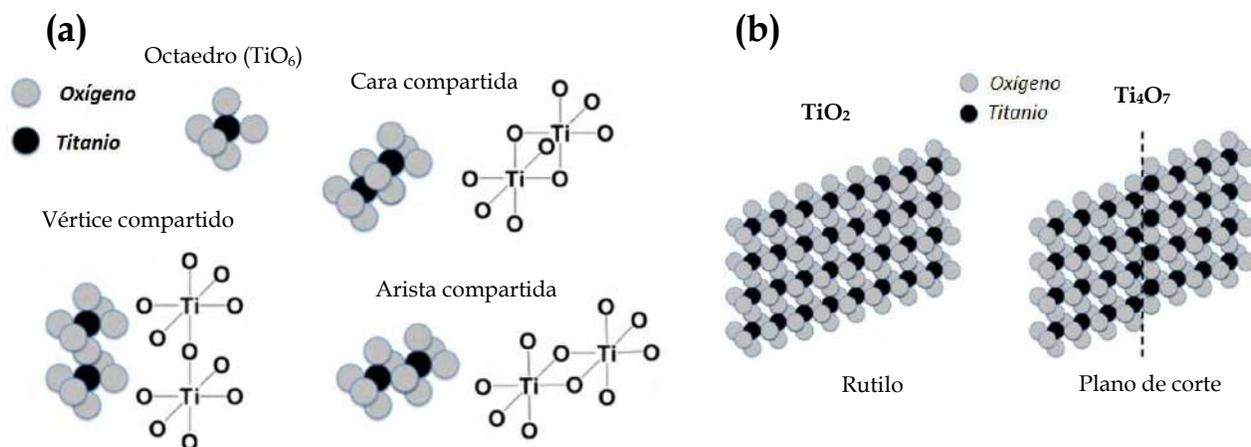
Las fases de Magnéli correspondientes a los óxidos de titanio son una serie de compuestos de formula general  $Ti_nO_{2n-1}$ , donde n es un numero entero entre 4 y 10 (Kitada et al, 2012). Estos óxidos son particularmente atractivos en el área de la Ciencia de Materiales debido a sus propiedades magnéticas y a su elevada conductividad eléctrica a temperatura ambiente, la cual varía entre los compuestos de la serie siendo en algunos casos del mismo orden de magnitud que la correspondiente al grafito (Smith et al, 1998). La **Figura 5.4** muestra una gráfica comparativa de las conductividades de estos compuestos a lo largo de la serie sub-estequiométrica en función de la relación O/Ti de cada óxido.



**Figura 5.4.** Conductividad eléctrica en función de la relación O/Ti (coeficiente x, o de oxidación) de algunos de los óxidos de la serie de Magnéli ( $Ti_nO_{2n-1}$ ). El subíndice n varía entre 4 y 10, por lo que x varía entre 1.75 y 1.9. Figura tomada de Smith et al, 1998.

En la **Figura 5.4** puede observarse el aumento de la conductividad eléctrica con el grado de reducción de los compuestos (que aumenta de derecha a izquierda) hasta alcanzar su máximo valor para el  $Ti_4O_7$ . Este comportamiento puede relacionarse con la estructura cristalina de cada uno de los óxidos, la cual presenta semejanzas con la red tipo rutilo correspondiente al  $TiO_2$ . Esta última está constituida por octaedros ( $TiO_6$ ) que contienen iones titanio (IV) en su centro geométrico y iones óxido en cada uno de los vértices. Estos octaedros están a su vez conectados entre sí de dos formas distintas:

a través de los vértices (compartiendo un oxígeno) y a través de las aristas (compartiendo dos). La **Figura 5.5 (a)** muestra esquemáticamente estas distintas formas de unión.



**Figura 5.5. (a)** Octaedros O/Ti y sus formas de asociarse: cara (esta forma no se da en rutilo), vértice o arista. **(b)** Red cristalina del  $\text{TiO}_2$  (tipo rutilo) y del  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ . Figura adaptada de Walsh et al, 2010.

La estructura correspondiente a la fase rutilo del  $\text{TiO}_2$  puede ser interpretada en consecuencia como planos formados por octaedros unidos a través de sus aristas, los que se ‘apilan’ a través de los oxígenos posicionados en los vértices para formar una estructura tridimensional a través de los oxígenos posicionados en los vértices (**Figura 5.5 (b)** - izquierda) (Walsh y Wills, 2010).

Los óxidos de titanio sub-estequiométricos presentan algunas características estructurales adicionales a las mencionadas, que explican sus particulares propiedades eléctricas y magnéticas. Como se mencionó en la Sección 5.2, la red cristalina del  $\text{TiO}_2$  puede poseer vacancias de oxígeno que repercuten directamente en su estructura electrónica. Así, es esperable que el aumento deliberado de la cantidad de vacancias aniónicas conduzca a modificaciones en el comportamiento electrónico del material. La principal modificación estructural que se produce es la *formación extendida de planos de corte* (o cizalladura), con el fin de contrarrestar precisamente la deficiencia de oxígeno (Diebol, 2003). Los planos de corte son tanto más predominantes cuanto mayor sea el déficit estructural de oxígeno, es decir, cuanto mayor sea el grado de reducción del óxido. En este sentido, el  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  emerge como el representante principal de la serie de Magnéli con mayor contenido de vacancias aniónicas, lo que justifica (como se detallará más adelante) su mayor conducción electrónica respecto de los demás óxidos de la serie. La estructura cristalina del  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  (**Figura 5.5 (b)** - derecha) consta de bloques de tipo rutilo, de longitud ‘infinita’ en dos dimensiones y de espesor equivalente a 4 octaedros  $\text{TiO}_6$ , separados entre sí por planos de corte. A diferencia del  $\text{TiO}_2$ , los bloques de rutilo que forman parte del  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  cizallan a

lo largo de estos planos de tal manera que los octaedros interfaciales comparten caras, aristas y vértices, mientras que los iones óxido forman un conjunto hexagonal distorsionado (Schlenker y Marezio, 1980). Esta forma de interpretar la estructura del  $Ti_4O_7$  se condice con la formula general de los óxidos pertenecientes a las fases de Magnéli ( $Ti_nO_{2n-1} = Ti_2O_3 + (n-2) TiO_2$ ), lo que sugiere que las estructuras pueden verse como láminas de tipo rutilo de extensión infinita y diferente espesor (dado por el subíndice n en la fórmula), separadas por planos con una disposición atómica similar a la del polimorfo corindón ( $Al_2O_3$ ) (Eyert et al, 2004).

Como se mencionó, la formación de vacancias en la red (por migración de oxígeno atómico hacia la superficie del material) requiere de una compensación de carga eléctrica, lo que conduce a un exceso de electrones en la red y al cambio descrito de las propiedades eléctricas del material. Estos electrones, inicialmente localizados en el campo eléctrico creado por los cationes que rodean al defecto aniónico, inducen finalmente la reducción de los iones Ti (IV) en posiciones adyacentes al defecto puntual, generándose dos iones Ti (III) por cada anión óxido que se pierde en la estructura (Verdusch, 1964). En la **Figura 5.6** se muestra un esquema representativo general de este proceso.

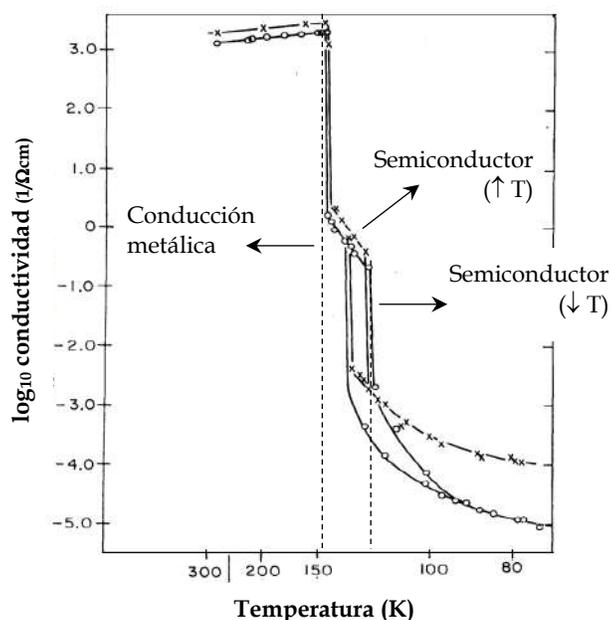


**Figura 5.6.** Representación del proceso de reducción de una red cristalina de  $TiO_2$ . Por cada ion óxido que se pierde (indicado a la izquierda en color rojo) se genera una vacancia aniónica (representada a la derecha como  $\square$ ). Estas vacancias son formalmente compensadas por la adopción de un estado de oxidación más bajo en el metal (Ti (III), indicado en azul).

El proceso de *reducción* (que puede inducirse, por ejemplo, térmicamente) conduce a la *aparición de portadores de carga en la banda de conducción del material*, debido a que los iones Ti (III) generados actúan como dadores electrónicos (configuración  $3d^1$ ). Este efecto es el responsable de la elevada conductividad eléctrica de estos óxidos a temperatura ambiente. Sin embargo, sus propiedades eléctricas y magnéticas no son constantes en todo el rango de temperaturas.

En particular, y de interés para esta Tesis, el  $Ti_4O_7$  pertenece a la clase de óxidos que presentan transiciones de tipo metal/ semiconductor en función de la temperatura. Dichas transiciones (de primer orden) definen tres estados para este material (**Figura 5.7**): uno de ‘alta temperatura’ (por encima de  $\sim 150$  K), en donde el material presenta una *conducción de tipo metálica*, disminuyendo su conductividad

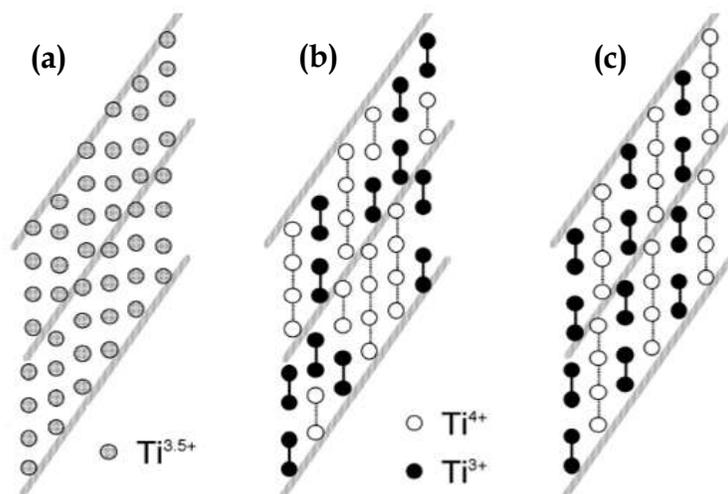
con el aumento de la temperatura; otro por debajo de este valor (150 K, transición de alta temperatura) hasta aproximadamente 125 K, donde el material se comporta como un *semiconductor*, con una disminución de tres órdenes de magnitud en su conductividad respecto al estado conductor y, además, una caída abrupta de su susceptibilidad magnética; y finalmente, un tercer estado, por debajo de 125 K (transición de baja temperatura) en donde el material, aun comportándose como un semiconductor, exhibe una caída adicional de tres órdenes de magnitud en su conductividad eléctrica. Esta última transición (semiconductor de alta temperatura ( $\uparrow T$ )/semiconductor de baja temperatura ( $\downarrow T$ )), a diferencia de la primera, está acompañada de un reordenamiento estructural (Bartholomew y Frankl, 1969).



**Figura 5.7.** Conductividad eléctrica de dos monocristales (símbolos  $o$  y  $x$ ) de  $Ti_4O_7$  en función de la temperatura. Se observan cambios abruptos en su conductividad a  $\sim 150$  K (transición metal/semiconductor de  $\uparrow T$ ) y a 125 K (semiconductor de  $\uparrow T$ /semiconductor de  $\downarrow T$ ). Adaptada de (Bartholomew y Frankl, 1969).

Las transiciones térmicas en el comportamiento conductor metálico/semiconductor de  $\uparrow T$ /semiconductor de  $\downarrow T$  para óxidos metálicos de valencia mixta como el  $Ti_4O_7$  ( $Ti^{3+}(3d^1)$  y  $Ti^{4+}(3d^0)$ ), dependen fuertemente de la distancia entre cationes y la efectividad de solapamiento de sus funciones orbitales, es decir, de la distribución cristalográfica de los mismos en cada una de las estructuras correspondientes a los estados previamente descritos. Este aspecto ha sido abordado en la literatura con distintos enfoques, llegando a un consenso general en cuanto a los mecanismos involucrados en los fenómenos de conducción electrónica.

En el estado de alta temperatura (por encima de 150 K), donde el compuesto posee un comportamiento de conducción electrónica de tipo metálica, la longitud media de los enlaces Ti-O es la misma para todos los sitios cristalográficos, generando una ocupación isotrópica de los estados Ti 3d (particularmente aquellos con simetría  $t_{2g}$ ) (Eyert et al, 2004). Estos estados energéticos son los principales contribuyentes a la banda de conducción del material, mientras que la banda de valencia está formada principalmente por estados O 2p. Los portadores de carga, en este caso los electrones 3d aportados por los iones Ti (III), se encuentran deslocalizados, y los cationes de la estructura poseen en conjunto una valencia promedio de 3.5. Esta deslocalización se representa esquemáticamente en la **Figura 5.8 (a)**.



**Figura 5.8.** Esquema del ordenamiento cristalográfico de los cationes titanio en la estructura de  $Ti_4O_7$  en función de la temperatura: (a)  $T > 150K$  (conductor metálico), (b)  $150 K > T > 125 K$  (semiconductor de  $\uparrow T$ ), y (c)  $T < 125 K$  (semiconductor de  $\downarrow T$ ). Las líneas grises representan los planos de corte. En negro se representan los bipolarones (ver texto). (Kobayashi, 1999)

En el otro extremo, en la fase tipo semiconductor de  $\downarrow T$  (**Figura 5.8 (c)**), existe un ordenamiento bien definido de iones Ti (III) y Ti (IV) a lo largo de la estructura cristalina. Esto provoca una diferenciación marcada de cada sitio cristalográfico (ya no todas las longitudes de enlace Ti-O son equivalentes), lo que conduce a una ocupación diferencial de los estados 3d asociados a los cationes titanio, induciendo finalmente un proceso de transferencia de carga entre los mismos, desde sitios con enlaces Ti-O más cortos hacia aquellos con longitudes mayores (Eyert et al, 2004). En este contexto, el estado semiconductor de  $\downarrow T$  se caracteriza por la formación de pares Ti(III)-Ti(III) llamados bipolarones (donde cada polarón está constituido por un electrón y un campo de distorsión coulombica asociado), en los que la carga está localizada y estabilizada por el alto orden alcanzado en la distribución estructural de dichos bipolarones. Es este grado de ordenamiento el que distingue a los estados de tipo semiconductor de

baja y alta temperatura. En la transición semiconductor de  $\downarrow T \rightarrow$  semiconductor de  $\uparrow T$  (conocida como transición orden-desorden) tiene lugar un fenómeno de transferencia electrónica desde los iones Ti (III) (bipolarones) hacia sitios adyacentes (Ti (IV)), lo que rompe con el orden estructural de los bipolarones de la fase de baja temperatura (localización completa de electrones) pero sin perder el emparejamiento Ti (III) - Ti (III) (**Figura 5.8 (b)**).

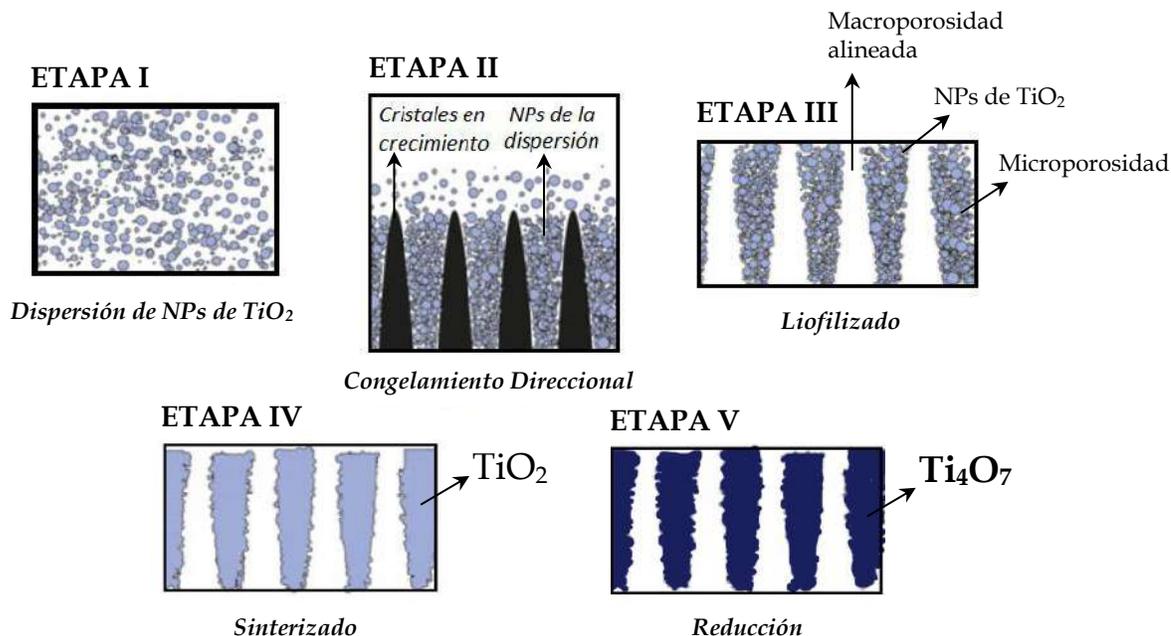
La interpretación descrita permite explicar el comportamiento observado en las propiedades eléctricas y magnéticas (conductividad y susceptibilidad) del  $Ti_4O_7$  (y sus homólogos de la serie de Magnéli) en función de su estructura cristalina de acuerdo con la temperatura de trabajo.

Debido a su elevada conductividad eléctrica y a su estabilidad química, el  $Ti_4O_7$  ha sido estudiado y aplicado como **material de electrodo**, tanto en el campo de la investigación básica (por ejemplo, en el estudio de procesos de síntesis, procesos de oxidación de gases de combustión, entre otros) como en la industria (sistemas de protección catódica de acero en concreto, tecnología de baterías, supercapacitores, entre otros) (Walsh y Wills, 2010). En este contexto, y de acuerdo con resultados previos del grupo de trabajo que han demostrado la bio-compatibilidad de este material como interfase de microorganismos electro-activos en aplicaciones bio-electroquímicas (Massazza et al, 2015; Massazza et al, 2018), se propuso a este óxido conductor como uno de los pilares para alcanzar los objetivos de la Tesis.

Es importante remarcar que, de acuerdo con el marco bio-electroquímico abordado en el Capítulo 1, además de las propiedades eléctricas y la bio-compatibilidad asociadas a la fase  $Ti_4O_7$ , las características estructurales de los electrodos sobre los que el material biológico se desarrolla cumplen un rol fundamental a la hora de optimizar sistemas bio-electroquímicos para la producción de corriente eléctrica. Esto realza algunas de las características más importantes de los electrodos en términos de su interacción con microorganismos, como por ejemplo su **área superficial por unidad de volumen** y su **porosidad**. En las siguientes secciones se detalla la preparación y caracterización físicoquímica de electrodos cerámicos tridimensionales de  $Ti_4O_7$  con porosidad anisotrópica, utilizando para esto una técnica de procesamiento criogénico (congelamiento direccional). El protocolo de preparación consta de cinco etapas de distinta naturaleza, en las que se buscó generar una estructura con porosidad organizada - porosidad abierta y alineada en una dirección preferencial - y la fase conductora del óxido de titanio de interés.

### 5.4.- Preparación de electrodos porosos de $Ti_4O_7$

La preparación de los electrodos puede describirse de acuerdo con las cinco etapas que se resumen en la **Figura 5.9**.

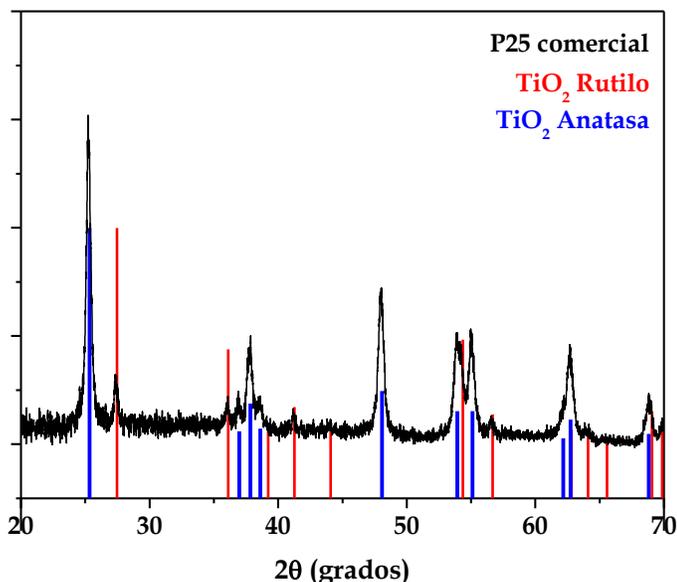


**Figura 5.9.** Etapas del proceso de preparación de los electrodos porosos de  $Ti_4O_7$ : I -Preparación de una dispersión acuosa de nanopartículas (NPs) de  $TiO_2$ , II- Congelamiento direccional de la dispersión, III- Liofilizado (sublimación del hielo generado en la etapa de congelamiento), IV- Sinterizado de la pieza de  $TiO_2$  obtenida luego del liofilizado, V- Reducción química bajo vacío para la obtención de  $Ti_4O_7$ .

De acuerdo con los pasos enumerados, el procedimiento consistió en la preparación inicial de una dispersión acuosa de NPs de  $TiO_2$  (Etapa I), la cual se congeló de manera direccional a velocidad controlada (Etapa II) para lograr la estructuración de las NPs. Posteriormente (Etapa III), y con el objeto de obtener piezas con macroporosidad abierta, se llevó a cabo la remoción (por sublimación) del hielo generado en la Etapa II. La consolidación estructural y la densificación de la muestra obtenida se logró en la Etapa IV, por sinterizado de la pieza de  $TiO_2$ . De esta manera, al finalizar las etapas mencionadas, se contó con una estructura porosa de  $TiO_2$  con canales unidireccionales, donde los poros fueron una réplica de los cristales de hielo formados en la etapa de congelamiento (Deville, 2008). En una última etapa (V), la estructura porosa se redujo químicamente a alta temperatura para formar la fase conductora deseada ( $Ti_4O_7$ ). En las próximas secciones se abordarán en detalle cada una de estas etapas.

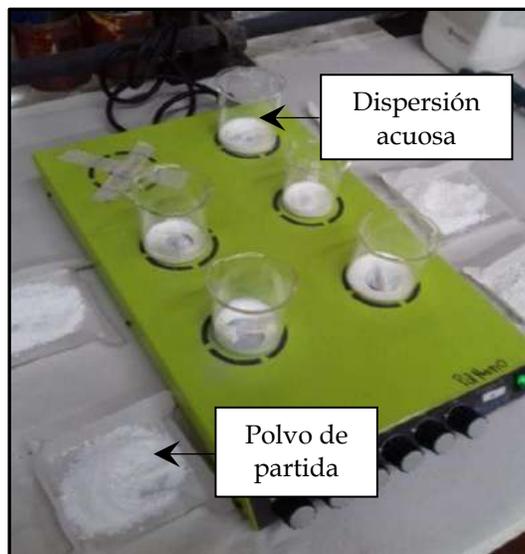
### 5.4.1.- Etapa I: Preparación de dispersiones de NPs de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)

Para la preparación de las dispersiones se utilizó un polvo comercial de NPs de TiO<sub>2</sub> (20-30 nm, Aeroxide P25/Degussa), el cual está compuesto por una mezcla de fases cristalinas anatasa/rutilo (en proporción aproximada 70/30). La presencia de ambas fases se confirmó, como parte de la caracterización inicial del material de partida, por difracción de rayos X (XRD) sobre la muestra del polvo comercial (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10.** Caracterización del polvo de partida Aeroxide P25 por difracción de rayos X (XRD). Se determinó la presencia de fases rutilo y anatasa.

Las dispersiones se prepararon en vasos de precipitados a temperatura ambiente con agitación continua, empleando una relación TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O de 0.21 g/mL. Para controlar la estabilidad de las mismas, es decir, evitar que las NPs sedimenten (lo que podría generar gradientes de densidad y porosidad en el material final), se empleó polivinilpirrolidona (PVP, de peso molecular 1.3 MDa) en una relación PVP/H<sub>2</sub>O de 0.062 g/mL. En estas cantidades, la PVP estabiliza la dispersión por períodos mayores a 24 h, garantizando la homogeneidad de la dispersión cerámica durante su procesamiento criogénico (Etapa II). Asimismo, la PVP actúa como agente ligante del material en verde, es decir, antes del proceso de sinterizado (Etapa IV), otorgándole estabilidad mecánica para su manipulación antes del consolidado final. La **Figura 5.11** muestra una fotografía tomada durante la preparación de las dispersiones.



**Figura 5.11.** Preparación de dispersiones de NPs de  $TiO_2$ .

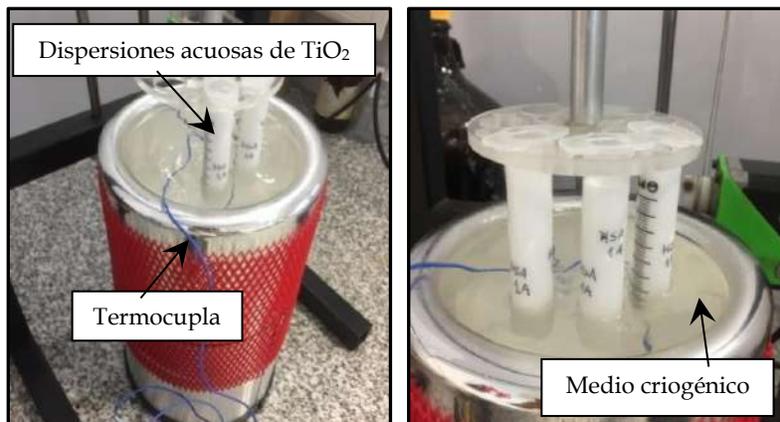
Una vez obtenidas las dispersiones, se llevó a cabo su conformado utilizando la técnica de congelamiento direccional, con la finalidad de estructurar las NPs y generar porosidad anisotrópica en la pieza cerámica resultante.

#### 5.4.2.- Etapa II: Congelamiento direccional

Durante la etapa de congelamiento (**Figura 5.9**, Etapa II) se forma la estructura de la pieza cerámica y se definen las características de la porosidad final. Para esto, se utilizó una técnica denominada *congelamiento direccional*, que permite obtener estructuras tipo ‘milhojas’ con poros ordenados en forma de canales alineados de un extremo al otro del material, debido a un fenómeno (de naturaleza física) de autoensamblado inducido por segregación de hielo (conocido como ISISA, por sus siglas en inglés). La versatilidad de esta técnica ha permitido la preparación de estructuras de naturaleza variada (polimérica (Kang et al, 1999), cerámica (Nishihara et al, 2006), carbonosa (Tamon et al, 1999)), así como también soportes porosos bio-compatibles para la inmovilización y proliferación de microorganismos (*E. coli*). (Gutiérrez et al, 2007).

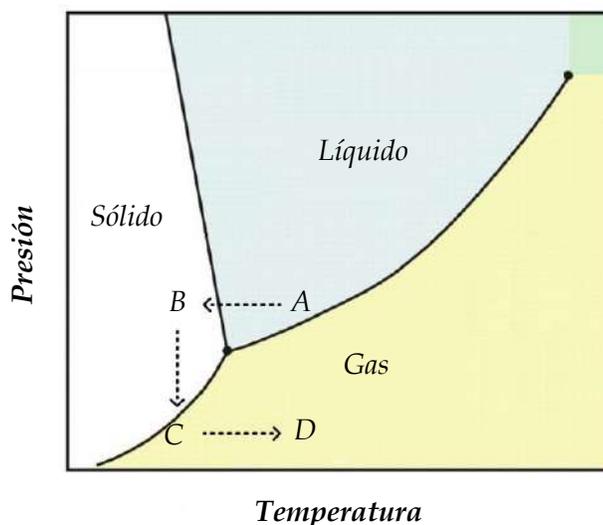
Para lograr la anisotropía de la porosidad la dispersión debe ser sometida inicialmente a un fuerte gradiente de temperaturas. Esto se logra colocándola en moldes (en este trabajo se utilizaron jeringas plásticas de 10 mL) uno de cuyos extremos se pone en contacto directo con un medio criogénico (contenido en un recipiente de paredes aislantes) mientras que el otro permanece a temperatura ambiente. La inmersión vertical de los moldes a velocidad controlada en el medio criogénico

desencadena la formación y crecimiento direccional (anisotrópico) de hielo, siguiendo la dirección del gradiente térmico. La **Figura 5.12** muestra fotografías del sistema de inmersión direccional empleado.



**Figura 5.12.** Las dispersiones se colocan en jeringas mantenidas en posición vertical en un soporte móvil. La velocidad de descenso de este soporte es controlada por un dispositivo electrónico que permite mantener constante la velocidad de avance del frente de solidificación.

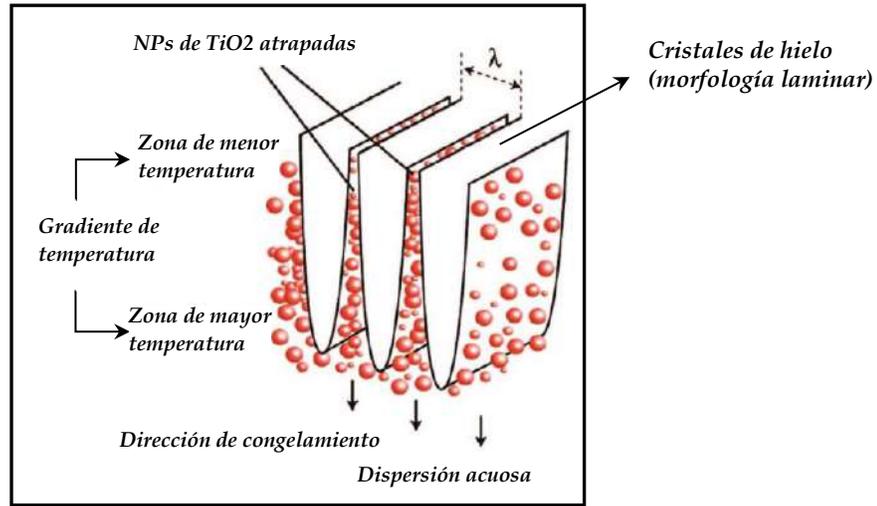
Durante el proceso de congelamiento (**Figura 5.13**, trayectoria A→B), las NPs en suspensión (y la PVP disuelta) son expulsadas de la fase sólida en formación (hielo), lo que provoca su redistribución y confinamiento entre los cristales de hielo, induciendo finalmente su auto-organización.



**Figura 5.13.** Diagrama de fases del agua. Trayectorias: A→B - Congelamiento a presión constante (atmosférica) del agua presente en la dispersión cerámica. B→C - Liofilizado (disminución isotérmica de la presión por debajo de la presión del punto triple). C→D - Aumento isobárico de temperatura.

La **Figura 5.14** muestra un esquema del reordenamiento de las NPs como consecuencia del proceso de congelamiento. En este caso particular, en el que se utiliza agua como medio continuo dispersante,

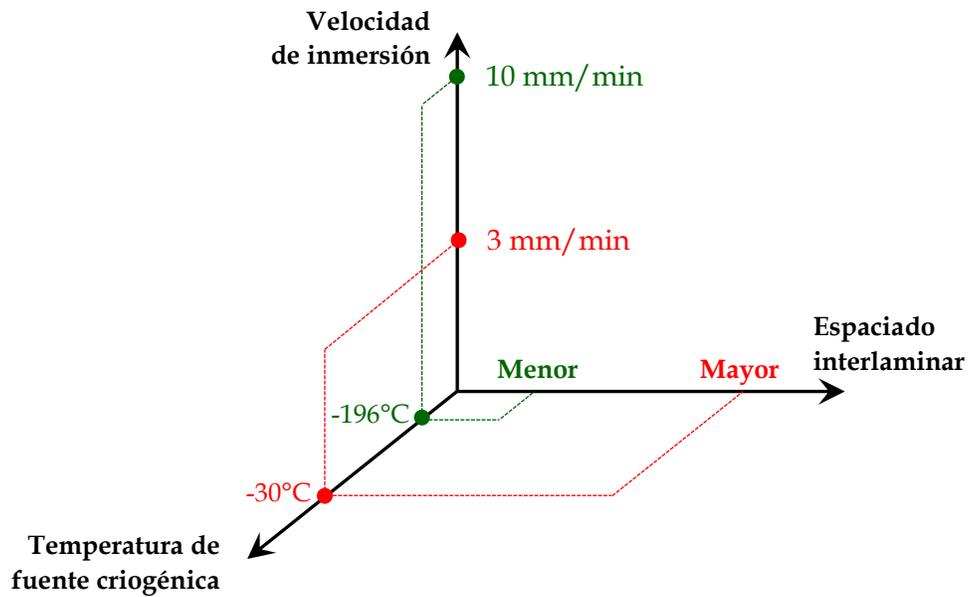
los cristales de hielo que se forman bajo la influencia del gradiente de temperaturas adoptan una *morfología laminar*.



**Figura 5.14.** Crecimiento de cristales de hielo en la dispersión de NPs de  $\text{TiO}_2$  (representadas en la figura como esferas de color rojo). El frente de hielo se genera en las zonas de menor temperatura y avanza hacia las de mayor temperatura (dirección de congelamiento). Las NPs son segregadas por el frente de solidificación y reubicadas entre los cristales en crecimiento, lo que induce su auto-organización. En la figura,  $\lambda$  representa el espesor de las láminas de hielo formadas.

Las variables operacionales del proceso, como la temperatura del medio criogénico utilizado y/o la velocidad de inmersión de las dispersiones, determinan las características de los cristales formados (específicamente el espesor de los mismos,  $\lambda$ ) y, en consecuencia, las características finales de la porosidad. El estudio de la cinética de solidificación ha demostrado que, *a mayores velocidades de inmersión en el medio criogénico y/o mayor gradiente de temperaturas entre los extremos de la muestra*, menores son los espesores de los cristales de hielo formados y, consecuentemente, menores son los espaciados interlaminares obtenidos en las estructuras porosas (Waschkies et al, 2011).

La **Figura 5.15** resume estos conceptos para dos condiciones de procesamiento diferentes, tomadas a modo de ejemplo.



**Figura 5.15.** Efecto de las variables de congelamiento direccional (velocidad de inmersión y temperatura de la fuente criogénica) sobre el espaciado interlaminar generado en las estructuras porosas. Trayectoria verde: inmersión de la dispersión cerámica a 10 mm/min en nitrógeno líquido (-196°C). Trayectoria roja: inmersión a 3 mm/min en una mezcla hielo seco/acetona (-30°C).

Las condiciones de congelamiento direccional utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas para preparar piezas de  $\text{TiO}_2$  con diferentes espaciados interlaminares, de manera de contar - en la parte final de la Tesis - con electrodos laminados de diferente accesibilidad y superficie específica (área por unidad de volumen). Se seleccionaron inicialmente dos medios líquidos en los que llevar adelante la inmersión controlada. Por un lado se trabajó con *nitrógeno líquido* ( $T: -196^\circ\text{C}$ ), utilizándolo como cota de menor temperatura. Por otro lado se utilizó una *mezcla hielo seco/acetona*, cuya temperatura ( $T: -70^\circ\text{C}$ ,  $-30^\circ\text{C}$  o  $-10^\circ\text{C}$ ) se controló a partir de la cantidad de hielo seco disuelta. De acuerdo con estas condiciones, se trabajó con cuatro temperaturas de ‘fuente fría’ ( $T_{\text{congelamiento}}$ ) en combinación con cuatro velocidades de inmersión ( $v_{\text{inmersión}}$ : 1, 3, 5 o 10 mm/min).

El trabajo se realizó en etapas, evaluando en primera instancia las características estructurales de las piezas obtenidas a menor  $T_{\text{congelamiento}}$  (nitrógeno líquido), las que, de acuerdo con lo mencionado, conducirían a los menores espaciados interlaminares. Luego, en función de los resultados obtenidos, se seleccionaron combinaciones  $T_{\text{congelamiento}}/v_{\text{inmersión}}$  que permitieran obtener mayores espaciados interlaminares, siempre centrando la búsqueda en las características estructurales necesarias de acuerdo con los objetivos de la Tesis. La **Tabla 5.1** resume las distintas condiciones experimentales finalmente utilizadas para el procesamiento de las dispersiones cerámicas.

**Tabla 5.1** Fuente fría, temperatura y velocidad de inmersión utilizadas para el procesamiento de las dispersiones de  $TiO_2$ .

Fuente fría	$T_{\text{congelamiento}} (^{\circ}\text{C})$	$V_{\text{inmersión}} (\text{mm/min})$
Nitrógeno líquido	- 196	1
		3
		5
		10
Mezcla hielo seco/acetona*	- 70	1
		3
		5
Mezcla hielo seco/acetona*	- 30	1
		3
		5
	- 10	1

\*Controlando las cantidades de hielo seco que se disuelven en acetona es posible modular la temperatura final de la mezcla.

Luego del congelamiento direccional de las dispersiones se llevó a cabo la tercera etapa del proceso, la remoción del hielo formado para la generación de la porosidad característica.

### 5.4.3.- Etapa III: Liofilizado

La eliminación del hielo se llevó a cabo evitando que este se descongele (es decir, evitando la transformación sólido→líquido, trayectoria B→A en la **Figura 5.13**), de manera de mantener la estructuración lograda por congelamiento direccional. Para esto se llevó a cabo un proceso de *liofilizado*, el cual consiste en la modificación de la presión y la temperatura de la muestra para inducir la transformación directa agua (s) → agua (g) (sublimación), ‘rodeando’ para esto el punto triple del diagrama de fases.

Las muestras congeladas se sometieron a una reducción de la presión a temperatura constante (**Figura 5.13**, trayectoria B→C) hasta un valor por debajo de la presión correspondiente a la del punto triple (0.006 atm). Con el fin de garantizar una transición de fases completa, la reducción de la presión se combinó con un aumento de la temperatura de la muestra (trayectoria C→D). En estas condiciones se logra la eliminación total del hielo y la generación simultánea de porosidad estructurada (canales alineados) en los lugares donde originalmente estaban los cristales de hielo (entre las partículas de  $TiO_2$  estabilizadas por la PVP). En consecuencia, luego de la etapa de liofilización, se obtuvieron piezas (material en verde) cuya porosidad replicó la estructura del hielo formado durante el congelamiento.

La **Figura 5.16** muestra distintas vistas macroscópicas de una estructura en verde obtenida luego de las primeras tres etapas descriptas (dispersión, congelamiento y liofilizado).

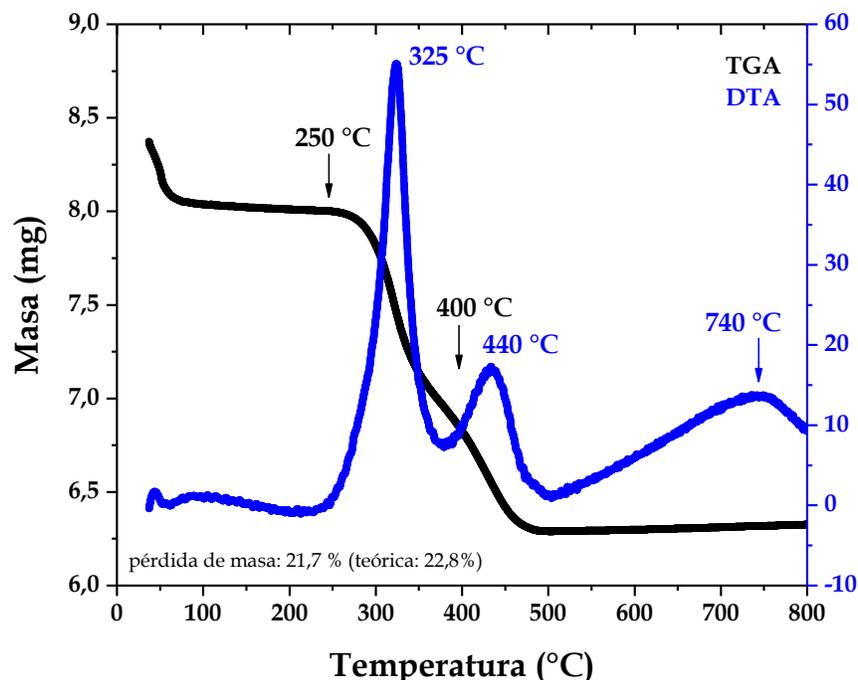


**Figura 5.16.** Vista longitudinal (a) y transversal (b y c) de las piezas obtenidas luego del proceso de liofilizado. La flecha en (c) indica la extensión de la estructura laminada de  $\text{TiO}_2$  (de extremo a extremo de la pieza). En (d) se muestra un detalle de esta estructura sobre un corte transversal de la pieza (imagen tomada con una lupa binocular estereoscópica).

A partir del corte transversal de la muestra pudo observarse el laminado radial formado, con una estructura que se extendió longitudinalmente de un extremo al otro de la pieza. Una vez obtenida la pieza porosa en verde se continuó con la etapa de sinterizado, para lograr su consolidación estructural.

### 5.4.4.-Etapa IV: Sinterizado

La consolidación estructural del material se llevó a cabo por sinterizado. Éste consiste en un tratamiento térmico a elevada temperatura donde se inducen procesos de difusión/vaporización/deposición atómica que conducen finalmente a la adherencia de las NPs entre sí (formando un sólido continuo) y a la disminución de la energía superficial por unidad de volumen del sistema, generando la contracción (aumento de la densidad por eliminación de microporosidad) y la consolidación de la pieza (**Figura 5.9**, Etapa IV). Para determinar el protocolo de tratamiento térmico a utilizar durante esta etapa, se realizaron inicialmente estudios termogravimétricos (TGA) y termodiferenciales (DTA) en atmósfera de aire sobre el material en verde. La **Figura 5.17** muestra las curvas obtenidas.



**Figura 5.17.** Caracterización de la pieza en verde mediante análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA).

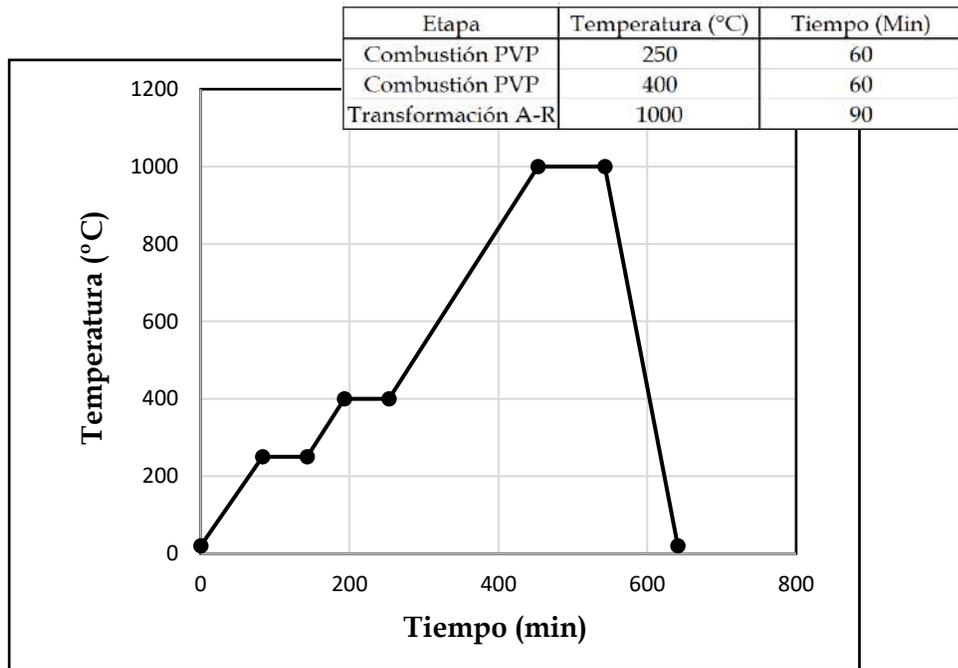
El análisis termogravimétrico mostró una caída inicial en la masa de la muestra a una temperatura por debajo de  $100^{\circ}\text{C}$ , atribuida a la pérdida de humedad adsorbida por el material. La mayor pérdida de masa se observó en el rango de temperaturas  $250^{\circ}\text{C}$  -  $465^{\circ}\text{C}$ , la que se dio en dos etapas consecutivas con diferentes pendientes. Teniendo en cuenta la composición de la muestra, y comparando el valor experimental de pérdida de masa total (21.7%) con el valor teórico (22.8 %), esta caída se asoció a la combustión de la PVP utilizada como agente ligante (asumiendo combustión completa). A partir de  $465^{\circ}\text{C}$  la masa del sistema se mantuvo constante hasta el final del ensayo.

El análisis térmico diferencial reveló dos señales exotérmicas cuyos máximos se localizaron a  $325^{\circ}\text{C}$  y  $440^{\circ}\text{C}$ , asociados a los procesos de combustión de la PVP mencionados. Este análisis demostró que la PVP se encuentra asociada a la estructura de  $\text{TiO}_2$  con distinto grado de intensidad, requiriendo dos etapas para su completa eliminación. Un tercer proceso exotérmico se observó a partir de  $500^{\circ}\text{C}$ , con un máximo de absorción a  $740^{\circ}\text{C}$ . Este último no estuvo acompañado de cambios en la masa de la muestra (de acuerdo con la respuesta por TGA), lo que se relacionó - de acuerdo con estudios de la literatura - con la transición de fases en la red cristalina del  $\text{TiO}_2$ , de *anatasa* a *rutilo*. Si bien esta última fase es la más estable (termodinámicamente hablando) independientemente de la temperatura (con valores de energía libre siempre por debajo de los correspondientes a la fase anatasa) (Hanaor y Sorrell, 2011), la transformación anatasa  $\rightarrow$  rutilo es *cinéticamente* desfavorable a bajas temperaturas y/o tamaños de

## Capítulo 5

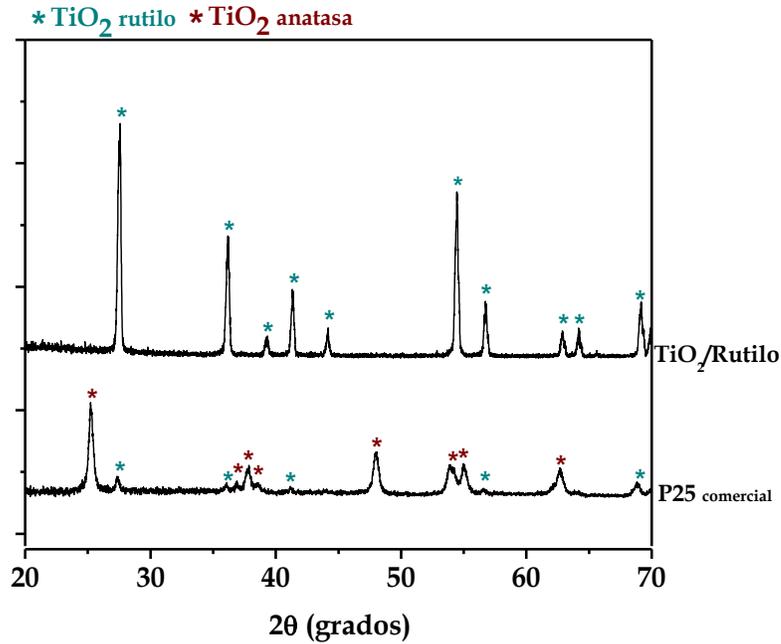
partícula nanométricos (Dominguez Dominguez, 2016), por lo que se requiere superar una temperatura de ~ 700-800°C para lograr la conversión completa (Hanaor y Sorrell, 2011).

A partir de estos resultados se definieron las condiciones de sinterización. Para esto se tuvo en cuenta además la necesidad de liberar paulatinamente los gases provenientes de la combustión del polímero, de manera de evitar fisuras en la muestra. Esto se logró mediante el establecimiento de dos mesetas en el perfil térmico (contemplando los procesos de combustión mencionados) utilizando velocidades de calentamiento bajas (3°C/min). Asimismo, con el objeto de garantizar una conversión completa de fases para la obtención de una estructura tipo rutilo (como etapa previa a la obtención final del óxido conductor,  $Ti_4O_7$ ), se estableció una tercera y última meseta a 1000°C (temperatura superior a dicha transición). La **Figura 5.18** muestra el protocolo utilizado en el proceso de sinterizado de las estructuras porosas de  $TiO_2$ .



**Figura 5.18.** Perfil de calentamiento utilizado en el proceso de sinterizado. A: Anatasa. R: Rutilo.

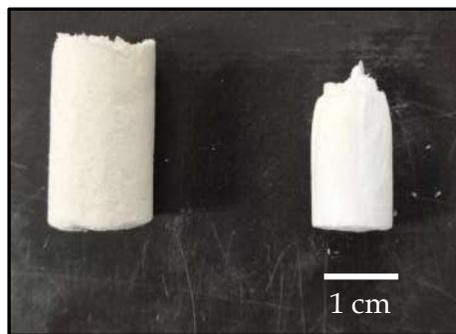
Las fases presentes en el material sinterizado se caracterizaron a partir de estudios de XDR. En la **Figura 5.19** se compara el difractograma obtenido a partir del polvo de la pieza sinterizada con el correspondiente al polvo de partida (P25).



**Figura 5.19.** Difractogramas de rayos X del material sinterizado ( $TiO_2$ , rutilo) y del polvo de partida, P25.

La comparación mostró, para la pieza cerámica luego del tratamiento térmico a  $1000^\circ C$ , la desaparición de la mezcla de fases presente en el polvo de partida, detectándose sólo la fase rutilo pura.

Como se mencionó, el sinterizado conduce no sólo a la consolidación estructural de la muestra, sino también a la reducción del volumen de la misma debido fundamentalmente a la pérdida de *microporosidad* intersticial. Esto tiene como consecuencia el aumento de la densidad estructural (densidad esquelética) de la pieza obtenida. En la **Figura 5.20** se puede observar el efecto de contracción volumétrica producto del sinterizado.

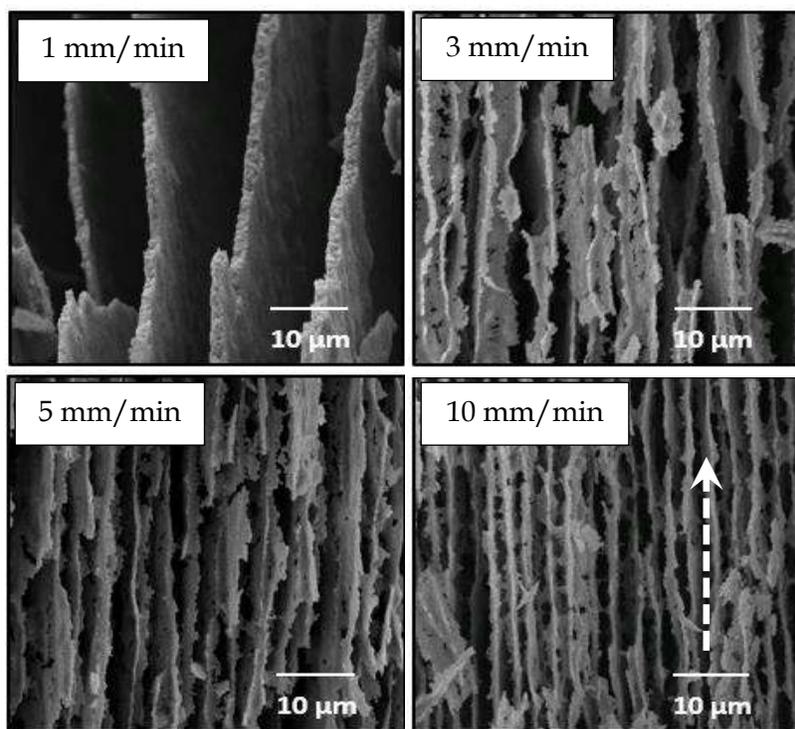


**Figura 5.20.** Reducción de volumen de las piezas. Antes (izquierda) y luego del sinterizado.

En este contexto, y de acuerdo con el objetivo del trabajo de Tesis, es importante mencionar que el proceso de consolidación estructural permite no obstante preservar la *macroporosidad* orientada generada a partir del congelamiento direccional. Esto resulta fundamental a la hora de pensar en la utilización de las estructuras porosas como soportes para contener microorganismos (por ejemplo,

bacterias) en su interior. La porosidad total obtenida (determinada por el método de Arquímedes) para cada una de las muestras preparadas fue de  $\sim 90\%$  (con menos de 1% de porosidad cerrada), correspondiéndose con el volumen de agua empleado inicialmente para la preparación de las dispersiones.

Como se mencionó en la descripción de la Etapa II, los parámetros de procesamiento criogénico definen las características de la porosidad final de la estructura. En particular, la velocidad de inmersión ( $v_{\text{inmersión}}$ ) y la temperatura de congelamiento ( $T_{\text{congelamiento}}$ ) utilizadas definen el crecimiento lateral de las láminas de hielo (espesor, denotado como  $\lambda$  en la **Figura 5.14**) y, en consecuencia, el espaciado entre las paredes laminares internas del material poroso. La **Figura 5.21** muestra imágenes obtenidas por microscopía SEM de cortes longitudinales de distintas piezas cerámicas sinterizadas, obtenidas al variar las velocidades de inmersión (1, 3, 5 y 10 mm/min) en nitrógeno líquido.



**Figura 5.21.** Imágenes SEM de cortes longitudinales realizados a piezas porosas sinterizadas obtenidas a distintas velocidades de inmersión, utilizando nitrógeno líquido como medio criogénico. La flecha indica la dirección de congelamiento.

Se observó efectivamente la disminución del espaciado interlaminares a medida que se incrementó la velocidad de inmersión. Esta disminución - para muestras de porosidad total constante - debería conducir al aumento del área superficial de las piezas por unidad de volumen (área superficial específica), lo que efectivamente se demostrará en la Sección 5.5.2. Los espaciados interlaminares

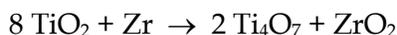
*promedio*, calculados a partir del análisis de cuatro imágenes con diferentes magnificaciones para cada muestra, fueron de 10±1, 5±1, 4±1 y 3±1 μm, correspondientes a las velocidades de inmersión de 1, 3, 5 y 10 mm/min (en nitrógeno líquido), respectivamente. Un aspecto interesante a destacar radica en la variación del espesor y la 'rugosidad' de las láminas en función del espaciado interlaminar. Debido a que se empleó la misma cantidad de material para la preparación de las estructuras porosas, a menor espaciado interlaminar (es decir, mayor cantidad de láminas por unidad de volumen) menor fue el espesor de cada lámina. Contrariamente, a mayor espaciado (menos láminas por unidad de volumen) mayor fue el grosor de pared desarrollado. En este sentido, cuanto más delgadas resultaron las láminas de la estructura porosa, se observó además una mayor rugosidad superficial, lo que podría ejercer efectos relevantes sobre la adherencia microbiana y el desarrollo del flujo hidrodinámico en el interior de las estructuras porosas durante su evaluación como soportes para el crecimiento de bacterias electroactivas. Se retomará este concepto en el próximo capítulo.

Además de la variación del espaciado interlaminar, a partir de las imágenes pudo observarse claramente uno de los principales efectos generados a partir del procesamiento criogénico: la fuerte orientación de la porosidad, la que se extendió longitudinalmente de un extremo al otro de la pieza de acuerdo con la anisotropía de los cristales de hielo generados durante el congelamiento. Estas características estructurales fueron observadas para todas las muestras preparadas, independientemente de la temperatura de la fuente fría utilizada.

Una vez consolidadas las piezas, se llevó a cabo la última etapa para la obtención de los electrodos de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: la reducción química del TiO<sub>2</sub>.

#### 5.4.5.- Etapa V: Reducción química

La etapa final del proceso de preparación de los electrodos se centró en la reducción del TiO<sub>2</sub> a alta temperatura, de manera de obtener estructuras eléctricamente conductoras de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (**Figura 5.9**, Etapa V). Esta reducción se llevó a cabo en presencia de zirconio metálico, de acuerdo con la siguiente ecuación (Kitada et al, 2012):



La reacción se llevó a cabo colocando la mezcla reactiva en tubos de vidrio de sílice cerrados al vacío (**Figura 5.22**), empleando una relación en masa de 20 mg Zr/100 mg TiO<sub>2</sub> (Kitada et al, 2012). Los tubos así preparados se colocaron en un horno y se llevaron a 1000°C, empleando una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La temperatura de reacción favorece los fenómenos de difusión atómica

## Capítulo 5

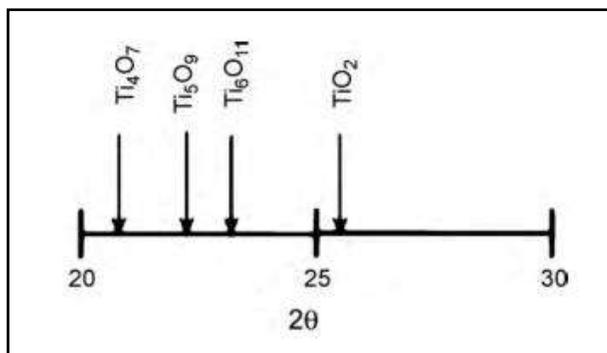
en estado sólido y la consecuente pérdida de oxígeno a partir de la estructura de  $\text{TiO}_2$  (**Figura 5.6**). En este proceso, el Zr actúa como agente reductor, a modo de sumidero de oxígeno (generándose  $\text{ZrO}_2$ ). Las condiciones de reducción bajo vacío permiten evitar procesos de oxidación (del Zr) y de re-oxidación (del sub-óxido de titanio obtenido) indeseables en el sistema.



**Figura 5.22.** Sistema experimental utilizado para la reducción de las estructuras porosas de  $\text{TiO}_2$ . Izquierda: virutas de Zr metálico. Derecha: piezas porosas sinterizadas junto con las virutas de Zr dentro de un tubo cerrado al vacío.

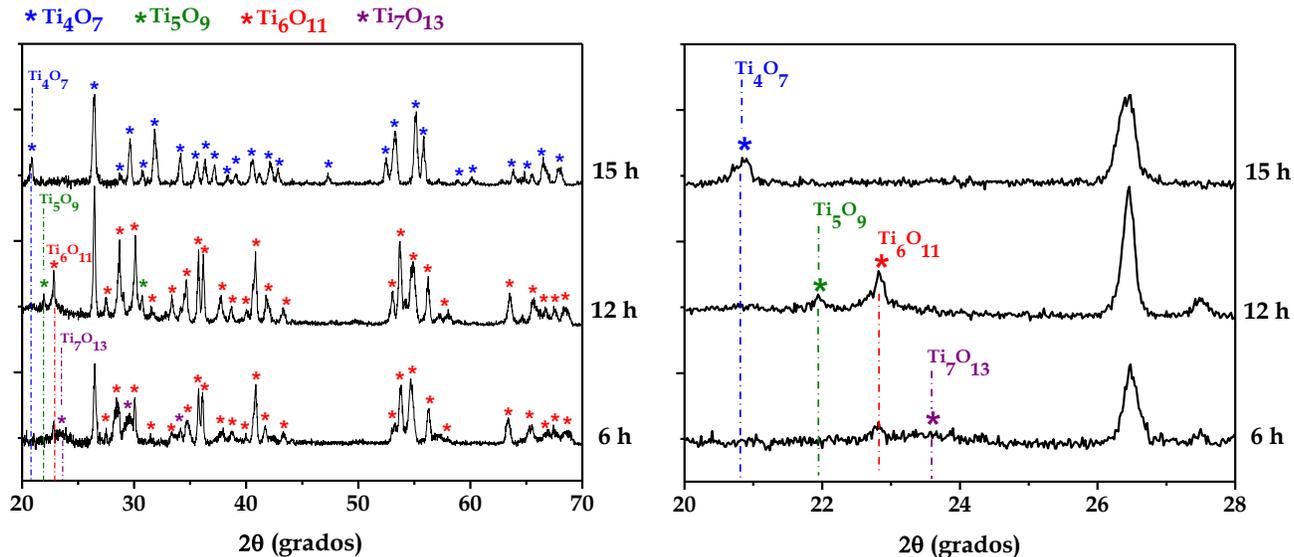
Como se mencionó en la etapa introductoria de este capítulo, la pérdida de oxígeno atómico en la red cristalina del  $\text{TiO}_2$  conduce a la formación de vacancias aniónicas y a la consecuente reducción de iones Ti (IV) en la estructura. El proceso global permite obtener materiales de estequiometría  $\text{Ti}_n\text{O}_{2n-1}$  (óxidos sub-estequiométricos), los que pueden ser formalmente interpretados como la combinación de una unidad cristalográfica de  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  por cada  $n-2$  unidades de  $\text{TiO}_2$ . Así, por ejemplo, la estructura del  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  ( $n=4$ ) puede representarse como la suma estequiométrica de  $\text{Ti}_2\text{O}_3 + 2 \text{TiO}_2$ . De acuerdo con el balance estequiométrico de la reacción, y dependiendo de la temperatura y tiempo empleados, es posible variar la proporción de ambas unidades cristalinas ( $\text{Ti}_2\text{O}_3$  y  $\text{TiO}_2$ ) en la estructura final y, así, modificar el tipo de fase de Magnéli obtenida. Sobre esta base, y con el objeto de determinar el tiempo óptimo de reducción que permita obtener la fase  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  pura, se realizaron estudios de XRD en función del tiempo de tratamiento térmico a  $1000^\circ\text{C}$  (6, 12 o 15 horas), evaluando la evolución del sistema, a fin de encontrar el menor tiempo necesario para producir únicamente  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ .

De acuerdo con estudios de la literatura (Walsh y Wills, 2010), es posible distinguir inequívocamente cada una de las fases de la serie de Magnéli presentes en una muestra a partir del análisis de patrones de XRD característicos. Estos son, para una radiación de  $\text{Cu K}\alpha$ ,  $2\theta = 20,78$  (para la fase  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ),  $2\theta = 22,02$  ( $\text{Ti}_5\text{O}_9$ ) y  $2\theta = 22,84$  ( $\text{Ti}_6\text{O}_{11}$ ). La **Figura 5.23** muestra la posición esperada de estos patrones en comparación con un patrón característico correspondiente a la fase anatasa del  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 5.23.** Identificación de fases de Magnéli mediante XRD.  $2\theta = 20,78$  para  $Ti_4O_7$ ,  $2\theta = 22,02$  para  $Ti_5O_9$  y  $2\theta = 22,84$  para  $Ti_6O_{11}$ .  $TiO_2$  (anatasa):  $2\theta = 25,33$ .

Las piezas resultantes de las reducciones realizadas variando el tiempo de reacción se molieron y analizaron mediante XRD de polvos. Los resultados se muestran a continuación en la **Figura 5.24**.

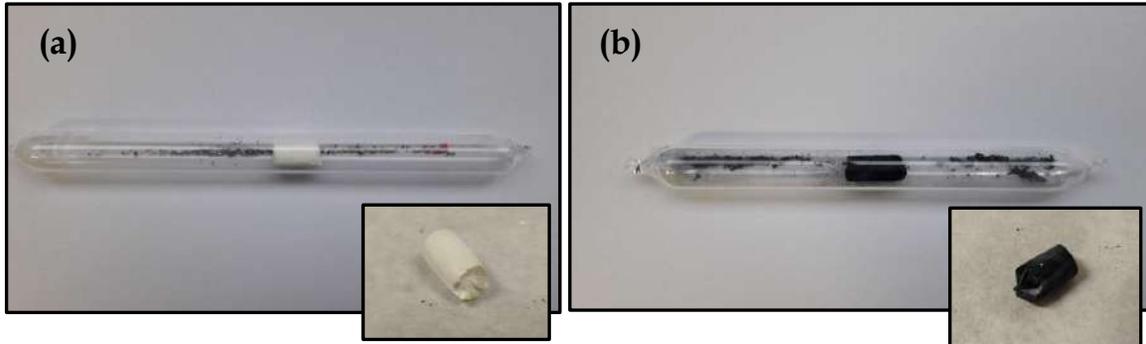


**Figura 5.24.** Izquierda - Difractogramas de las muestras reducidas durante 6, 12 o 15 horas. Derecha - Ampliación de la región comprendida entre  $20$  y  $28^\circ$  para identificar las fases de Magnéli presentes.

Se observó una evolución del sistema con el tiempo de reacción, determinándose que sólo es posible obtener  $Ti_4O_7$  de forma pura (fase única) a partir de 15 h de reducción para las condiciones empleadas. Por el contrario, las muestras reducidas durante 6 o 12 h mostraron una mezcla de fases ( $Ti_6O_{11}/Ti_7O_{13}$  para 6 horas de reacción; y  $Ti_5O_9/Ti_6O_{11}$ , con una incipiente aparición de  $Ti_4O_7$ , para 12 h de reducción). Esto llevó a definir un tiempo de 15 h de reacción para el tratamiento térmico de obtención de la fase de interés.

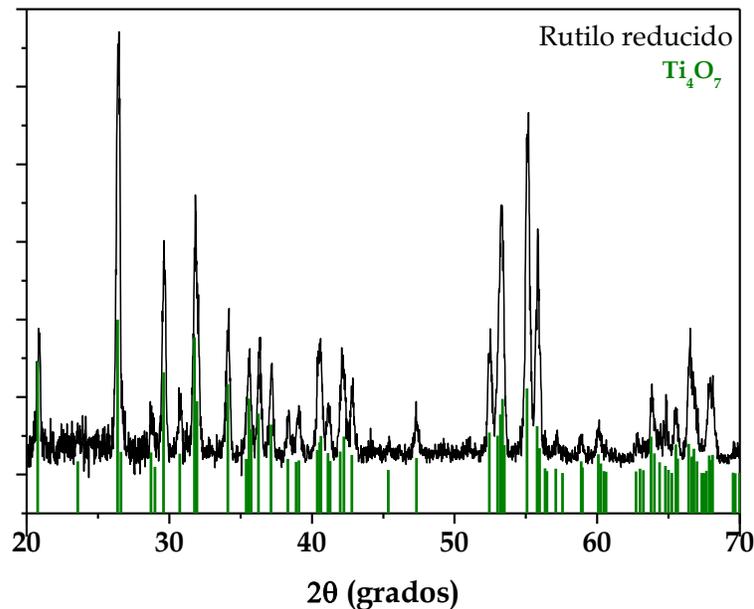
La **Figura 5.25** muestra fotografías de las piezas cerámicas antes y después del proceso de reducción. Un efecto típico observado fue el cambio de coloración de las muestras. Este fenómeno puede asociarse

a la generación de *centros de color*, producidos por la aparición de niveles electrónicos puntuales en defectos cristalinos, lo que induce el desplazamiento de la absorción de energía al rango de luz visible (Diebol, 2003).



**Figura 5.25.** (a) Pieza porosa de  $\text{TiO}_2$  antes del proceso de reducción, (b) Estructura de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  obtenida luego de la reducción.

En la **Figura 5.26** se muestra el difractograma obtenido a partir del polvo de la pieza mostrada en la **Figura 5.25 (b)**, donde se observan sólo los patrones correspondientes a la fase buscada,  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ .



**Figura 5.26.** Difractograma de la muestra obtenida luego del proceso de reducción.

Con el objeto de evaluar la homogeneidad de la pieza (en cuanto a su composición cristalográfica), se realizaron estudios de XRD en polvo sobre distintos fragmentos de la misma (dividiéndola en tres partes). Los resultados demostraron la obtención de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  como fase única independientemente del fragmento evaluado. Sobre la base del protocolo definido (15 h de reacción bajo vacío a  $1000^\circ\text{C}$ ) se redujeron todas las piezas porosas obtenidas por congelamiento direccional (**Tabla 5.1**). Debido a que

las estructuras fueron empleadas en la parte final de la Tesis (Capítulo 6) como electrodos (E) para el crecimiento de bacterias electro-activas, las piezas porosas reducidas se denominaron utilizando la siguiente nomenclatura: 'E-espaciado interlaminar ( $\mu$ )', de acuerdo con la distancia interlaminar determinada para cada una (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2**

Estructuras porosas de  $Ti_4O_7$  evaluadas como electrodos para el crecimiento de bacterias electro-activas (Capítulo 6).  $d//$  hace referencia al espaciado interlaminar promedio.

Electrodo	$T_{\text{congelamiento}} (^{\circ}\text{C})$	$v_{\text{inmersión}} (\text{mm/min})$	$d// (\mu)$
E-3	-196	10	$3 \pm 1$
E-4	-196	5	$4 \pm 1$
E-5	-196	3	$5 \pm 1$
E-10	-196	1	$10 \pm 1$
E-12	-70	3	$12 \pm 3$
E-14	-70	1	$14 \pm 3$
E-19	-30	3	$19 \pm 4$
E-27	-30	1	$27 \pm 5$

Respecto de las muestras procesadas utilizando una  $T_{\text{congelamiento}}$  de  $-10^{\circ}\text{C}$ , estas fueron descartadas previamente a la etapa de sinterizado, debido a la imposibilidad de controlar el proceso de separación de fases durante el congelamiento de la dispersión con el *set-up* experimental disponible. En este caso, debido a que el congelamiento procede muy lentamente, no se logra mantener un gradiente de temperaturas estable entre los extremos de la muestra a lo largo de todo el experimento, lo que condujo a inhomogeneidades estructurales en la pieza.

Una vez establecidas las condiciones de procesamiento y de reacción para la preparación de los electrodos laminados, se procedió finalmente a su caracterización.

## 5.5- Caracterización de electrodos de $Ti_4O_7$

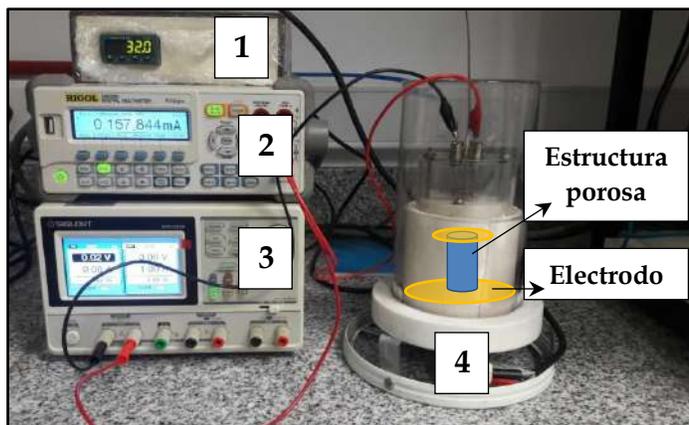
En esta última sección se aborda la caracterización de los electrodos respecto de dos de sus propiedades más importantes para su utilización como ánodos microbianos en aplicaciones bio-electroquímicas: su conductividad eléctrica y su área superficial volumétrica.

### 5.5.1- Determinación de la conductividad eléctrica

Como se mencionó, el  $Ti_4O_7$  presenta mayor conductividad eléctrica que su precursor semiconductor  $TiO_2$ , exhibiendo particularmente conductividad de tipo metálica (su conductividad disminuye con el aumento de la temperatura). Con el objeto de determinar este comportamiento y la resistencia eléctrica

## Capítulo 5

de las estructuras porosas obtenidas, se obtuvieron curvas tensión-corriente ( $V$  vs  $i$ ) para diferentes temperaturas de trabajo. Esto se llevó a cabo empleando un equipamiento como el mostrado en la **Figura 5.27**, el cual consta de un controlador de temperatura (1), un amperímetro (2), una fuente de tensión (3) y una celda de medida termostatzada (4).



**Figura 5.27.** Equipamiento empleado para la caracterización de la resistencia eléctrica de las estructuras porosas de  $Ti_4O_7$ . 1- Controlador de temperatura, 2- Amperímetro, 3- Fuente de tensión, 4- Celda de medida termostatzada. En la imagen se representa, a modo ilustrativo, la disposición de la muestra dentro de la cámara de medida en contacto con electrodos de oro.

Las estructuras de  $Ti_4O_7$  se sometieron a diferencias de potencial variables mediante la utilización de dos electrodos de oro, uno en cada extremo de la muestra. La corriente que circuló a través de la misma para los diferentes potenciales aplicados fue finalmente registrada. Los ensayos se realizaron a diferentes temperaturas para determinar la relación entre la resistencia eléctrica y esta variable. A modo de ejemplo, la **Figura 5.28** muestra los resultados obtenidos para las tres temperaturas evaluadas (30, 35 y 40°C) sobre el electrodo E-10 (1,73 cm de longitud y 0,9 cm de diámetro). La evaluación del material a 30°C fue particularmente seleccionada debido a que se corresponde con las condiciones de trabajo en las que las estructuras de  $Ti_4O_7$  se evaluaron como electrodos para la producción de corriente eléctrica a partir de orina (Capítulo 6).

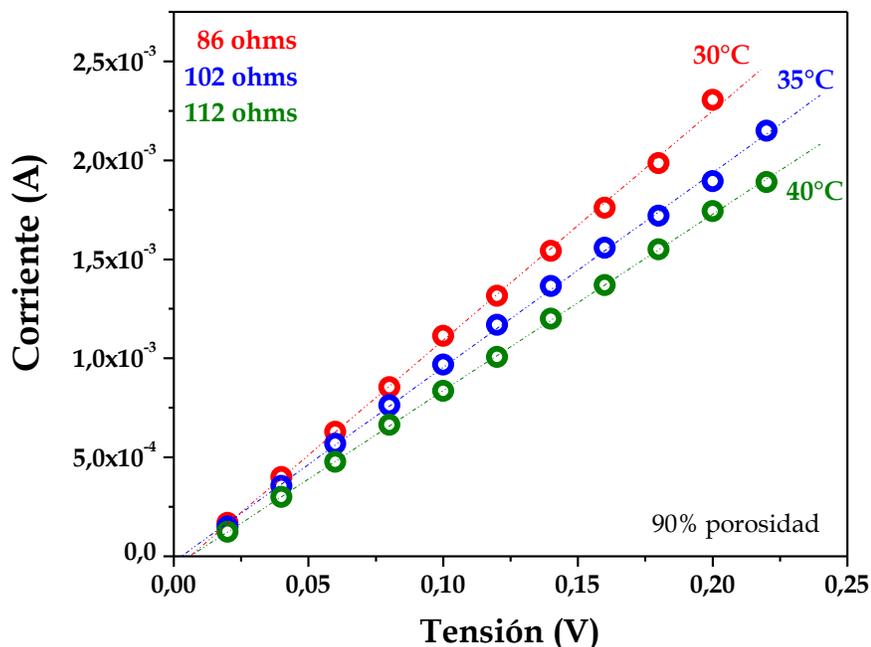


Figura 5.28. Caracterización eléctrica del electrodo E-10 a 30, 35 y 40 °C.

A partir de las pendientes de las rectas fue posible calcular la resistencia eléctrica de la pieza, utilizando la ley de Ohm. Los valores obtenidos fueron 86, 102 y 112  $\Omega$  para las temperaturas de trabajo de 30, 35 y 40 °C, respectivamente. A partir de la relación directa entre la temperatura y la resistencia se verificó efectivamente la naturaleza metálica (en lo referido a sus propiedades de conducción electrónica) de la fase  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  de interés. Las *resistividades efectivas* ( $\rho$ ) calculadas para las estructuras porosas fueron de 31.8  $\Omega\cdot\text{cm}$  (30°C), 37.7  $\Omega\cdot\text{cm}$  (35°C) y 41.4  $\Omega\cdot\text{cm}$  (40°C), de acuerdo con la expresión  $R = \frac{\rho \cdot l}{A}$  para una geometría cilíndrica de longitud  $l$ , área transversal  $A$  y resistencia  $R$ . Los valores obtenidos deben evaluarse, en caso de efectuar comparaciones con otros materiales, teniendo en cuenta el tipo de estructura porosa (láminas equiespaciadas extendidas longitudinalmente en un volumen de muestra con 90% de porosidad). Un aspecto interesante a remarcar radica en la anisotropía detectada en la conducción electrónica, asociada a la anisotropía estructural. Si bien, debido a la imposibilidad de modificar el set-up experimental, no pudieron efectuarse medidas de conductividad transversales a las muestras, sí se llevó a cabo una estimación de la resistencia eléctrica mediante el uso de un multímetro, determinándose valores al menos un orden de magnitud mayores que las medidas obtenidas longitudinalmente.

Es importante mencionar que no se registraron diferencias significativas en el comportamiento eléctrico de los diferentes electrodos evaluados (independientemente de sus espaciados interlaminares), lo que dio soporte adicional a la caracterización de la fase  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  efectuada por XRD.

### 5.5.2- Determinación del área superficial volumétrica

El otro parámetro fundamental en la caracterización de los electrodos preparados, y que depende exclusivamente de las características estructurales de los mismos, es su área superficial volumétrica ( $\text{m}^2/\text{m}^3$ ). Al igual que el espaciado interlaminar mencionado en la Sección 5.4.4 (magnitud con la que se encuentra íntimamente relacionada), el área superficial por unidad de volumen juega un rol central en la optimización de electrodos utilizados para la producción de corriente eléctrica en sistemas bio-electroquímicos.

El área superficial volumétrica se calculó a partir de valores de capacitancia de doble capa eléctrica ( $C_{dl}$ ) obtenidos por voltametría cíclica (CV), de acuerdo con protocolos descritos en bibliografía (Kolbrecka y Przyluski, 1994; Silva Barni et al, 2020). Los cálculos se llevaron a cabo sobre la base de los siguientes conceptos:

- ❖ Las áreas superficiales son proporcionales a los valores de  $C_{dl}$  en solución, ya que  $C_{dl}$  representa una medida de la acumulación de carga iónica sobre la superficie del electrodo (en la interfase electrodo/electrolito). Por lo tanto, determinando  $C_{dl}$  es posible conocer la superficie electroquímicamente activa.
- ❖ La determinación de  $C_{dl}$  puede llevarse a cabo por CV: modificando la velocidad de barrido de potencial, y midiendo la respuesta en corriente (asociada a la migración de especies cargadas hacia la superficie del electrodo) para cada velocidad, es posible conocer  $C_{dl}$ .
- ❖ El área superficial electroquímicamente activa puede determinarse dividiendo  $C_{dl}$  por la capacitancia efectiva ( $C_{efectiva}$ ) del material del electrodo ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ), donde  $C_{efectiva}$  es la capacidad asociada a la polarización propia del material, debido a la separación y acumulación de portadores de carga en la superficie del mismo.
- ❖ La  $C_{efectiva}$  puede determinarse a partir de medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

El protocolo experimental seguido para calcular las áreas superficiales de cada electrodo, de acuerdo con los conceptos enumerados, se detalla en el **Anexo B**.

En la **Tabla 5.3** se resumen los resultados de voltametría obtenidos y las superficies por unidad de volumen calculadas para cada electrodo. Los electrodos mostrados en la tabla son los que se utilizaron finalmente para el crecimiento bacteriano y producción de corriente eléctrica a partir de orina, de acuerdo con los requerimientos experimentales que se detallarán en el próximo capítulo.

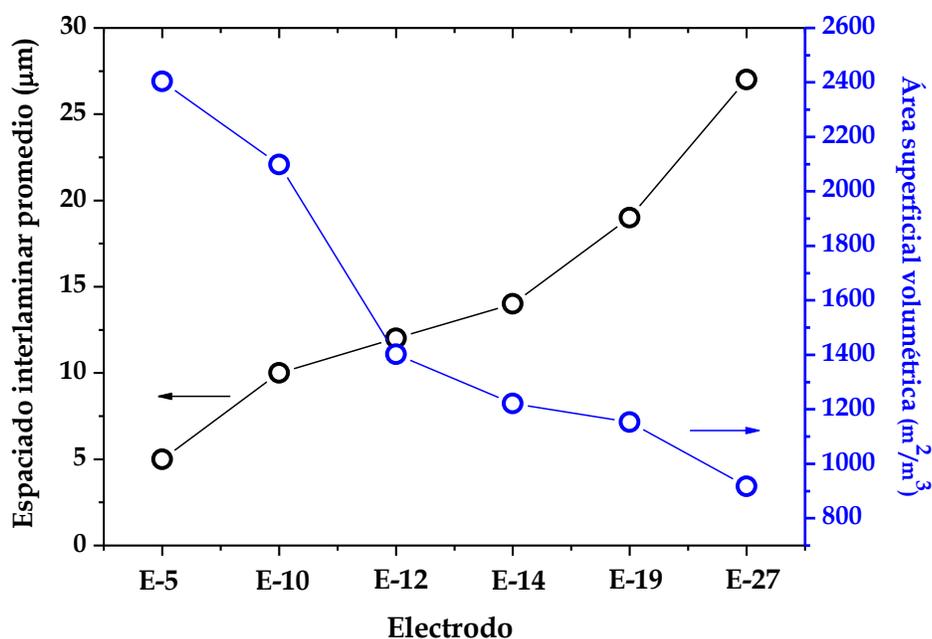
Tabla 5.3

Área superficial de los electrodos laminados evaluados como ánodos microbianos (Capítulo 6)

Electrodo	Volumen (cm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	Capacitancia de doble capa ( $C_{dl}$ ) (F)	Área superficial (cm <sup>2</sup> ) ( $C_{dl}/C_{efectiva}$ )	Área superficial volumétrica (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )
E-5	1.14	0.137	27.4	2404
E-10	0.92	0.0963	19.3	2098
E-12	0.82	0.0575	11.5	1402
E-14	1.13	0.069	13.8	1221
E-19	0.85	0.049	9.8	1153
E-27	1.08	0.0493	9.9	917

<sup>a</sup>Volumen de electrodo sumergido durante el experimento de voltametría.

Como era de esperar, para una porosidad fija (~90% para todos los electrodos), la superficie volumétrica mostró un aumento a medida que disminuyó la distancia interlaminar. La **Figura 5.29** muestra esta relación inversa.



**Figura. 5.29.** Espaciado interlaminar promedio y área superficial volumétrica para cada electrodo evaluado como ánodo microbiano (Capítulo 6).

De acuerdo con los conceptos discutidos en este capítulo, la **Figura 5.29** mostró *a priori* un claro compromiso entre la accesibilidad estructural (dada por el espaciado interlaminar) y la superficie efectiva de cada electrodo, las que fueron tenidas en cuenta simultáneamente a la hora de buscar la mayor colonización bacteriana posible dentro de los electrodos, observándose en la figura un balance

‘adecuado’ de ambos parámetros (accesibilidad/superficie) para electrodos de espaciado interlaminar intermedio. La relevancia de este compromiso estructural será discutida en el siguiente capítulo.

### 5.6.- Conclusiones parciales

En este capítulo se describió la preparación y caracterización de estructuras eléctricamente conductoras de  $Ti_4O_7$  con porosidad unidireccional. A continuación se resumen las principales conclusiones:

- ❖ Es posible preparar dispersiones acuosas estables de NPs de  $TiO_2$  comercial (P25) por combinación con PVP (1.3 MDa), utilizando una relación  $TiO_2/H_2O$  de 0.21 g/mL y PVP/ $H_2O$  de 0.062 g/mL.
- ❖ Es posible estructurar dichas dispersiones mediante la técnica de congelamiento direccional, obteniendo piezas con porosidad anisotrópica (láminas equiespaciadas) a partir del fenómeno de autoensamblado inducido por segregación de hielo.
- ❖ El control de las variables de procesamiento (velocidad de inmersión y temperatura de congelamiento) permite modificar el espaciado interlaminar y la superficie específica por unidad de volumen de las estructuras cerámicas.
- ❖ La reducción bajo vacío de las piezas porosas de  $TiO_2$  sinterizadas, en presencia de zirconio metálico (20 mg Zr/100 mg  $TiO_2$ ), permite obtener la fase buscada para los electrodos:  $Ti_4O_7$ .
- ❖ El tiempo de reducción representa una variable fundamental para la obtención de  $Ti_4O_7$  como fase única.
- ❖ Las estructuras de  $Ti_4O_7$  exhiben un comportamiento de conducción electrónica de tipo metálico, esperado para este óxido conductor.
- ❖ Las estructuras porosas de  $Ti_4O_7$  presentan una relación inversa entre el área superficial volumétrica y el espaciado interlaminar.

Desde el punto de vista estructural, fue posible obtener piezas con elevada porosidad abierta (~90%) distribuida en forma de canales alineados de espaciado variable. La posibilidad de modular el espaciado interlaminar, sin modificar la porosidad total ni las propiedades eléctricas de la muestra, representa una oportunidad para controlar el área electroquímica efectiva por unidad de volumen, de relevancia directa a la hora de utilizar estas estructuras como electrodos. Estas características, sumadas a la probada bio-compatibilidad y estabilidad química de la fase  $Ti_4O_7$ , permitieron utilizar estas estructuras

## Preparación y caracterización de electrodos porosos de $\text{Ti}_4\text{O}_7$

- en presencia de bacterias electro-activas - como electrodos bio-híbridos para la producción de corriente eléctrica a partir de orina humana. Estos conceptos son abordados en el siguiente capítulo.

# Capítulo 6

## Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos porosos de $Ti_4O_7$

*En este capítulo se describe el estudio de la producción de corriente a partir de orina humana mediante la utilización de electrodos laminados de  $Ti_4O_7$  colonizados por bacterias electro-activas, haciendo uso de un método estadístico multivariado - denominado Metodología de la Superficie de Respuesta (RSM) - para la predicción de las condiciones óptimas de concentración de orina y espaciado interlaminar que conducen a la maximización de la corriente por unidad de volumen de ánodo microbiano.*

*La sección introductoria (Sección 6.1) aborda conceptos vinculados a la RSM, describiendo como ésta puede ser utilizada para establecer criterios metodológicos de experimentación que permitan identificar de manera eficiente las condiciones que maximizan la respuesta de interés. Los resultados experimentales se presentan en tres bloques. En el primero (Sección 6.2) se discuten los ensayos realizados para definir caudales de alimentación - flujo de medio de cultivo a través de la estructura laminada de los electrodos - que permiten asegurar un funcionamiento continuo de la celda bio-electroquímica. En la segunda parte (Sección 6.3) se describen los experimentos llevados a cabo - al caudal de alimentación definido - para lograr la colonización microbiana en el interior de los electrodos laminados, vinculando la producción de corriente eléctrica con el espaciado interlaminar y la concentración de orina utilizada. En la última parte (Sección 6.4) se hace uso de la RSM para - a partir de los resultados experimentales obtenidos - construir superficies de densidad volumétrica de corriente anódica (respuesta) en función de la concentración de orina y el espaciado interlaminar (variables independientes) de manera de predecir las condiciones experimentales que maximizan la respuesta bio-electroquímica del sistema.*

## 6.1- Metodología de la superficie de respuesta (RSM)

A partir del estudio de sistemas materiales es posible establecer leyes que permiten describir el funcionamiento de los mismos, es decir, identificar relaciones causales entre los elementos del sistema que permiten vincular sus magnitudes y predecir el comportamiento bajo condiciones definidas. Así, a partir de ciertas hipótesis y expresiones formales, es posible conocer el comportamiento de los objetos de estudio de manera 'razonablemente exacta'. Para esto se suele hacer uso sistemático de modelos, a los que generalmente se denomina **modelos mecanicistas**. Sin embargo, no siempre es posible estudiar sistemas complejos con toda la precisión que se desea. En este caso, el abordaje suele hacerse restringiendo el 'universo' de posibilidades de los elementos o variables del sistema. En este contexto es posible contar con otro tipo de modelos, denominados habitualmente **modelos empíricos o estadísticos**, los que se construyen definiendo ciertas variables bajo control del experimentador que pueden ser modificadas de manera criteriosa (definidas para condiciones específicas) con el fin de obtener - de acuerdo con una aproximación estadística - información útil del comportamiento del sistema, lo que permite *a priori* realizar predicciones capaces de ser validadas experimentalmente.

Los desarrollos vinculados a la construcción de modelos empíricos para describir sistemas complejos desde un punto de vista integral y eficiente fueron abordados formalmente en los trabajos iniciales de Hotelling (1941) y Friedman y Savage (1947). Los conceptos desarrollados por éstos fueron condensados posteriormente (a partir del trabajo de una diversidad de autores) en un marco formal que se denominó *Metodología de la Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés)* (Box y Wilson, 1951; Davis, 1956; Box y Hunter, 1957; Bradley, 1958). A partir de esta metodología es posible, a través de un diseño experimental secuencial y criterioso, modelar variables bajo control (*variables independientes*) para obtener - y este es el aspecto más poderoso del abordaje - una visión global/estadística del sistema que permite predecir valores para la respuesta de interés (*variable dependiente*).

Para esto, la RSM hace uso de una estructura que vincula principios metodológicos de experimentación, a partir de:

1. La exploración y cuantificación de la relación funcional entre la variable dependiente y las variables independientes de las que se tiene control y de las que se presume que depende la respuesta.
2. La determinación, mediante ajuste matemático, de los valores de las variables independientes que conducen al 'mejor valor' de la repuesta de acuerdo con el objetivo perseguido.

## Capítulo 6

3. La predicción de los valores que se espera que tenga la respuesta para un conjunto dado de valores para las variables independientes.

En este marco, la RSM emerge como un conjunto de técnicas estadísticas multivariadas diseñadas para encontrar de manera eficiente el 'mejor valor' de la respuesta bajo estudio, sin la necesidad de evaluar el efecto de cada variable independiente por separado (De Zan, 2006). Esto redundaría en una economía de recursos experimentales y acota los tiempos empleados, a partir del diagrama racional de los ensayos experimentales. Debe mencionarse que no siempre es posible alcanzar los valores 'óptimos' mediante la experimentación, sin embargo, es posible avanzar en el conocimiento global del funcionamiento del sistema y de cómo la respuesta de interés es afectada (por ejemplo, en qué dirección evolucionará) en función de los valores que tomen las variables independientes. Asimismo, y de igual importancia, el conocimiento global del sistema permite obtener información sobre la *región de operabilidad* del mismo, es decir, permite conocer la existencia de límites de operación *a priori* desconocidos por el experimentador.

En el marco de la RSM es pertinente definir conceptos relacionados con el proceso de optimización, introduciendo los siguientes términos (Bezerra et al, 2008):

1. *Dominio experimental*: refiere a los valores máximos y mínimos de las variables independientes bajo estudio.
2. *Diseño experimental o espacio de variables*: refiere al conjunto de experimentos que se realizarán, definido como una matriz constituida por las diferentes combinaciones de valores de las variables independientes exploradas.
3. *Factores*: es la denominación que se da a las variables independientes (por ejemplo, el pH, la temperatura, la concentración de orina y el espaciado interlaminar en nuestro caso, entre otras).
4. *Niveles de un factor*: son los diferentes valores que toma la variable independiente (por ejemplo, 20°C, 30°C y 40°C en el caso del factor *temperatura*).
5. *Respuesta*: es la denominación que se da a la variable dependiente (por ejemplo, la densidad de corriente en nuestro caso), la que se obtiene a partir de los resultados del experimento y/o se predice a partir del ajuste matemático de los mismos.

Esta terminología se utilizará a lo largo de este capítulo para abordar el estudio estadístico de la producción de corriente eléctrica mediante la RSM.

### 6.1.1 - Fases secuenciales de la experimentación

La estrategia experimental y de análisis de la RSM se basa en el supuesto de que la respuesta de interés es una función  $y$  del conjunto de variables independientes del diseño experimental  $(x_1, x_2, \dots, x_k)$ , y que dicha función puede ser aproximada en alguna región del espacio de variables por un polinomio de primer o segundo orden (Montoya et al, 2019). En la práctica este supuesto es razonable si la respuesta buscada es continua y suave. Sin embargo, aunque este no fuera el caso, la respuesta podría de todas maneras describirse (ajustarse) con un polinomio de bajo orden si se escoge una región experimental lo suficientemente pequeña. Para avanzar en la búsqueda de la función que representará la respuesta, la RSM aborda una **estrategia secuencial de experimentación**, a partir de la cual se define una sucesión de experimentos controlados (cada uno con un diseño experimental definido) con el objeto de adquirir cada vez más información del sistema. Esta estrategia experimental suele dividirse en tres grandes fases (Box y Draper, 1987; Myers y Montgomery, 2002):

1. **Fase de exploración**, la cual permite conocer - a través de estudios preliminares - los factores que ejercen un efecto relevante sobre la respuesta de interés, de manera que su inclusión en la función matemática de ajuste sea necesaria y significativa.
2. **Fase de diseño experimental y modelado** de los resultados obtenidos, en la cual, a partir de los factores más relevantes identificados, se diagrama el diseño a emplear (matriz que contempla los niveles a evaluar) y se ajustan - mediante polinomios de primer orden u orden superior - los resultados experimentales, dando lugar a una superficie de respuesta.
3. **Fase de identificación** de los valores óptimos observados a partir de la superficie de respuesta, y su posterior **validación** mediante la predicción del comportamiento del sistema y su contraste con nuevas medidas experimentales.

Debido a que en un sistema complejo suelen influir numerosas variables en la respuesta final, las cuales son prácticamente imposibles de identificar y controlar simultáneamente, la fase de exploración inicial se convierte en una etapa fundamental para seleccionar aquellos factores que repercutan significativamente sobre el valor de la misma.

Una vez identificados dichos factores, debe definirse el conjunto de combinaciones de sus niveles que se evaluarán experimentalmente, de manera de contar con resultados que - sin haber abarcado una gran cantidad de experimentos - permitan determinar tendencias iniciales para decidir el tipo de polinomio de ajuste que se va a utilizar. La idea central al respecto radica en llevar a cabo los experimentos considerando la posible superposición de efectos que tuvieran los factores considerados,

como así también contemplar, durante el tratamiento de los resultados, funciones que puedan vincular los factores bajo estudio (por ejemplo, la inclusión de términos cuadráticos entre factores). Esta forma de abordar los diseños experimentales es la que distingue conceptualmente a la RSM de los diseños ‘tradicionales’ en los que se evalúa el efecto de ‘un factor a la vez’ sobre la respuesta.

Para avanzar luego en el marco de la RSM habrá que definir la estructura que tendrá el polinomio de ajuste. Para esto, deberá decidirse de antemano la cantidad de niveles que se asignará a cada factor, de manera tal que las conclusiones que puedan extraerse del modelo final validado sean las ‘mejores’ o, al menos, las ‘más confiables’ desde un punto de vista estadístico para la predicción de nuevos valores de respuesta. Generalmente suele haber dos enfoques al respecto: (i) asignar dos niveles a cada factor, o (ii) asignar más de dos niveles. Debido a que el número de experimentos a realizar para un número  $k$  de factores, cada uno de ellos con un número  $n$  de niveles distintos, es  $n^k$ , los diseños factoriales de dos niveles suelen ser los más utilizados. Estos son sencillos de construir, analizar e interpretar, a la vez que proporcionan una excelente relación entre el esfuerzo realizado y la información obtenida (Myers et al, 2004).

Como se mencionó, dentro de los diseños experimentales, los de tipo factorial son los más comúnmente utilizados, ya sean modelos lineales o cuadráticos. Los **modelos lineales** son los más sencillos que pueden aplicarse en la RSM. Como su nombre lo indica, se basan en el ajuste de los resultados obtenidos con una función lineal del tipo:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k (\beta_i x_i) + \varepsilon \quad \text{Ecuación 6.1}$$

donde  $k$  representa el número de factores,  $\beta_0$  es un término constante,  $\beta_i$  representa los coeficientes de la expansión lineal,  $x_i$  identifica cada uno de los factores bajo estudio,  $\varepsilon$  es el residual asociado a los experimentos, e  $y$  representa la respuesta a ajustar. Este modelo sólo puede utilizarse cuando, de acuerdo con la fase de exploración inicial, la respuesta no muestre curvatura en su comportamiento, es decir, cuando no exista tendencia a un máximo, mínimo o punto de ensilladura (denominados ‘puntos críticos’) en el conjunto de valores de respuesta obtenido.

En el caso que la respuesta muestre curvatura en relación con los niveles explorados, debe utilizarse un **modelo de segundo orden**. En este caso es posible extender el polinomio lineal con términos adicionales, de manera de contemplar además la posible interacción entre las variables experimentales, de acuerdo con:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k (\beta_i x_i) + \sum_{i=1}^k (\beta_{ii} x_i^2) + \sum_{1 \leq i < j}^k (\beta_{ij} x_i x_j) + \varepsilon \quad \text{Ecuación 6.2}$$

donde  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  representan ahora los coeficientes de ajuste de los términos cuadráticos. En este caso, para estimar los parámetros de la **Ecuación 6.2**, el diseño experimental debe asegurar al menos tres niveles para cada una de los factores estudiados.

Si bien existen otros diseños experimentales y modelos de segundo orden más complejos (por ejemplo, el denominado diseño factorial de Box-Behnken (Ferreira et al, 2007) o el diseño de Doehlert (Araujo y Janagap, 2021; Ferreira Mata Cerqueira et al, 2021), entre otros) que difieren entre sí respecto de la selección y ubicación de los puntos experimentales en el espacio de variables, así como también en el número de niveles de los factores que emplean; en esta Tesis se utilizará - en función de las variables independientes a estudiar (Secciones 6.3 y 6.4) - un modelo cuadrático tradicional (con interacción entre variables), de manera de acotar el tratamiento de los datos, sin incurrir por esto en sobre-simplificaciones del sistema.

### 6.1.2 - Codificación de los niveles de las variables

La codificación de los niveles consiste en transformar cada valor real de las variables independientes en coordenadas en una escala adimensional arbitraria, lo que asegura la variación de dichas coordenadas entre -1 y 1 y permite efectuar además una comparación válida entre los diferentes coeficientes del polinomio usado para el ajuste de los resultados (coeficientes  $\beta$  en las **Ecuaciones 6.1 y 6.2**). Esto facilita el procesamiento de los datos y la comparación de factores que puedan llegar a tomar valores muy diferentes entre sí (diferentes órdenes de magnitud). Para la transformación se utiliza generalmente la siguiente expresión (Bezerra et al, 2008):

$$\bar{z}_i = \left( \frac{z_i - z_{i,\min} - z_{i,hw}}{z_{i,hw}} \right) \quad \text{Ecuación 6.3}$$

donde  $z_i$  representa el valor real de cada una de las variables independientes  $i$  evaluadas,  $z_{i,\min}$  es el mínimo valor explorado y  $z_{i,hw}$  es el valor medio de los valores extremos evaluados  $\left(\frac{z_{i,\max} - z_{i,\min}}{2}\right)$ . De esta forma,  $\bar{z}_i$  representa el valor normalizado (codificado) en la escala adimensional ( $-1 \leq \bar{z}_i \leq 1$ ).

Una vez codificadas las variables, éstas se utilizan para definir el diseño experimental, además de emplearse en los modelos de ajuste (coeficientes  $x$  en las **Ecuaciones 6.1 y 6.2**) de los resultados experimentales.

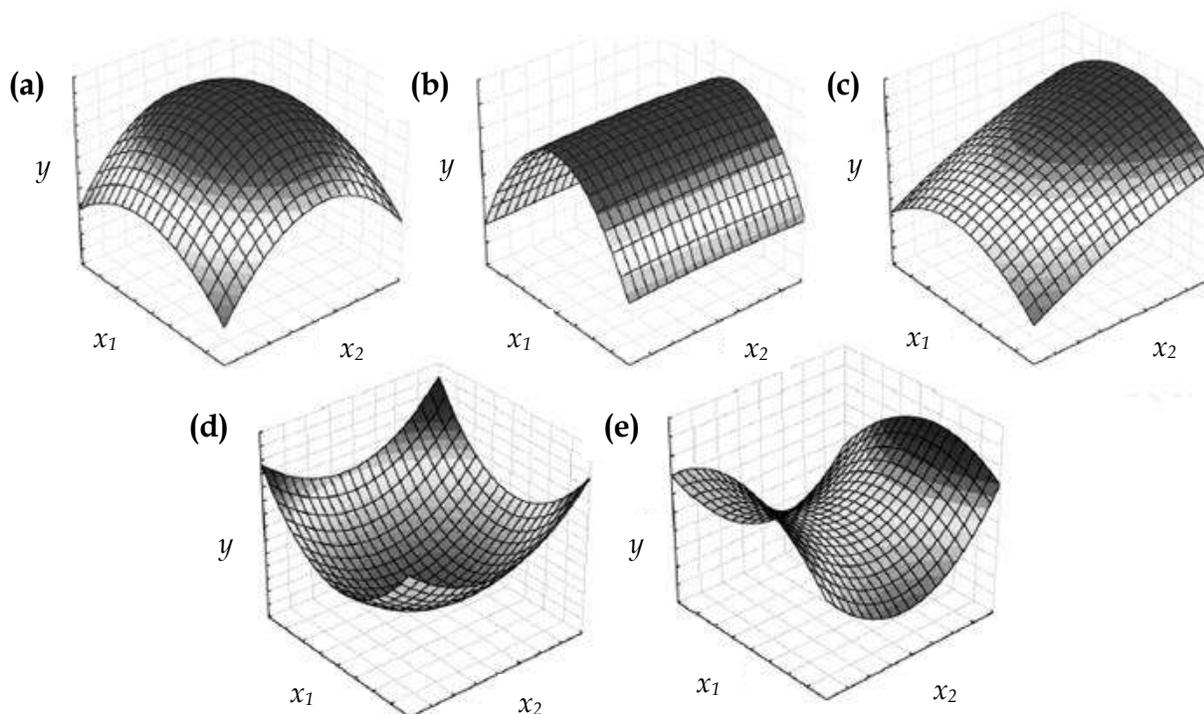
### 6.1.3 - Optimización de la respuesta

Una vez obtenidos los resultados de cada experimento de acuerdo con el diseño diagramado, es necesario ajustarlos con el polinomio seleccionado (de donde se obtendrán, mediante regresión lineal, los coeficientes  $\beta$  que minimicen el error de ajuste), de manera de describir el comportamiento de la respuesta de interés en función de los niveles de los factores evaluados. La representación gráfica de la función matemática de ajuste conduce a la generación de una **superficie de respuesta**, que permite visualizar de manera directa el comportamiento de la variable dependiente en el dominio experimental evaluado.

En el caso de utilizar *polinomios lineales*, esto permite visualizar rápidamente *tendencias* de la respuesta hacia alguna dirección particular del diseño experimental, lo que es extremadamente útil para proponer modificaciones experimentales que permitan ‘desplazarse’ sobre la superficie hacia las condiciones óptimas buscadas. En este contexto surge otro aspecto destacable de la RSM. Si, por ejemplo, la región de variables independientes exploradas no pudiera ser modificada (por razones físicas y/o instrumentales), la superficie de respuesta obtenida puede igualmente ser utilizada para encontrar - por simple inspección visual - la mejor condición operativa dentro del rango experimental abordado. Por otro lado, en el caso de utilizar *polinomios cuadráticos*, la presencia de puntos críticos sobre la superficie puede visualizarse, como se mencionó, ya sea mediante la aparición de máximos, mínimos o puntos de ensilladura, caso en el cual la RSM puede utilizarse para calcular las coordenadas de dichos puntos a partir de la primera derivada (igualada a cero) de la función de ajuste. En la **Figura 6.1** se representan algunas superficies de respuesta generadas a partir de modelos cuadráticos para el caso particular de un proceso de optimización de *dos* variables independientes (Bezerra et al, 2008).

El procedimiento descrito es fácil de implementar cuando se desea optimizar una sola respuesta. Sin embargo, la RSM puede tornarse más compleja - aunque aun así igualmente útil - cuando se emprende el desafío de optimizar más de una variable dependiente. En este último caso se suele adoptar, una vez obtenidas las superficies de respuesta para cada variable dependiente, un protocolo de inspección visual, siempre y cuando el número de respuestas a analizar no sea muy grande (dos o tres). La estrategia adoptada en este caso consiste en superponer las superficies para visualizar geoméricamente los puntos críticos asociados a cada superficie y la posible superposición de los mismos en el espacio de variables estudiado. Es importante mencionar que, en caso en que los valores óptimos de cada respuesta no se localicen en la misma región experimental, el procedimiento de optimización simultáneo será difícil de abordar. Para estos casos existen a su vez aproximaciones

basadas en las llamadas *metodologías multi-criterio*, que hacen uso de funciones especiales, como la función de Derringer (o función de deseabilidad) (Murphy et al, 2005); sin embargo, éstas escapan al alcance del uso de la RSM que se dará en esta Tesis.



**Figura 6.1.** Superficies obtenidas a partir del ajuste de resultados experimentales para una respuesta de interés genérica (eje  $y$ ) con un polinomio cuadrático dependiente de las variables experimentales bajo control ( $x_1$  y  $x_2$ ). Las superficies muestran los casos de **(a)** un máximo en la respuesta, **(b)** un *plateau* (lo que en este ejemplo permite visualizar que la respuesta es independiente de la variable  $x_2$ ), **(c)** un máximo fuera de la región experimental evaluada, **(d)** un mínimo, y **(e)** un punto de ensilladura. La figura fue adaptada de la referencia Bezerra et al, 2008.

En el contexto descrito, y de acuerdo con las ventajas asociadas a la RSM frente a las aproximaciones de optimización clásicas de tipo ‘un parámetro a la vez’, esta técnica estadística constituye hoy día una estrategia ampliamente difundida y consolidada en áreas tan diversas como la química analítica, la industria electrónica y la microbiología (Texeira Tarley et al, 2009; Almeida et al., 2017; Díaz et al, 2017). Esto se debe principalmente a la cantidad de información que es posible procesar a partir de un número acotado de experimentos y a la posibilidad de evaluar simultáneamente el efecto de interacción entre variables bajo estudio, así como sus consecuencias sobre la respuesta de interés partiendo de una estructura experimental racionalmente diseñada. Sin embargo, y llamativamente, *la RSM no ha sido utilizada de manera habitual y extendida en estudios de optimización de dispositivos en el área bio-electroquímica*, evidenciando un nicho potencial en un área interdisciplinaria y compleja que involucra

## Capítulo 6

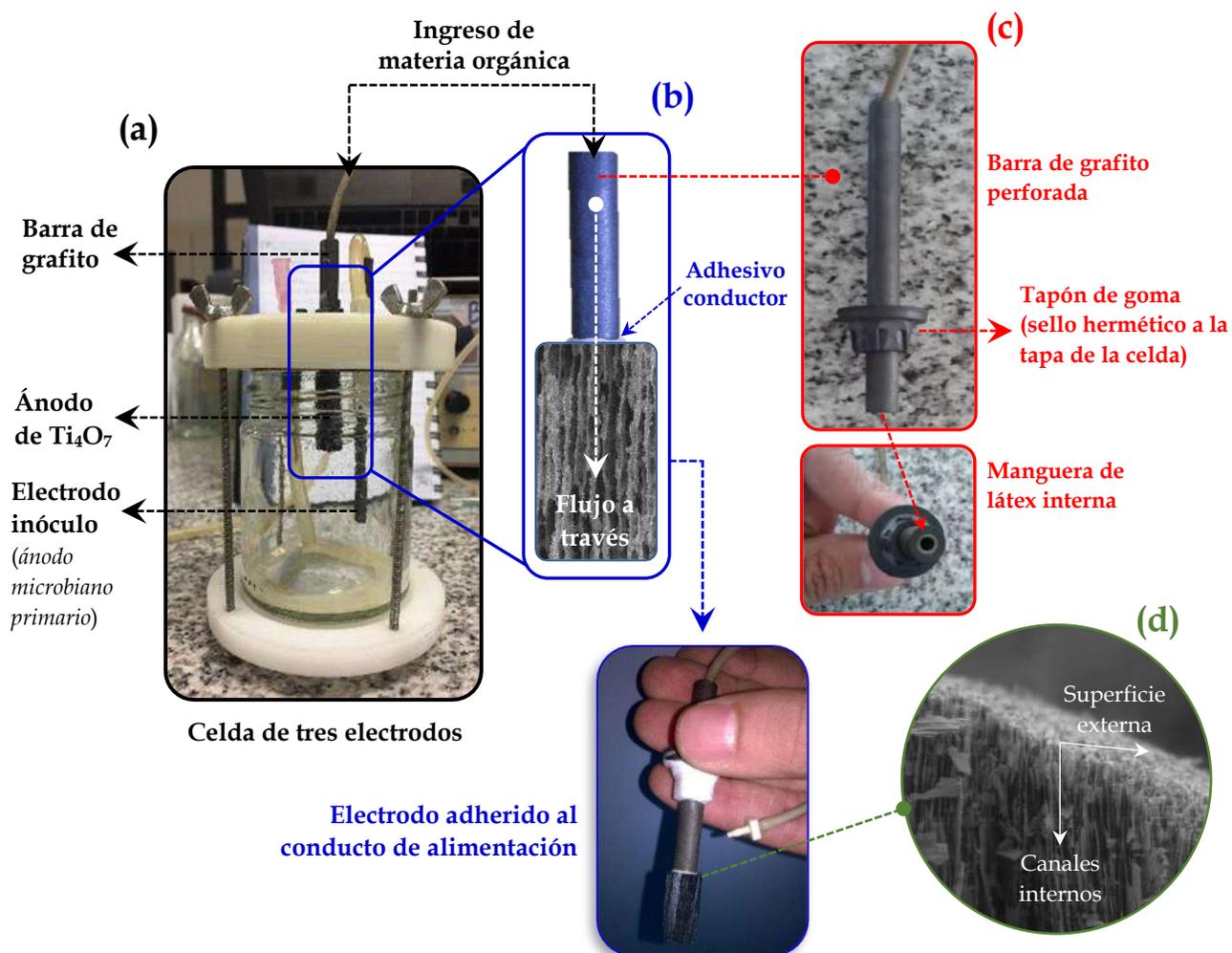
una multiplicidad de variables independientes y de respuestas susceptibles a estudio. En este contexto, la aplicación de la RSM al proceso de producción microbológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos laminados de  $Ti_4O_7$  aparece como una oportunidad valiosa para - a partir de un diseño experimental definido - predecir las condiciones óptimas de concentración de orina y espaciado interlaminar de electrodo (tomadas como variables independientes) que conduzcan a la maximización de la corriente producida por unidad de volumen de ánodo microbiano (respuesta). Este objetivo representa al respecto una de las contribuciones del trabajo de Tesis al área de la Ciencia de Materiales.

En este capítulo se describen inicialmente las actividades realizadas para construir un diseño experimental adecuado para abordar, dentro del marco de la RSM, la producción de corriente eléctrica a partir de los sistemas bio-híbridos desarrollados. Se detalla desde la búsqueda de las condiciones de operación de la celda bio-electroquímica que garantizan el funcionamiento continuo y estable del sistema (bajo una modalidad de flujo a través de los electrodos), hasta los estudios de colonización de microorganismos electro-activos en el interior de los electrodos laminados. Será necesario para esto retomar los conceptos y protocolos abordados en el Capítulo 4, vinculando la corriente producida con la concentración de orina utilizada. Para extender el análisis al efecto producido por el espaciado interlaminar sobre la corriente, será de utilidad además tener presente los aspectos descritos en el Capítulo 5, donde se demostró la capacidad de controlar el espaciado interlaminar en las estructuras de  $Ti_4O_7$ , lo que permite modificar dos características clave de los electrodos: (i) la cantidad de superficie disponible para el crecimiento bacteriano (a menor espaciado, mayor superficie por unidad de volumen de electrodo), y (ii) la accesibilidad de los microorganismos y de la materia orgánica al interior de los electrodos (a menor espaciado interlaminar, menor accesibilidad).

La combinación de los conceptos desarrollados en los dos capítulos previos permitirá simplificar de manera sistemática la interpretación de los resultados de producción de corriente en el marco de la RSM, ya que la densidad de corriente es proporcional a la cantidad de bacterias electro-activas por unidad de volumen de electrodo (Massazza et al, 2018), la que depende en última instancia de la superficie específica y de la accesibilidad al interior de los electrodos para cada concentración de orina empleada.

## 6.2 - Determinación de las condiciones de operación de la celda

Como etapa previa a los estudios de generación de corriente a partir de orina, se realizaron ensayos para determinar los *caudales de alimentación capaces de garantizar el funcionamiento continuo de la celda bioelectroquímica bajo una modalidad de dosificación de materia orgánica a través de la estructura laminada de los electrodos*. Para esto, los electrodos de  $Ti_4O_7$  preparados fueron colocados en celdas de tres electrodos idénticas a las empleadas en los ensayos presentados en el Capítulo 4, sumergiendo en todos los casos 1 cm de electrodo poroso en el medio de cultivo (lo que representa un volumen sumergido de  $0.64 \text{ cm}^3$ , considerando un diámetro de 0.9 cm). Todos los ensayos de caudal se realizaron empleando Syntho como único medio de alimentación. Se utilizó una barra de grafito colonizada con microorganismos electro-activos (ánodo microbiano primario) como inóculo de la celda (de manera análoga a la presentada en la Sección 4.5, Capítulo 4). Para posibilitar la alimentación continua a través de la estructura laminada, los electrodos fueron adheridos (utilizando un adhesivo conductor) a una barra de grafito perforada longitudinalmente, la que se empleó como conducto de alimentación y como conector eléctrico (permitiendo la conexión del electrodo laminado al potencióstato para su polarización a  $0.2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ). Se evaluaron cuatro condiciones de alimentación diferentes: (i) *batch* (sin circulación de medio de cultivo a través de los electrodos, como *sistema control*), (ii) caudal de  $3 \text{ mL/h}$ , (iii)  $6 \text{ mL/h}$ , y (iv)  $8 \text{ mL/h}$ . La densidad de corriente producida se monitoreó en el tiempo mediante cronoamperometría. La **Figura 6.2** muestra los detalles de la configuración utilizada.

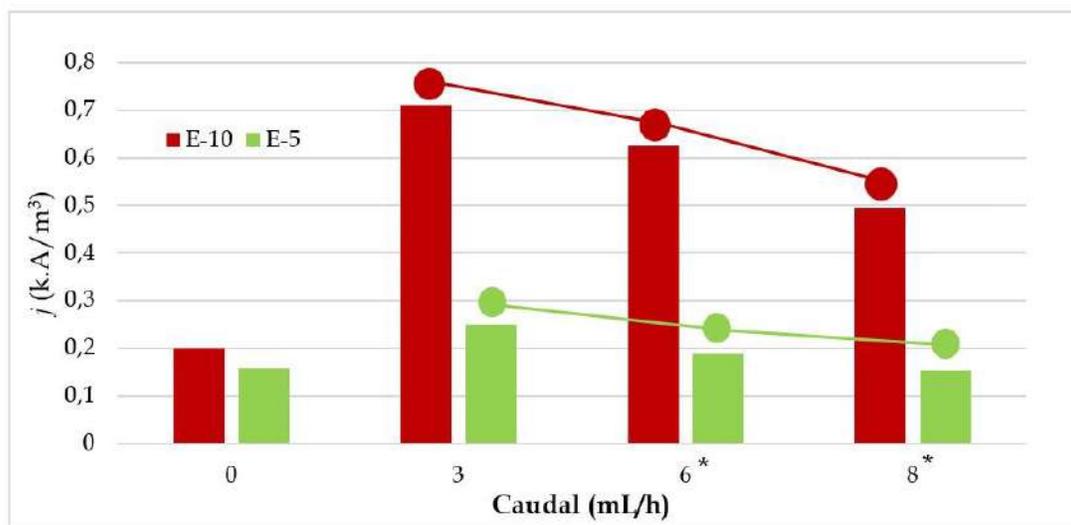


**Figura 6.2.** Configuración utilizada para los ensayos bio-electroquímicos con flujo de materia orgánica a través de los electrodos porosos: **(a)** celda de tres electrodos (se indica el ánodo de  $Ti_4O_7$ , el electrodo utilizado como inóculo y el ingreso direccionado de medio de cultivo mediante el uso de una barra de grafito perforada), **(b)** esquema del flujo a través del ánodo laminado, **(c)** detalle de la barra de grafito perforada utilizada como conector eléctrico y conducto de alimentación, **(d)** imagen SEM de un corte longitudinal de un electrodo poroso (se observa la superficie externa y los canales de la estructura interna a través de los cuales circuló el medio de alimentación).

De acuerdo con los espaciados interlaminares determinados para los electrodos (Tabla 5.2, Capítulo 5) se decidió realizar los ensayos de caudal utilizando aquellos con menor espaciado (procesados en nitrógeno líquido), con el objeto de evidenciar posibles limitaciones al flujo asociadas a las estructuras más ‘cerradas’, bajo la suposición de que un flujo continuo a través de las mismas garantizaría entonces el flujo a través de las estructuras más abiertas. Utilizando la nomenclatura empleada en el Capítulo 5 para denotar a los electrodos, se decidió evaluar en primera instancia los electrodos E-3 y E-10, cuyos espaciados se encuentran en los extremos de los obtenidos con nitrógeno líquido. A fin de contar con un espaciado intermedio, se evaluó además el electrodo E-5.

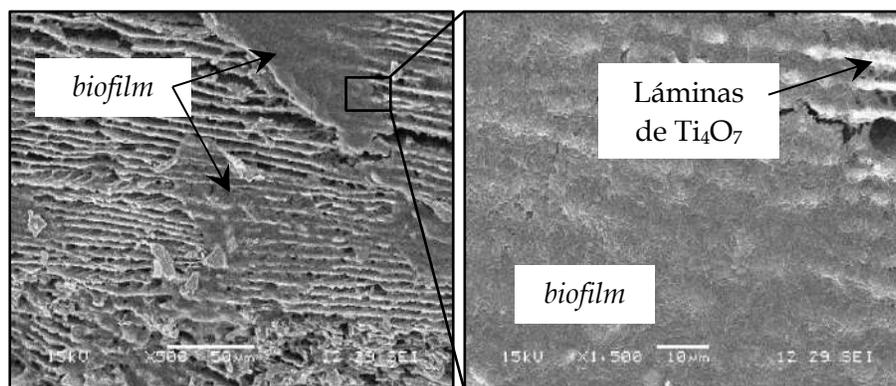
Si bien todos los electrodos seleccionados pudieron evaluarse en la modalidad *batch* (todos arrojaron valores de corriente estable), la imposibilidad de circular el líquido de alimentación a través de la estructura del electrodo E-3 (aún para los caudales más bajos utilizados) hizo que éste fuera descartado como posible electrodo de trabajo para los fines de esta Tesis. Asimismo, teniendo en cuenta el tamaño bacteriano promedio (1.5-2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, considerando una morfología cilíndrica típica para bacilos), los espaciados interlaminares más pequeños a dicho tamaño celular excluirían también la posibilidad de ingreso y proliferación de microorganismos en el interior de los electrodos. En consecuencia, los resultados del estudio de caudal que se presentarán corresponden exclusivamente a los obtenidos para los electrodos E-5 y E-10.

En cada caso se comenzó evaluando la producción de corriente bajo la modalidad *batch*, para, luego de alcanzar la estabilización de la corriente (7-10 días), iniciar el flujo de medio de cultivo a través de las estructuras laminadas. Los caudales de alimentación se incrementaron progresivamente luego de la estabilización de corriente en cada condición evaluada. Se realizaron mediciones de caudal a la salida de la celda, de manera de evaluar su estabilidad en el tiempo. La **Figura 6.3** muestra los valores de densidad volumétrica de corriente promedio obtenidos (en  $\text{kA}/\text{m}^3$ , tomando como referencia el volumen sumergido de ánodo microbiano) para los electrodos mencionados.



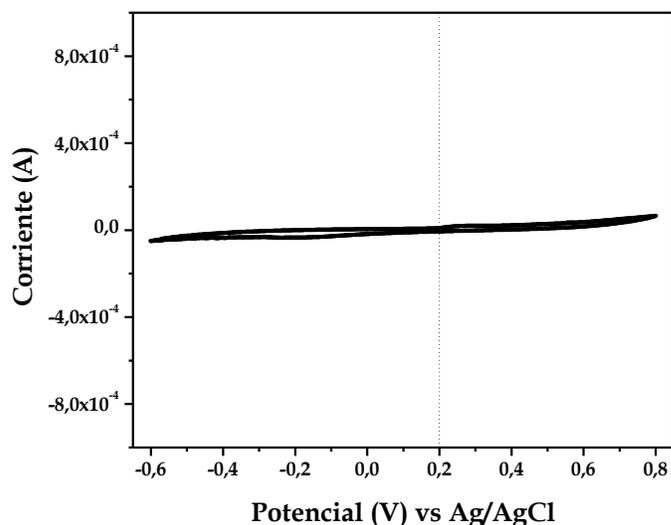
**Figura 6.3.** Efecto del caudal de alimentación sobre la densidad volumétrica de corriente ( $j$ ) para ánodos microbianos con diferente espaciado interlaminar. Un caudal de 0 mL/h corresponde a la condición en *batch*. 6\* y 8\* mL/h representan los caudales al comienzo del experimento.

El primer efecto observado fue la generación de una densidad de corriente similar para los dos electrodos cuando se utilizó la modalidad *batch* (independientemente de su espaciado interlaminar), lo que podría asociarse a una falta de aprovechamiento de la superficie interna de los mismos. Con la utilización de flujo de materia orgánica a través de los electrodos a 3 mL/h, se observó no sólo un incremento en la densidad de corriente en ambos casos (respecto de los sistemas en *batch*), sino también la diferenciación en la respuesta de los electrodos porosos, con un aumento considerablemente más marcado para el electrodo de estructura más abierta (E-10). El aumento en la densidad de corriente mostrado en ambos casos puso en evidencia el efecto positivo que produce la circulación del medio de alimentación a través de las estructuras laminadas, relacionándose con la presencia de microorganismos electro-activos en el interior de los electrodos. Esto fue confirmado por observación mediante microscopía SEM (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Micrografías SEM de la estructura interna de un electrodo E-5 alimentado con Syntho a un caudal de 3 mL/h.

Asimismo, es importante destacar que los ensayos de voltametría cíclica realizados para los sistemas en ausencia de microorganismos (electrodo poroso + Syntho) no mostraron señal *faradaica* al potencial de trabajo (Figura 6.5), lo que permitió corroborar que *la corriente generada no se debió a procesos abióticos de oxidación* de los compuestos presentes en Syntho, sino a mecanismos mediados efectivamente por bacterias electro-activas. Este estudio permitió además demostrar la estabilidad del material del electrodo ( $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ) - es decir, ausencia de procesos *redox* asociados a la fase cerámica - al potencial de polarización utilizado en los ensayos de cronoamperometría.



**Figura 6.5.** Voltagrama correspondiente a un electrodo E-5 en Syntho en condiciones abióticas. Velocidad de barrido de potencial: 10 mV/s. Se indica (línea punteada) el potencial de polarización de los electrodos durante los estudios de cronoamperometría.

De acuerdo con la **Figura 6.3** (líneas de tendencia), luego del aumento inicial observado en la densidad de corriente al utilizar flujo a través a un caudal de 3 mL/h, se registró una caída continua de la misma cuando se evaluaron los caudales más elevados. De acuerdo con estudios previos del grupo de trabajo (Massazza et al, 2015), la caída en la corriente con el aumento de la cantidad de materia orgánica suministrada podría correlacionarse con el incremento en la cantidad de microorganismos totales (electro-activos y no electro-activos) desarrollados en el interior de los electrodos. Así, el incremento de la biomasa que conduce inicialmente al aumento de la corriente, conlleva progresivamente a una disminución del volumen libre de circulación a través de los electrodos, lo que provoca una disminución en el ingreso de medio de alimentación a la celda a medida que transcurre el ensayo. Esto fue comprobado a partir de una caída marcada en los caudales medidos a la salida de las celdas, obteniéndose sólo caudales estables entre 2 y 3 mL/h para el funcionamiento continuo de la misma. Esto puso en evidencia el compromiso que existe entre la cantidad de microorganismos electro-activos por unidad de volumen de electrodo y la libre circulación de materia orgánica en el interior de las estructuras porosas para el correcto funcionamiento de los sistemas bio-electroquímicos estudiados.

La oclusión progresiva de las estructuras porosas condujo a la caída de su desempeño bio-electroquímico, generando al final del ensayo para el electrodo E-5 densidades de corriente aún más bajas que las correspondientes al sistema en *batch* (**Figura 6.3**). Si bien esto podría resultar *a priori* llamativo - ya que se esperaría que el sistema produzca *al menos* la misma cantidad de corriente que la registrada en *batch* - debe recordarse que los electrodos porosos se utilizaron como ingreso de medio de

cultivo a la celda, de manera que la obstrucción de los mismos condujo a la disminución del contenido total de materia orgánica en la celda.

De acuerdo con los objetivos de la Tesis, se podría pensar en la utilización de caudales de alimentación 'elevados' (en nuestro caso, 6-8 mL/h) desde el comienzo de los ensayos de aclimatación secuencial (EAS) en presencia de orina, buscando un mayor ingreso inicial de materia orgánica a través de los electrodos y un incremento marcado de la corriente generada. Sin embargo, de acuerdo con los experimentos mostrados en esta sección, esto podría conducir a un rápido crecimiento de microorganismos en el interior de los electrodos, imponiendo limitaciones al transporte desde las primeras etapas de alimentación (bajas concentraciones de orina), disminuyendo además el rendimiento del sistema a largo plazo. Debido a que uno de los objetivos troncales en esta Tesis es aprovechar el potencial energético de la orina mediante el uso de la mayor concentración posible, se decidió avanzar - para los EAS - utilizando caudales de alimentación 'bajos' (3 mL/h), de manera de poder evaluar la relación entre la corriente y el espaciado interlaminar sin que se produzca la rápida obstrucción de la estructura laminada, buscando extender el rango de concentraciones a todo el régimen libre de inhibición (hasta 20% orina, de acuerdo con los ensayos mostrados en la Sección 4.6, Capítulo 4). En este marco, la hipótesis planteada es que *la utilización de bajos caudales de alimentación permite operar el sistema de manera continua en condiciones donde la densidad de corriente está controlada por la concentración de orina utilizada y la arquitectura de los electrodos (accesibilidad y superficie específica)*. Así, circunscribiendo el funcionamiento del sistema a estas condiciones de operación, sería posible evaluar el efecto de ambas variables (concentración de orina y espaciado interlaminar) como los factores de los que depende la respuesta de interés (densidad volumétrica de corriente) dentro del marco de la metodología de la superficie de respuesta (RSM).

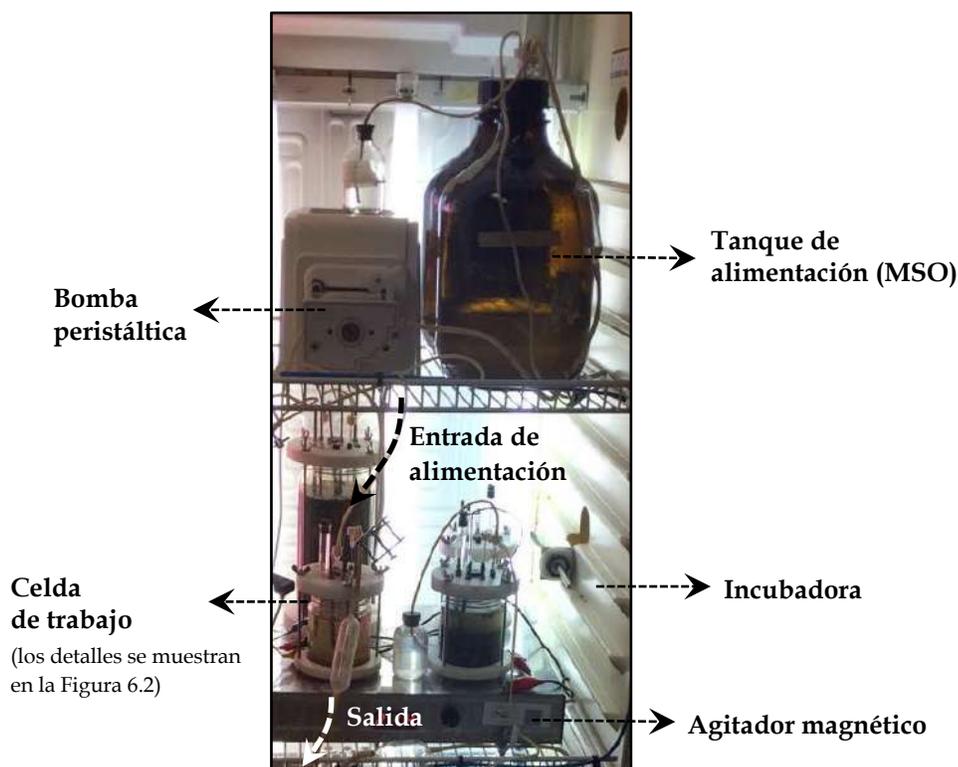
La relación entre el espaciado interlaminar, la concentración de orina y la corriente generada es discutida en la siguiente sección.

### **6.3 - Espaciado interlaminar y producción de corriente a partir de orina: fase de exploración experimental**

La evaluación del efecto del espaciado interlaminar sobre la densidad volumétrica de corriente - para las distintas concentraciones de orina utilizadas - se llevó cabo empleando nuevamente celdas de tres electrodos bajo la misma metodología de alimentación (flujo a través) y al caudal de alimentación seleccionado (3 mL/h) de acuerdo con los resultados de la Sección 6.2. Para estos estudios se utilizaron

mezclas Syntho/orina (MSO) como medio de cultivo, dentro del rango de concentraciones donde la población microbiana se encuentra libre de inhibición (0-20% en volumen, Sección 4.6, Capítulo 4).

La **Figura 6.6** muestra una fotografía de la disposición de la celda de trabajo y del medio de alimentación dentro de la incubadora utilizada para mantener la temperatura del sistema ( $30^{\circ}C$ ).



**Figura 6.6.** Disposición del tanque de alimentación y la celda de tres electrodos (‘aguas abajo’) dentro de la incubadora vertical.

Con el objeto de establecer un diseño experimental adecuado, de acuerdo con la RSM, se decidió iniciar una *fase de exploración* para identificar el comportamiento de la respuesta del sistema (densidad de corriente) en función de los distintos valores de espaciado interlaminar ( $d_{//}$ ) y concentración de orina ([orina]). Se decidió emplear inicialmente electrodos E-5 y E-10 y electrodos preparados a una temperatura de fuente fría de  $-30^{\circ}C$  (E-19 y E-27, Tabla 5.2, Capítulo 5), a fin de contar en el diseño experimental con valores ‘extremos’ de espaciado interlaminar.

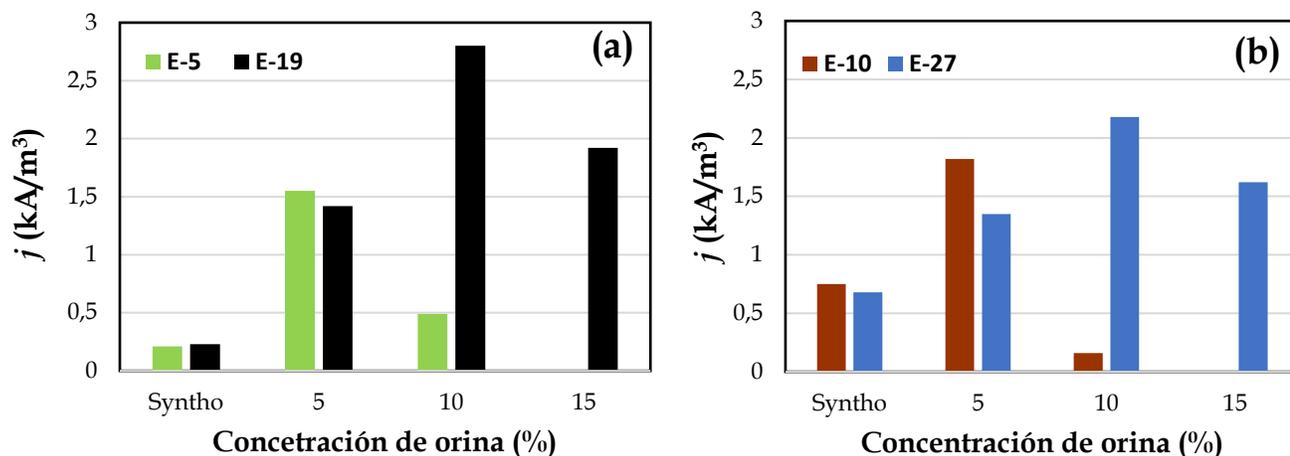
La **Tabla 6.1** muestra el diseño experimental inicial abordado (matriz constituida por la combinación de los niveles evaluados) y las densidades de corriente obtenidas por unidad de volumen de ánodo microbiano (determinadas en cada caso en condiciones estacionarias).

**Tabla 6.1**

Diseño experimental *exploratorio* y densidad volumétrica de corriente para los ensayos realizados con los electrodos E-5, E-10, E-19 y E-27. [orina] = 0% corresponde a 100% Syntho. Los códigos de color de los electrodos se replican en los gráficos de barras mostrados más adelante en este capítulo.

Electrodo	$d_{//}$ ( $\mu\text{m}$ )	[orina] (%v/v)	$j$ ( $\frac{\text{kA}}{\text{m}^3}$ )
E-5	5	0	0.21
E-5	5	5	1.55
E-5	5	10	0.49
E-5	5	15	(-)
E-10	10	0	0.75
E-10	10	5	1.82
E-10	10	10	0.16
E-10	10	15	(-)
E-19	19	0	0.23
E-19	19	5	1.42
E-19	19	10	2.80
E-19	19	15	1.92
E-27	27	0	0.68
E-27	27	5	1.35
E-27	27	10	2.18
E-27	27	15	1.62

Con el fin de visualizar claramente las diferencias obtenidas, se graficaron los resultados de cada ensayo para cada par de electrodos procesados a la misma velocidad de congelamiento direccional (electrodos E-5 y E-19 por un lado, y E-10 y E-27 por otro). La **Figura 6.7** muestra ambas comparaciones.



**Figura 6.7.** Densidades volumétricas de corriente obtenidas en los EAS exploratorios (caudal de alimentación 3 mL/h) para los electrodos (a) E-5 y E-19 (obtenidos a una velocidad de congelamiento direccional de 3 mm/min); y (b) E-10 y E-27 (procesados a 1 mm/min).

El primer aspecto observado fue un incremento de la corriente generada por *todos* los electrodos (independientemente de su espaciado interlaminar) al pasar de un medio conteniendo sólo Syntho a uno conteniendo 5% orina, tal como ocurrió en los sistemas discutidos en el Capítulo 4. Esto permitió demostrar una vez más el impacto positivo que produce la incorporación de orina en la celda, esta vez para ánodos microbianos porosos. Sin embargo, el pasaje a 10% orina mostró una *caída de la corriente para aquellos electrodos con menores espaciados interlaminares* (E-5 y E-10), además de detectarse una disminución marcada en los caudales de salida de las respectivas celdas, sugiriendo nuevamente la obstrucción de la estructura porosa por efecto de crecimiento microbiano. De acuerdo con esta tendencia, los electrodos mencionados no pudieron evaluarse para concentraciones de 15%, lo que se indica como (-) en la **Tabla 6.1**.

Un aspecto interesante a remarcar es cómo la utilización de electrodos con estructuras más abiertas (E-19 y E-27) permitió efectivamente extender el porcentaje de orina que es posible suplementar a las celdas (hasta 15%). Esto permitió desplazar el máximo de producción de carga a concentraciones de 10% orina, en comparación con los electrodos E-5 y E-10. Las densidades de corriente máximas alcanzadas fueron  $\sim 2,2$  kA/m³ para E-27 y  $2,8$  kA/m³ para E-19, evidenciándose caídas en el desempeño a partir de 15% orina. Esta posibilidad de contar con electrodos de mayor espaciado interlaminar permitió incrementar además los valores máximos de corriente respecto de los electrodos E-5 y E-10, obteniéndose un incremento de  $\sim 20\%$  para E-27 (comparado con E-10) y de  $\sim 81\%$  para E-19 (respecto de E-5). Estos resultados son los *primeros en demostrar la posibilidad de modular efectivamente la cantidad de carga eléctrica recuperada en medios suplementados con orina a partir del control de la arquitectura*

de los electrodos utilizados para el crecimiento microbiano, lo que puede lograrse fácilmente mediante la manipulación de las variables experimentales durante la preparación de los mismos.

En el contexto presentado es importante mencionar que, independientemente de los espaciados de los electrodos de estructura más abierta (E-19 y E-27), en ninguna ocasión fue posible mantener un funcionamiento estable del sistema para concentraciones de orina de 20%. Esto se debió fundamentalmente a la imposibilidad de mantener el flujo de alimentación en los valores fijados inicialmente, haciendo que las comparaciones de los resultados ya no sean válidas para el rango de concentraciones estudiado. De manera análoga a los sistemas presentados en la Sección 4.5 (Capítulo 4), la disminución en el caudal se asoció en este caso – además de a la oclusión por microorganismos – a los fenómenos de precipitación incipiente de sales inorgánicas dentro de los electrodos porosos cuando la concentración de orina fue de 20%, justificando la aparición más temprana de inconvenientes en el flujo (en comparación con los sistemas estudiados con electrodos no porosos).

De acuerdo con la **Figura 6.7**, el análisis de la tendencia observada para E-19 y E-27 reveló una característica interesante. Si bien ambos electrodos fueron preparados utilizando la misma temperatura de fuente fría (-30°C), la mayor densidad de corriente fue obtenida con el electrodo procesado a mayor velocidad de congelamiento direccional (3 mm/min, para E-19), es decir, el de mayor área superficial específica (~ 1150 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> para E-19 en comparación con ~ 920 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> para E-27, este último procesado a 1 mm/min, de acuerdo con los valores mostrados en la **Tabla 5.3**, Capítulo 5). De acuerdo con esta tendencia, un incremento de la superficie específica (disminución del espaciado interlaminar) representaría *a priori* una posible estrategia para continuar aumentando la corriente obtenida. Sin embargo, en este punto surge la necesidad de evaluar el compromiso existente entre una mayor superficie por unidad de volumen de electrodo y la accesibilidad al mismo sin comprometer su funcionamiento.

Con el objeto de buscar un balance adecuado en las características estructurales que conduzcan a mejoras en el desempeño bio-electroquímico de los ánodos, se abordó - en el marco de la RSM - la construcción de superficies de densidad volumétrica de corriente como respuesta a optimizar, a partir de los resultados experimentales obtenidos para los cuatro electrodos evaluados (E-5, E-10, E-19 y E-27).

## 6.4 - Optimización de la densidad de corriente mediante la metodología de la superficie de respuesta (RSM)

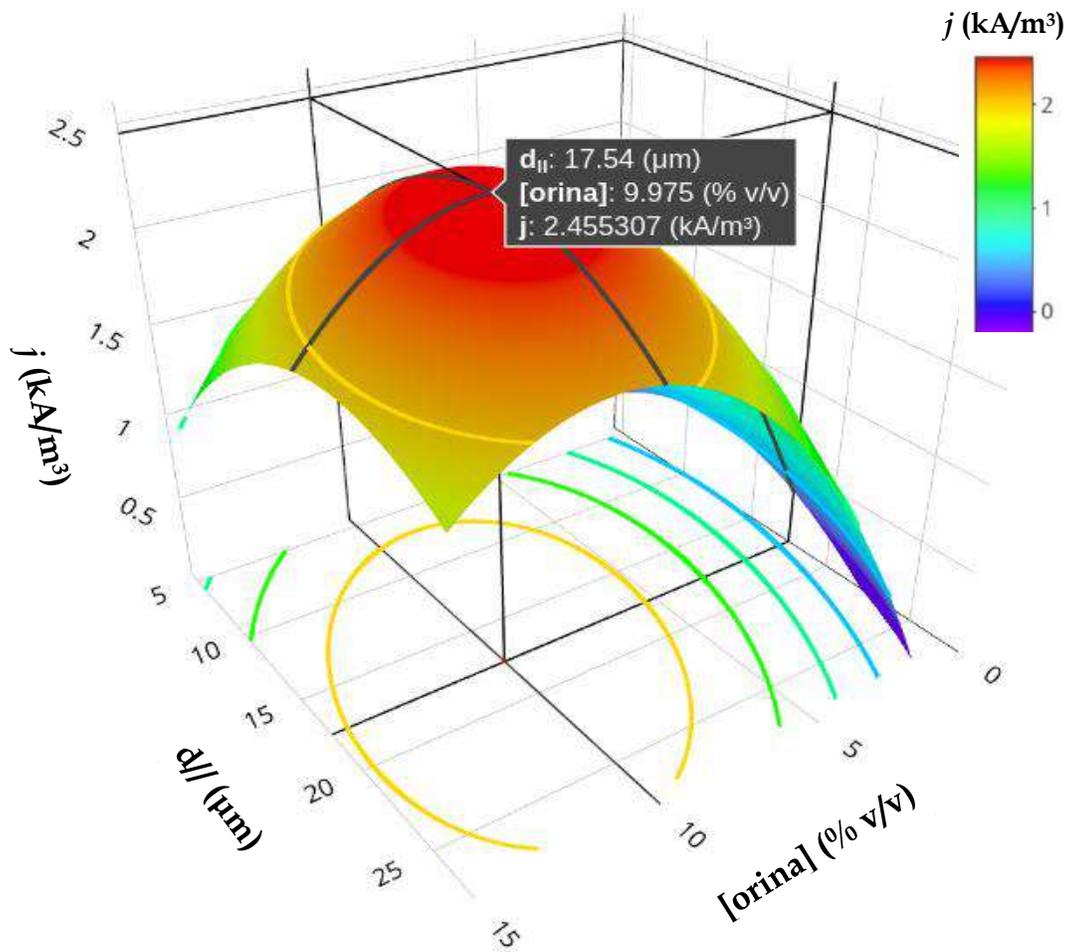
De acuerdo con las diferentes combinaciones de espaciados interlaminares ( $d_{//}$ ) y concentraciones de orina ([orina]) evaluadas (**Tabla 6.1**), y en función de los resultados exploratorios mostrados en la **Figura 6.7**, se detectó ‘curvatura’ en el comportamiento de la densidad de corriente, dada por la presencia de un máximo en el espacio experimental investigado. Por este motivo, se decidió ajustar los valores de densidad de corriente con un polinomio de segundo orden, contemplando además términos de interacción entre las variables, de acuerdo con la **Ecuación 6.2**. La función de ajuste utilizada fue:

$$j \text{ (kA/m}^3\text{)} = \beta_0 + \beta_1 \cdot \overline{d_{//}} + \beta_2 \cdot \overline{[orina]} + \beta_{12} \cdot \overline{d_{//}} \cdot \overline{[orina]} + \beta_{11} \cdot (\overline{d_{//}})^2 + \beta_{22} \cdot (\overline{[orina]})^2 \quad \text{Ecuación 6.4}$$

donde  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  y  $\beta_{ii}$  representan cada uno de los coeficientes de ajuste, y donde  $\overline{d_{//}}$  y  $\overline{[orina]}$  representan las variables independientes *codificadas* en la escala adimensional en función de su posición relativa en el espacio experimental, de acuerdo con la **Ecuación 6.3** (Bezerra et al, 2008; Prudente et al, 2023).

El ajuste de los resultados con la **Ecuación 6.4** definió una superficie de densidad volumétrica de corriente en función de las variables codificadas, las que fueron luego re-transformadas a sus valores reales (utilizando nuevamente la Ecuación 6.3) para graficar en todos los casos las superficies de respuesta en función de los valores reales. Las superficies fueron finalmente utilizadas para predecir los valores de  $d_{//}$  y [orina] que, combinados, conducirían a la máxima densidad de corriente bajo las condiciones experimentales empleadas. El tratamiento de todos los datos se hizo de acuerdo con el entorno y lenguaje de programación ‘R’. Los detalles se muestran en el **Anexo C**. Las representaciones gráficas se realizaron utilizando el paquete ‘Plotly’ de R.

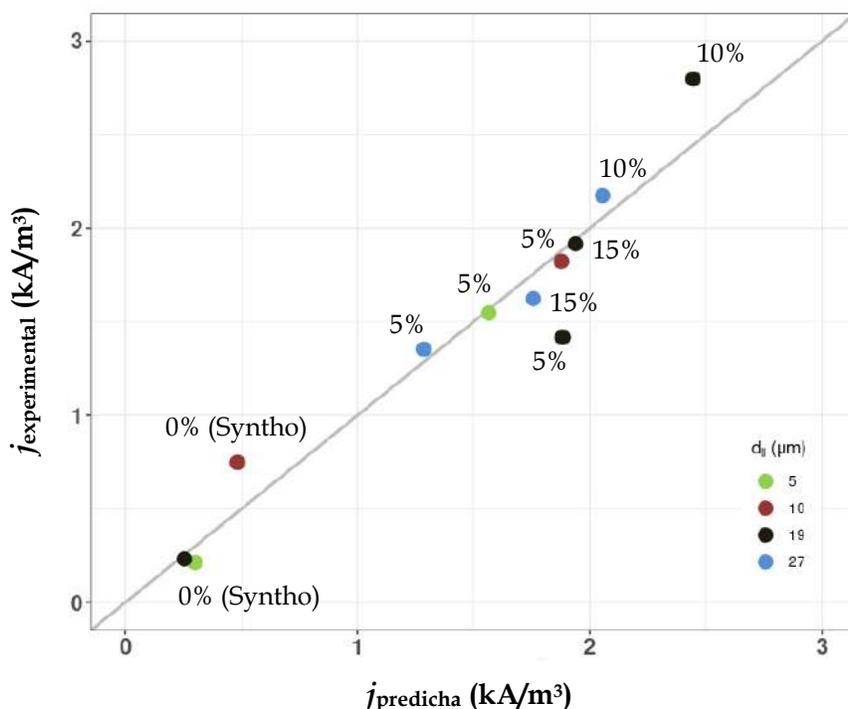
La **Figura 6.8** muestra la superficie de densidad volumétrica de corriente obtenida a partir del tratamiento y ajuste de los resultados correspondientes a los electrodos E-5, E-10, E-19 y E-27.



**Figura 6.8.** Superficie de respuesta generada a partir del ajuste de las densidades de corriente obtenidas para los electrodos E-5, E-10, E-19 y E-27 (Tabla 6.1). Se indican explícitamente las coordenadas del espacio de variables que corresponden al máximo ‘predicho’ por la superficie.

La superficie obtenida, la cual remite al ejemplo mostrado en la **Figura 6.1 (a)** caracterizado por un máximo en la respuesta, fue utilizada para optimizar las condiciones experimentales. De acuerdo con la RSM el proceso de optimización se logra ‘desplazándose’ sobre la superficie - o bien hacia el punto crítico o alejándose del mismo - dependiendo de la respuesta de interés y la naturaleza de éste (máximo, mínimo o punto de ensilladura, para el caso de modelos cuadráticos). En este caso el proceso de ajuste condujo a una superficie parabólica caracterizada por un máximo local correspondiente al par de variables  $d_{//} \sim 17 \mu\text{m}$  y [orina]  $\sim 10\%$ , combinación no explorada en el diseño experimental inicial. La identificación de las coordenadas del máximo *dentro* de los límites estudiados - a diferencia del ejemplo mostrado en la **Figura 6.1 (c)**, donde el máximo queda fuera del dominio experimental - sugiere que no es necesaria una modificación sustancial de las condiciones experimentales para alcanzar las condiciones óptimas del sistema. En este contexto debe mencionarse que, de acuerdo con la teoría de la RSM, el máximo identificado *solo define* - a modo de guía - una región del espacio de variables experimentales

en la cual es posible encontrar los valores que optimizan la respuesta. De hecho, como puede observarse en la **Figura 6.8**, el valor máximo predicho ( $2.46 \text{ kA/m}^3$ ) es ligeramente menor que el valor experimental máximo medido ( $2.80 \text{ kA/m}^3$  para el electrodo E-19). Sin embargo, como se observa en la **Figura 6.9**, la correlación entre los valores de densidad de corriente experimentales y los obtenidos a partir del ajuste mostró buena linealidad, lo que dio soporte adicional a la aproximación estadística empleada para el estudio en curso.



**Figura 6.9.** Densidad de corriente experimental (símbolos) en función de los valores predichos por la superficie de respuesta mostrada en la Figura 6.8. Se indica la concentración de orina correspondiente a cada punto experimental.

Como se mencionó en la sección anterior, la disminución del espaciado interlaminar (aumento del área específica) representaría una posible estrategia para incrementar la densidad de corriente. Al respecto, la superficie de respuesta obtenida se utilizó como guía experimental, sugiriendo la búsqueda de condiciones que permitan obtener espaciados intermedios a los estudiados (por encima de  $10 \mu\text{m}$  y por debajo de  $19 \mu\text{m}$ ), previendo un incremento en la densidad de corriente máxima para concentraciones de orina alrededor de 10%. Esta búsqueda se llevó a cabo modificando las condiciones experimentales de preparación de los electrodos porosos, empleando en la etapa final del trabajo una temperatura de fuente fría de  $-70^\circ\text{C}$ , intermedia a las previamente utilizadas, con el objeto de conseguir un espaciado interlaminar en acuerdo con los requerimientos mencionados. A fines comparativos, se

utilizaron velocidades de congelamiento direccional de 1 y 3 mm/min. Estas nuevas condiciones dieron lugar a los electrodos E-12 y E-14 (Tabla 5.2, Capítulo 5), los que fueron utilizados para diagramar el nuevo diseño experimental en la etapa de optimización final. La Tabla 6.2 muestra este diseño y los valores de densidad de corriente obtenidos.

**Tabla 6.2**

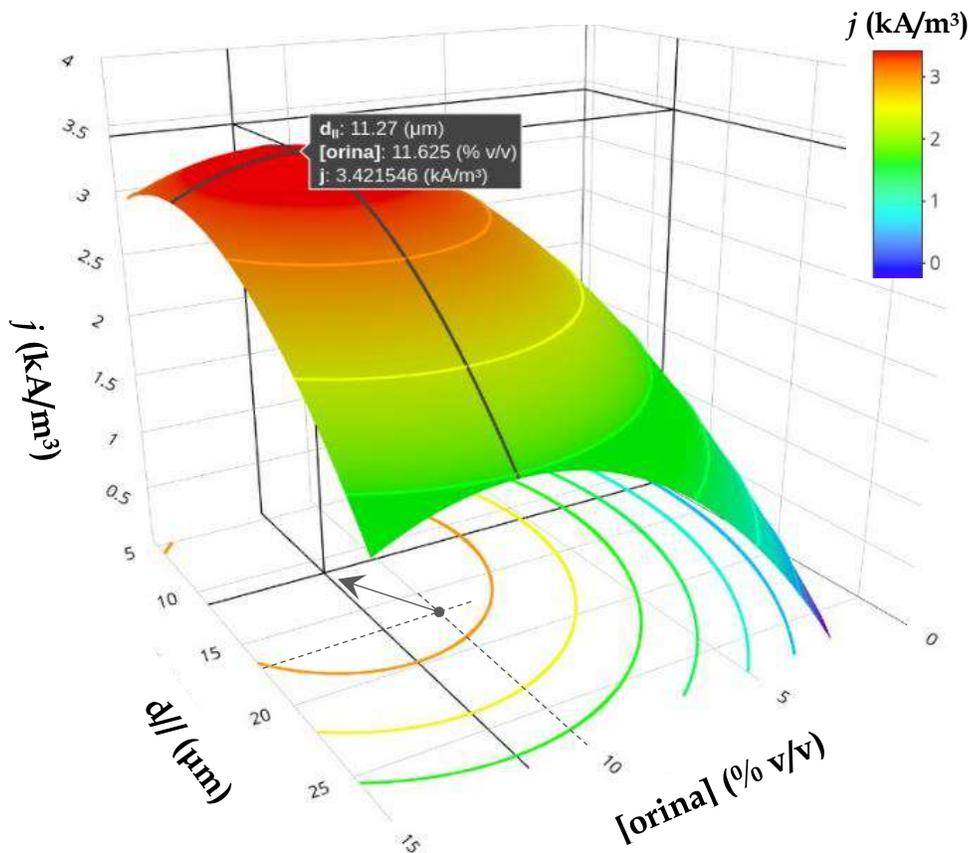
Diseño experimental y densidad volumétrica de corriente para los nuevos electrodos evaluados (E-12 y E-14). El recuadro indica la condición óptima para el diseño abordado.

Electrodo	$d_{//}$ ( $\mu\text{m}$ )	[orina] (%v/v)	$j$ ( $\frac{\text{kA}}{\text{m}^3}$ )
E-12	12	0	0.50
E-12	12	5	2.80
<b>E-12</b>	12	10	<b>5.21</b>
E-12	12	15	3.56
E-14	14	0	0.43
E-14	14	5	1.52
E-14	14	10	3.55
E-14	14	15	3.02

A partir de los resultados obtenidos quedó en evidencia cómo es posible aumentar (considerablemente) la densidad de corriente de los ánodos microbianos utilizando la superficie de respuesta como guía experimental. La modificación de las condiciones de trabajo permitió lograr un incremento en el desempeño bio-electroquímico de aproximadamente 86%, comparando los electrodos de mejor *performance* en ambos diseños: E-12 ( $\sim 5.2 \text{ kA/m}^3$ , Tabla 6.2) y E-19 ( $2.8 \text{ kA/m}^3$ , Tabla 6.1), ambos evaluados a una concentración de orina de 10%. Al igual que en los casos discutidos previamente, la utilización de un 15% de orina en el segundo diseño experimental condujo a caídas en las corrientes de salida, en acuerdo con el comportamiento observado para la respuesta de los electrodos estudiados. Sin embargo, más allá de esto, los nuevos electrodos evaluados en 15% orina arrojaron densidades de corriente aún más elevadas ( $\sim 3 \text{ kA/m}^3$  para E-14 y  $\sim 3.6 \text{ kA/m}^3$  para E-12) que la máxima obtenida en el primer diseño experimental ( $2.8 \text{ kA/m}^3$  con E-19), lo que demuestra que - aún en el caso de una superficie parabólica con un punto crítico máximo - es posible realizar ligeras modificaciones experimentales que conduzcan a una considerable variación de la respuesta de interés, lo que *a priori*

no hubiera sido posible de predecir/detectar fácilmente a partir de una aproximación tradicional de tipo 'modificación de una variable a la vez'. En el contexto de este trabajo de Tesis es importante mencionar que *los valores máximos de densidad de corriente obtenidos con el electrodo E-12 no tienen precedente en la literatura de ánodos microbianos en sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina*.

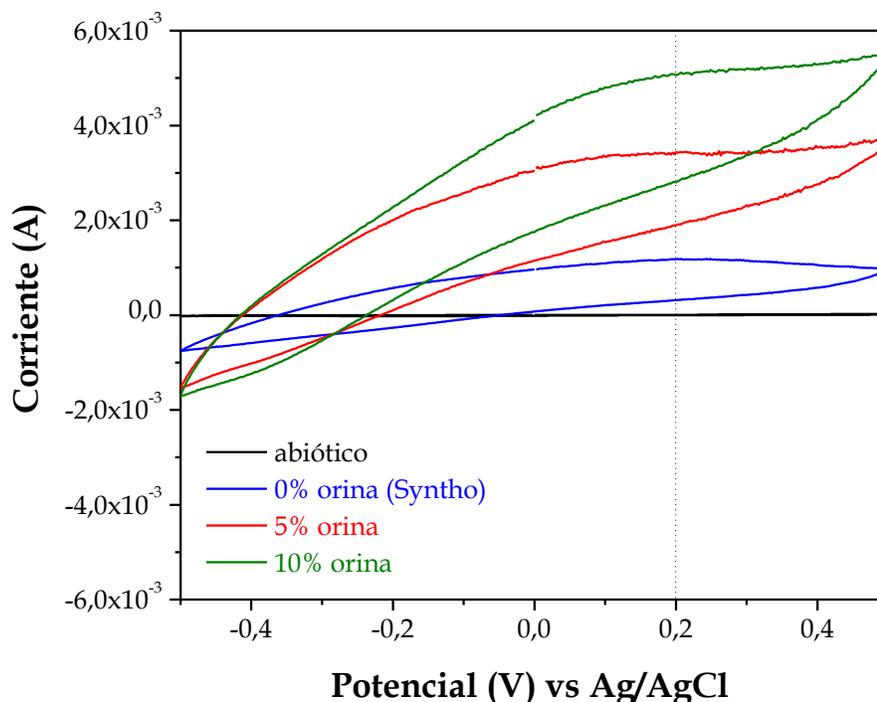
El ajuste de los nuevos resultados experimentales (Tabla 6.2) con el polinomio cuadrático dado por la Ecuación 6.4 condujo a una segunda superficie de respuesta (Figura 6.10).



**Figura 6.10.** Superficie de respuesta obtenida a partir del ajuste de las densidades de corriente mostradas en la Tabla 6.2. En el plano de las variables independientes se representa (con líneas punteadas) la intersección de las coordenadas del máximo de la superficie mostrada en la Figura 6.8. La flecha indica el 'desplazamiento' del máximo hacia las nuevas condiciones óptimas.

El análisis de la nueva superficie permitió observar un ligero desplazamiento de las coordenadas correspondientes al máximo con respecto a las de la primera superficie obtenida (Figura 6.8). Teniendo en cuenta la proximidad entre las condiciones experimentales utilizadas para el electrodo E-12 y el máximo predicho por la nueva superficie, se decidió finalizar el proceso de optimización bajo las condiciones experimentales utilizadas.

La respuesta bio-electroquímica del electrodo de mejor desempeño (E-12) se evaluó mediante ensayos de voltametría cíclica en función de la concentración de orina. La **Figura 6.11** muestra la comparación de los voltagramas obtenidos.

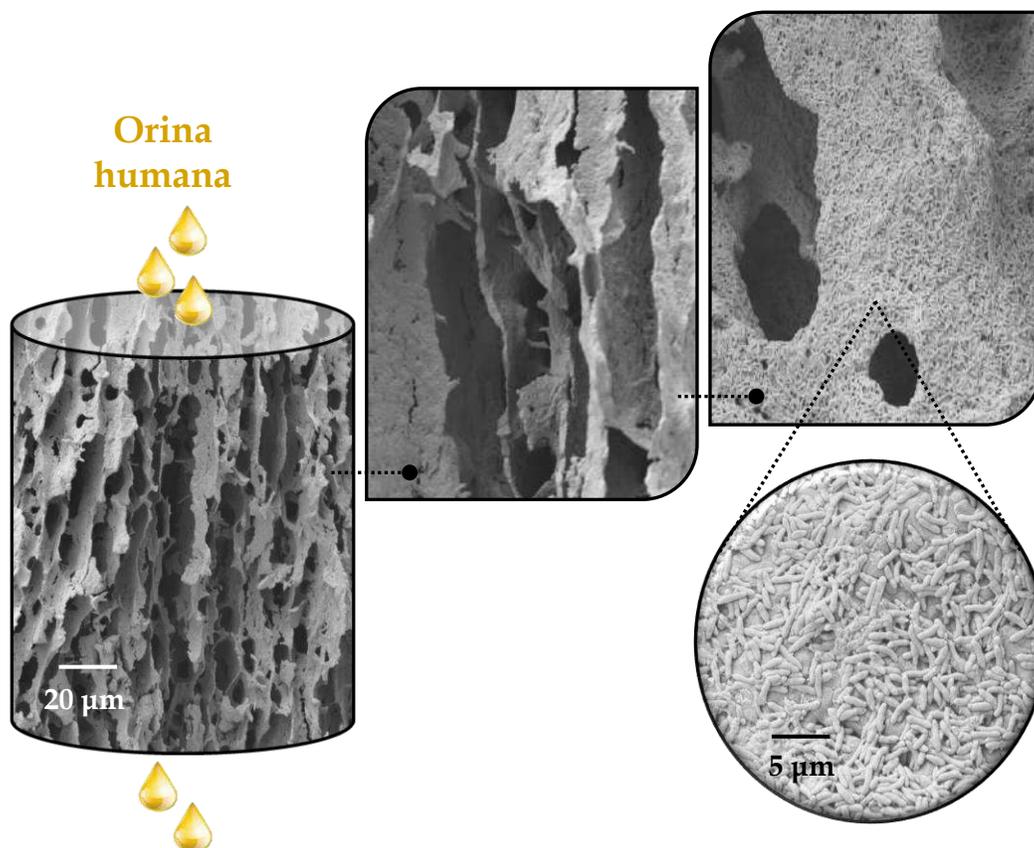


**Figura 6.11.** Voltagramas correspondientes al electrodo E-12 en función de la concentración de orina. Con fines comparativos, se representa además la respuesta obtenida en condiciones abióticas para una concentración de orina de 10%. Velocidad de barrido de potencial: 10 mV/s.

El primer aspecto notorio fue la diferencia en respuesta entre los ensayos realizados con electrodos colonizados y el correspondiente a condiciones abióticas, para el que no se detectó corriente alguna en la ventana de potencial analizada. Esto reveló nuevamente que, en todos los casos, la corriente producida se debió a procesos mediados por microorganismos electro-activos (y no a la posible oxidación de compuestos presentes en el medio de cultivo). La respuesta bio-electroquímica de los sistemas híbridos fue indicativa de la evolución microbiológica con el incremento en la concentración de orina. Los voltagramas - especialmente los obtenidos en un medio conteniendo 5 y 10% orina - mostraron corrientes catalíticas en aumento (debidas a procesos microbiológicos de transferencia electrónica) en el rango -0.5 V/-0.15 V (estabilizándose a partir de potenciales de ~0.1 V), en un 'fondo' capacitivo (voltagrama 'ancho') típico de electrodos porosos. Estos rasgos característicos se correlacionaron en excelente acuerdo con resultados reportados en la bibliografía para *biofilms* de bacterias electro-activas (*G. sulfurreducens*) confinadas en electrodos porosos alimentados bajo una

modalidad de flujo *a través* (Katuri et al, 2011), permitiendo demostrar efectivamente la viabilidad metabólica microbiana en las condiciones de trabajo utilizadas.

La presencia de microorganismos en el interior de las estructuras laminadas se reveló por microscopía SEM. La **Figura 6.12** muestra micrografías correspondientes a un electrodo E-12 alimentado con una concentración de orina de 10%. La figura se representa trazando una analogía con el esquema mostrado en la Figura 2.1 (Capítulo 2).



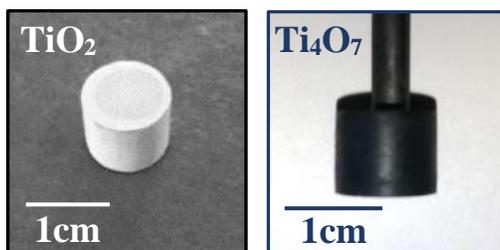
**Figura 6.12.** Micrografías SEM de la estructura interna de un electrodo E-12 colonizado por bacterias electro-activas en un medio conteniendo 10% orina.

La última etapa del trabajo se centró en la estimación del ‘aprovechamiento’ de la superficie específica para todos los electrodos evaluados, en función de la accesibilidad al interior de las estructuras porosas y al uso efectivo del área superficial electroquímicamente activa. La siguiente sección aborda los principales resultados al respecto.

## 6.5 - Eficiencia de uso de la superficie anódica

Para estimar el aprovechamiento de la superficie de cada electrodo se comparó la densidad volumétrica de corriente experimental con la que teóricamente se hubiera producido si la totalidad de la superficie electroquímicamente activa hubiese sido colonizada por microorganismos.

Con el fin de contar con un parámetro de referencia de corriente por unidad de superficie ( $A/m^2$ ) para el material de electrodo estudiado, se realizaron ensayos de colonización bacteriana y producción de corriente (cronoamperometría) utilizando **electrodos no porosos de  $Ti_4O_7$** , en celdas de tres electrodos bajo las mismas condiciones de operación que las usadas para los electrodos laminados (excepto por la modalidad alimentación, dada la imposibilidad de llevar a cabo flujo a través del electrodo). La preparación de los electrodos no porosos se llevó a cabo por prensado uniaxial ( $2.8 Tn/cm^2$ ) de polvos de  $TiO_2$  en presencia de PVP (misma relación en masa que la utilizada para los electrodos porosos, Sección 5.4, Capítulo 5). Las piezas prensadas fueron posteriormente sinterizadas en aire (3 h,  $1000^\circ C$ ) y finalmente reducidas a  $1000^\circ C$  bajo vacío en presencia de zirconio metálico (20 mg Zr/100 mg  $TiO_2$ ). La **Figura 6.13** muestra fotografías de las estructuras preparadas.

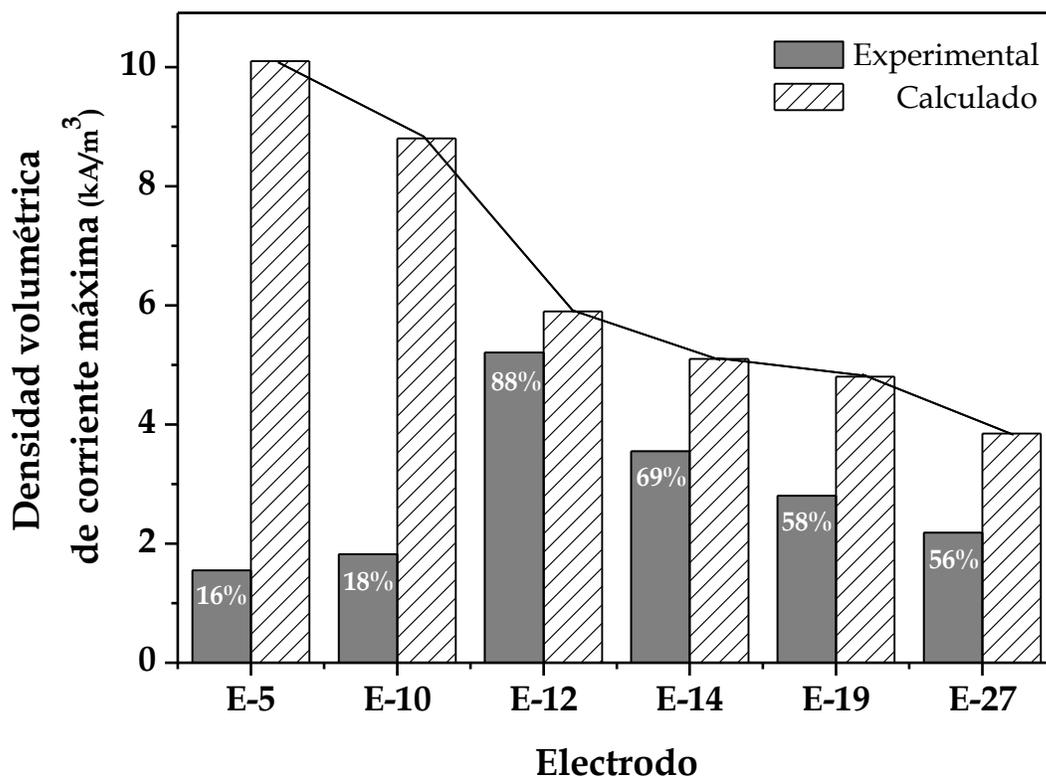


**Figura 6.13.** Piezas *no porosas* obtenidas por prensado uniaxial:  $TiO_2$  (sinterizado) y  $Ti_4O_7$  (adherido a una barra de grafito, utilizada como conector eléctrico).

A partir de los resultados de cronoamperometría se determinó la máxima densidad de corriente alcanzable con el electrodo no poroso ( $4.2 A/m^2$ ), la que resultó ser un 17% mayor que la máxima densidad obtenida utilizando barras de grafito como ánodos microbianos ( $3.6 A/m^2$ , Sección 4.6, Capítulo 4). Este resultado demostró una mayor respuesta bio-electroquímica de la fase cerámica respecto del material carbonoso de base grafito, aún para concentraciones de orina más bajas (10% para  $Ti_4O_7$  y 20% para grafito). Estos resultados mostraron además acuerdo con reportes de la literatura para superficies de  $Ti_4O_7$  utilizadas como soporte para el crecimiento de cepas puras de *G. sulfurreducens* (en ausencia de orina), demostrando en este último caso la capacidad de la fase cerámica para aceptar electrones provenientes de la oxidación microbiológica de acetato (Massazza et al, 2015). En línea con

dicho estudio, la mayor capacidad bio-electro-activa asociada a la fase  $Ti_4O_7$  podría relacionarse con su comportamiento de conducción eléctrica de tipo metálica, en combinación con sus características estructurales de tipo *corindón* (para la estructura de  $Ti_2O_3$ ), estas últimas típicas de óxidos de hierro (polimorfo  $\alpha-Fe_2O_3$ ) capaces de interactuar con microorganismos electro-activos como aceptores electrónicos naturales (en sedimentos anaeróbicos).

Con el fin de comparar las densidades volumétricas experimentales obtenidas con los electrodos porosos con valores teóricos (bajo la suposición de colonización completa de sus superficies), se escaló la máxima densidad de corriente obtenida con el electrodo no poroso ( $4.2 \text{ A/m}^2$ ) a cada uno de los electrodos laminados de acuerdo con su área electroquímica por unidad de volumen (Tabla 5.3, Capítulo 5). Si bien es cierto que este procedimiento de escalado podría no ser estrictamente correcto desde el punto de vista funcional/operacional - debido a posibles diferencias metabólicas para los microorganismos (los que estarían confinados en el caso de los electrodos laminados) y/o de transporte de masa hacia el *biofilm* en cada caso - esto permitió cuando menos realizar una comparación interna entre los electrodos evaluados. La **Figura 6.14** muestra esta comparación.



**Figura 6.14.** Aprovechamiento de superficie anódica (expresado como %) para los electrodos laminados, calculado a partir de  $\left(\frac{j_{\text{máx,experimental}}}{j_{\text{máx,calculada}}}\right) \times 100$ ; donde  $j_{\text{máx,experimental}}$  es la densidad volumétrica de corriente medida y  $j_{\text{máx,calculada}}$  es la densidad volumétrica calculada suponiendo total aprovechamiento del área de cada electrodo.

Los electrodos mostraron una distribución amplia de eficiencia en cuanto al aprovechamiento de su superficie, la que dependió - como era esperado - del espaciado interlaminar, siendo máxima para los espaciados intermedios, en acuerdo con las características estructurales predichas por la superficie de respuesta. Al respecto, los cálculos estimativos permitieron revelar un aprovechamiento cercano al 90% para el electrodo E-12 (de mejor desempeño bio-electroquímico). Los resultados de la **Figura 6.14** en conjunto mostraron claramente el *compromiso existente entre la accesibilidad a la estructura porosa y el aprovechamiento de la superficie electroquímicamente activa*. Así, fue posible interpretar los resultados de producción de corriente en función de limitaciones asociadas a cada electrodo.

La caída en la densidad de corriente experimental para los electrodos de mayor accesibilidad (E-19 y E-27) comparada con la obtenida a partir de E-12 podría interpretarse sobre la base de limitaciones asociadas a la cantidad de superficie por unidad de volumen. De esta manera, los electrodos E-19 y E-27 no podrían haber alcanzado (ni aun siendo completamente colonizados) las densidades volumétricas del electrodo E-12, 'simplemente' porque *no disponen de suficiente superficie electroquímicamente activa*. Para estos electrodos, la disminución en los porcentajes de colonización respecto de E-12 podría resultar llamativa, ya que al ser los de mayor accesibilidad se esperaría *a priori* la mayor colonización posible. Sin embargo, los procesos de colonización microbiana dentro de electrodos porosos dependen, además de su accesibilidad y de su superficie efectiva, de los fenómenos hidrodinámicos que se desarrollan en el interior de los poros, los cuales estarán determinados en este caso por el espaciado interlaminar (Massazza et al, 2018). Al respecto, el tipo de flujo hidrodinámico local que pueda desarrollarse sobre la superficie del electrodo (y sobre la superficie del *biofilm* una vez formado) condicionará los fenómenos de transporte - y con ellos, los coeficientes de transferencia de masa - generando componentes de velocidad de flujo en direcciones diferentes a las del flujo primario (Song et al, 2013; Kim et al, 2013), influenciando el transporte de materia orgánica necesario para el crecimiento microbiano. Este efecto es considerable en estructuras laminadas con espaciados del orden de los micrones (Picioreanu et al, 2000), repercutiendo directamente en el crecimiento bacteriano y, por ende, en el grado de colonización de cada estructura porosa. Como se mencionó en la Sección 5.4.4 (Capítulo 5), los electrodos mostraron distinto grado de 'rugosidad' superficial en función de su espaciado interlaminar, con superficies más rugosas a menor espaciado, lo que podría provocar - bajo la hipótesis de cambios locales en el régimen hidrodinámico - modificaciones en la dirección y velocidad de flujo dentro de los canales de los electrodos de menor espaciado, potenciando de cierta forma el transporte de masa y el crecimiento preferencial. Este fenómeno (tomado aquí como hipótesis, ya que no se han realizado estudios al

respecto en esta Tesis) podría contribuir a la interpretación de las diferencias detectadas en el grado de aprovechamiento superficial para los electrodos de mayor espaciado interlaminar.

En contraposición a los electrodos de mayor accesibilidad, los de mayor superficie específica (E-5 y E-10) claramente presentaron el menor desempeño bio-electroquímico debido a una *deficiente accesibilidad estructural* (y a los inconvenientes asociados a los fenómenos de precipitación descriptos), lo que hace que no pueda aprovecharse efectivamente la superficie activa de la que dispone el electrodo, independientemente de los perfiles hidrodinámicos desarrollados dentro de los poros.

En el campo de los ánodos porosos para aplicaciones bio-electroquímicas habitualmente se buscan estructuras conductoras con una elevada área superficial por unidad de volumen, bajo la premisa de que a mayor área superficial volumétrica mayor será el rendimiento bio-electroquímico asociado (Xie et al, 2015). De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 6.14** para el rango de espaciados interlaminares evaluados, se demostró que el desempeño anódico no escala de manera directamente proporcional al área electroquímicamente activa (la máxima densidad de corriente no se obtuvo con el electrodo de mayor superficie específica), revelando que - para el caso de los electrodos laminados desarrollados y bajo las condiciones experimentales utilizadas - **existe un límite de superficie específica que conduce a la máxima densidad de corriente**. Teniendo en cuenta el electrodo de mejor desempeño (E-12), se requeriría un electrodo *no poroso* ~ 2.5 veces más grande (en volumen) para alcanzar los mismos niveles de corriente que E-12, lo que pone de relevancia la posibilidad de contar con una elevada área electroquímicamente activa en volúmenes pequeños (miniaturización) cuando se utilizan ánodos microbianos laminados como los desarrollados en este trabajo.

## 6.6 - Contextualización de los resultados en el área bio-electroquímica

Con la intención de enmarcar los mejores resultados obtenidos en este trabajo dentro del área bio-electroquímica de sistemas alimentados con orina humana, se compararon las densidades de corriente del electrodo E-12 con las reportadas a la fecha para ánodos microbianos porosos de naturaleza carbonosa (filtros, telas y esponjas de carbono).

En la bibliografía actual es ampliamente aceptado expresar los resultados de corriente anódica por unidad de superficie. En el caso de electrodos no porosos, en los que el área geométrica del electrodo se relaciona directamente con la superficie expuesta para el crecimiento bacteriano, las densidades de corriente por unidad de área representan efectivamente el desempeño bio-electroquímico del ánodo microbiano. Sin embargo, cuando se utilizan electrodos porosos, los resultados de corriente suelen

## Capítulo 6

expresarse por unidad de *área proyectada* en lugar de hacerlo por unidad de área real (Chong et al, 2019). El área proyectada de una figura geométrica es la proyección rectilínea de su superficie (independientemente de su topografía) sobre un plano *arbitrario* perpendicular al vector unitario normal a dicha superficie (Palmer, 1999). Esto hace que las densidades de corriente expresadas de esta manera para ánodos porosos resulten generalmente sobrestimadas, debido principalmente a la distribución de área real que existe por unidad de volumen de electrodo, la cual es mucho mayor que el área proyectada utilizada en los cálculos (Sharma et al, 2014). Debido a que los trabajos que abordan el estudio de ánodos porosos no reportan usualmente las áreas reales, es difícil efectuar una comparación válida entre ellos, así como tampoco (mucho menos) entre ánodos porosos y no porosos. En este marco, y llamativamente, la densidad de corriente expresada por unidad de área proyectada continúa siendo en la actualidad uno de los indicadores de *performance* más frecuentemente empleados para ánodos microbianos (porosos y no porosos). Además de estas diferencias, las comparaciones pueden resultar no del todo adecuadas si se tiene en cuenta que las condiciones de experimentación y las configuraciones de celda utilizadas difieren generalmente entre los distintos estudios.

Una vez clarificado esto, y con el objeto de enmarcar ‘cuidadosamente’ los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis dentro de la bibliografía del área, se decidió relevar aquellos ánodos microbianos porosos evaluados en la literatura en presencia de orina humana bajo condiciones que hayan garantizado máximos desempeños en sistemas no limitados catódicamente. En estos casos, las densidades de corriente anódica *por unidad de área proyectada* abarcan el rango 0.1-0.6 A/m<sup>2</sup> (Ieropoulos et al, 2012; Santoro et al, 2013; Shreeram et al, 2016; Barbosa et al, 2017; Barbosa et al, 2019). Para comparar la *performance* del electrodo E-12 con los estudios mencionados, se transformó la máxima densidad volumétrica obtenida (5.21 kA/m<sup>3</sup>) en densidad *por unidad de área real* (3.72 A/m<sup>2</sup>), siendo ésta un orden de magnitud mayor a los valores reportados para ánodos carbonosos, lo que resaltó aún más el desempeño anódico de los electrodos laminados respecto a los sistemas microbianos relevados.

De acuerdo con las características estructurales de los ánodos laminados, es importante remarcar el interés que tendría la aplicación de estos electrodos híbridos en sistemas **bio-electroquímicos miniaturizados**. La miniaturización de MFCs, junto con su configuración en serie para alcanzar diseños compactos de alta eficiencia (respecto de las MFCs tradicionales) y bajos requerimientos de superficie de instalación (Ieropoulos et al, 2010; Qian y Morse, 2011; Walter et al, 2016), ha emergido en los últimos años como una estrategia para minimizar las principales limitaciones típicamente asociadas a las MFCs convencionales, a saber, el costo de los materiales, las elevadas resistencias eléctricas y caídas óhmicas que se dan en los procesos de escalado, el mantenimiento vinculado al propio uso de la celda, entre

otros (Ieropoulos et al, 2013; Chouler et al, 2016). En este escenario, el escalado 'hacia abajo' (*downscale*) ofrece ventajas asociadas a la simplicidad de operación, como así también a la posibilidad de deshacerse de (o al menos disminuir) los problemas difusivos de transporte, contando al mismo tiempo con una ventaja competitiva en los diseños compactos con ánodos de pequeño volumen con áreas electroquímicamente activas elevadas. Es precisamente en este caso donde los ánodos microbianos desarrollados podrían ser explotados a su máximo potencial, especialmente en circuitos (abiertos/cerrados) bajo configuraciones de flujo continuo a través de su arquitectura laminada, lo que claramente no es el caso para ánodos no porosos o porosos con estructura intrincada. Este nicho de investigación/aplicación puede visualizarse como un objetivo emergente a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis.

## 6.7- Conclusiones parciales

En este capítulo se retomaron los conceptos y resultados expuestos en el Capítulo 4 (producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina humana) para ser extendidos al desarrollo de nuevos electrodos cerámicos de  $Ti_4O_7$  con porosidad anisotrópica (presentados en el Capítulo 5). En particular, se aplicó la Metodología de la Superficie de Respuesta a la búsqueda de las condiciones óptimas de los sistemas bio-híbridos desarrollados, de acuerdo con dos de las variables más influyentes para el desarrollo y colonización de bacterias electro-activas en el interior de los electrodos: el espaciado interlaminar y la concentración de orina. A continuación, y a modo de resumen parcial, se exponen los principales resultados obtenidos:

- ❖ La fase cerámica  $Ti_4O_7$  es estable (ausencia de procesos *redox*) tanto en Syntho como en presencia de orina al potencial de polarización empleado para la producción microbiológica de carga eléctrica (0.2 V vs Ag/AgCl).
- ❖ El material de electrodo  $Ti_4O_7$  permite generar mayores densidades de corriente (4.2 A/m<sup>2</sup>) en comparación con electrodos carbonosos habitualmente utilizados en el área bio-electroquímica como ánodos microbianos (3.6 A/m<sup>2</sup> para electrodos de grafito), aún en medios de cultivo con menores contenidos de orina.
- ❖ De acuerdo con las características estructurales de los electrodos y las condiciones de operación de las celdas, es posible emplear un sistema de flujo continuo de materia orgánica a través de las estructuras laminadas y lograr el funcionamiento estable del sistema empleando un caudal de alimentación de 3 mL/h.

## Capítulo 6

- ❖ La corriente eléctrica producida a partir de los electrodos laminados se debe a la presencia de microorganismos electro-activos en su interior, y no a procesos abióticos de oxidación de compuesto presentes en el medio de cultivo.
- ❖ Es posible extender el rango de concentraciones de orina suministradas a través de las estructuras porosas al incrementar el espaciado interlaminar de los electrodos.
- ❖ La densidad de corriente que es posible obtener depende del espaciado interlaminar y de la concentración de orina.
- ❖ Es posible utilizar la metodología de la superficie de respuesta (RSM) para predecir las características estructurales (espaciado interlaminar) y de operación de los ánodos microbianos (concentración de orina) que conducen a la maximización de la densidad volumétrica de corriente.
- ❖ La densidad volumétrica de corriente no escala de manera directamente proporcional a la superficie específica de los electrodos laminados, existiendo un límite a la máxima densidad de corriente dado por la combinación óptima entre accesibilidad estructural y superficie electroquímicamente activa.
- ❖ El electrodo laminado de mejor desempeño (E-12) es capaz de producir densidades de corriente un orden de magnitud mayores que las reportadas actualmente para sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina humana (ya sea pura o diluida).

En el próximo y último capítulo se resumen las conclusiones que fueron señaladas en las distintas secciones de este Trabajo de Tesis.

# Capítulo 7

## Conclusiones generales

Las hipótesis que motivaron la realización de esta Tesis dieron origen a diversos estudios orientados al desarrollo de electrodos de  $Ti_4O_7$  con porosidad anisotrópica para ser utilizados en la generación de corriente eléctrica a partir de orina humana en sistemas bio-electroquímicos.

En este sentido, uno de los objetivos del trabajo fue obtener, a partir de un lodo cloacal doméstico, bacterias electro-activas capaces de degradar la materia orgánica presente en la orina y de transferir los electrones provenientes de la oxidación a la superficie del electrodo colector. Al respecto, se propuso la utilización de un óxido de titanio eléctricamente conductor ( $Ti_4O_7$ ) como material de los nuevos electrodos, estudiando las condiciones experimentales para la obtención de estructuras laminadas capaces de ser utilizadas para el crecimiento de las bacterias electro-activas bajo una modalidad de flujo continuo de orina a través de la estructura porosa. En el contexto presentado, el trabajo contempló el uso de una herramienta estadística (RSM) para la predicción de las condiciones óptimas de concentración de orina y espaciado interlaminar que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, condujeran a la maximización de la densidad de corriente por unidad de volumen de ánodo microbiano.

Al final de cada capítulo se han destacado los principales resultados de cada sección. El análisis conjunto de los mismos permitió ampliar y avanzar en el conocimiento preexistente de ánodos microbianos porosos para aplicaciones bio-electroquímicas en presencia de orina humana. A continuación se detallan las conclusiones más relevantes, las que han permitido confirmar las hipótesis planteadas y alcanzar los objetivos propuestos:

### ***Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos no porosos de grafito***

- ❖ A partir de un lodo cloacal doméstico es posible obtener consorcios bacterianos (microorganismos electro-activos y no electro-activos) capaces de producir corriente eléctrica a partir de orina empleando electrodos no porosos de grafito como ánodos en celdas bio-electroquímicas de tres electrodos.
- ❖ La utilización de orina como fuente de materia orgánica permite obtener mayores densidades de corriente comparadas con las generadas a partir de un efluente doméstico sintético (Syntho), pero sólo en un rango acotado de concentración (hasta 20% en volumen).
- ❖ La caída en el desempeño anódico para concentraciones de orina superiores a 20% se debe a la pérdida progresiva de microorganismos electro-activos en el *biofilm* anódico como consecuencia del aumento de la concentración de compuestos tóxicos en la celda (amoníaco libre) y de la formación de precipitados inorgánicos (estruvita e hidroxapatita) sobre el mismo.
- ❖ La aclimatación progresiva de los microorganismos electro-activos a concentraciones crecientes de orina permite adaptar y mantener la población microbiana dentro de un rango óptimo en el cual es posible preservar su viabilidad.
- ❖ La máxima densidad de corriente obtenida a la concentración óptima de orina (3.6 A/m<sup>2</sup> para 20%) es 35 veces superior a la generada a partir de orina pura.
- ❖ La producción microbiológica de corriente puede ser interpretada desde un punto de vista teórico a partir de consideraciones energéticas, relacionando la densidad de energía catabólica presente en el medio de cultivo (diferentes concentraciones de orina) con la velocidad de crecimiento de los microorganismos electro-activos y la velocidad de producción de carga eléctrica por unidad de superficie anódica.

### ***Diseño, preparación y caracterización físico-química de electrodo porosos de Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> con porosidad anisotrópica***

- ❖ Es posible obtener dispersiones acuosas estables de NPs de TiO<sub>2</sub> comercial (P25) empleando polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante, así como estructurarlas por congelamiento direccional para obtener piezas cerámicas con elevada (~90%) porosidad anisotrópica (láminas equiespaciadas).

## Conclusiones generales

- ❖ Controlando las variables de congelamiento (temperatura de fuente fría y velocidad de inmersión) es posible modular el espaciado interlaminar y la superficie específica por unidad de volumen de las estructuras cerámicas.
- ❖ La reducción bajo vacío de las piezas porosas de  $\text{TiO}_2$ , en presencia de zirconio metálico, permite obtener estructuras de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  que exhiben un comportamiento de conducción electrónica de tipo metálico.
- ❖ El tiempo de reducción representa una variable fundamental para la obtención de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  como fase única.
- ❖ Las estructuras de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  presentan una relación inversa entre su espaciado interlaminar y su área electroquímicamente activa por unidad de volumen.

### *Producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina utilizando electrodos porosos de $\text{Ti}_4\text{O}_7$*

- ❖ La fase cerámica  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  es estable (ausencia de procesos *redox*) tanto en Syntho como en presencia de orina al potencial de polarización empleado para la producción microbiológica de carga eléctrica (0.2 V vs Ag / AgCl).
- ❖ Es posible emplear un sistema de flujo continuo de materia orgánica a través de las estructuras laminadas de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  y lograr el funcionamiento estable del sistema empleando un caudal de alimentación de 3 mL/h.
- ❖ La corriente eléctrica producida a partir de los electrodos laminados se debe a la presencia de microorganismos electro-activos en su interior, y no a procesos abióticos de oxidación de compuesto presentes en el medio de cultivo.
- ❖ Modificando el espaciado interlaminar de los electrodos es posible extender el rango de concentraciones de orina suministradas a través de las estructuras porosas.
- ❖ La densidad de corriente depende del espaciado interlaminar y de la concentración de orina.
- ❖ La metodología de la superficie de respuesta (RSM) puede ser utilizada para predecir el espaciado interlaminar y la concentración de orina que maximizan la densidad volumétrica de corriente.
- ❖ La densidad volumétrica de corriente no escala de manera directamente proporcional a la superficie específica de los electrodos laminados, existiendo un límite a la máxima densidad de corriente dado por la combinación óptima entre accesibilidad estructural y superficie electroquímicamente activa.

## Capítulo 7

- ❖ La densidad de corriente máxima obtenida con los electrodos laminados ( $5.2 \text{ kA/m}^3$ ) es un orden de magnitud mayor que las reportadas a la fecha para sistemas bio-electroquímicos alimentados con orina humana (ya sea pura o diluida).

# Anexo A

## Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo utilizado para la simulación de la densidad de corriente

En este anexo se describen los cálculos de cada uno de los parámetros utilizados para la determinación de las densidades de corriente microbiana en el rango de concentraciones de orina analizado (de 0 a 20% en volumen), de acuerdo con cada una de las etapas mostradas en la **Figura 4.27** (Capítulo 4).

### **Etapa 1: cálculo de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) a partir de parámetros termodinámicos**

La relación entre la fuerza impulsora para el crecimiento microbiano, el rendimiento de biomasa y la velocidad metabólica ha sido usualmente estudiada dividiendo la reacción macroquímica de crecimiento en sus constituyentes catabólicos y anabólicos (von Stockar et al, 2006). De acuerdo con esta descripción, el dador electrónico es inicialmente oxidado liberando energía en el proceso, la que es posteriormente utilizada en el proceso anabólico de producción celular. En línea con esta aproximación, se determinaron por separado cada uno de los parámetros termodinámicos asociados al proceso metabólico ( $\Delta G_{\text{anabólico}}$ ,  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ , incluida  $\mu_{\text{máx}}$ ) de manera de estimar inicialmente la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos electro-activos. A continuación, se detallan los cálculos asociados a estas cantidades.

### Cálculo de $\Delta G_{\text{anabólico}}$

La energía anabólica se define como la energía química disponible por unidad de biomasa; es decir, aquella que un microorganismo podría virtualmente obtener al consumir (oxidar) su propia materia orgánica (von Stockar et al, 2006). Debido a que la composición elemental promedio de una bacteria es prácticamente constante ( $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ ) - independientemente de la cepa considerada - se planteó la siguiente reacción de acuerdo con (von Stockar et al, 2006; Le Quéméner-Bouchez 2014):

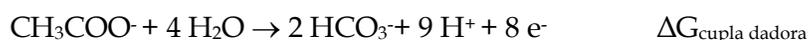


El  $\Delta G$  correspondiente a dicha reacción (denominado  $\Delta G$  de combustión modificado) (von Stockar et al, 2006) fue calculado a partir de energías de Gibbs estándar de formación ( $\Delta G_{\text{formación}}^0$ ) para cada compuesto participante (incluida la energía de formación de la biomasa por mol de carbono), obtenidas de bibliografía (Heijnen y Kleerebezem 2010). Así,  $\Delta G_{\text{anabólico}} = -\Delta G_{\text{combustión}} = 472.82 \frac{\text{kJ}}{\text{mol C de X}}$ . Este valor corresponde a condiciones estándar (pH = 7 y 25°C). Considerando el pH intracelular = 7.5 (para microorganismos neutrófilos, Booth, 1985) y 30°C (la temperatura de experimentación), el valor corregido para  $\Delta G_{\text{anabólico}}$  fue de  $475.03 \frac{\text{kJ}}{\text{mol C de X}}$ . Para la corrección del pH se empleó un  $\Delta G_{\text{formación}}(\text{H}^+) = -39.83 + RT \ln \left(\frac{\text{H}^+}{10^{-7}}\right)$  (Heijnen y Kleerebezem 2010). La corrección por temperatura se llevó a cabo utilizando la ecuación de Gibbs-Helmholtz.

### Cálculo de $\Delta G_{\text{catabólico}}$

De acuerdo con el modelo planteado, el proceso catabólico que conduce a la generación de carga eléctrica está asociado a la degradación anaeróbica de acetato mediada por microorganismos del género *Geobacter*. Así, el  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  fue calculado considerando las cuplas dadora y aceptora de electrones ( $\Delta G_{\text{catabólico}} = \Delta G_{\text{cupla dadora}} + \Delta G_{\text{cupla aceptora}}$ ) para un escenario en el cual *Geobacter* consume acetato y cede electrones al electrodo bajo polarización.

De acuerdo con la estequiometría de la reacción de oxidación de acetato mediada por *Geobacter*, el  $\Delta G_{\text{cupla dadora}}$  (acetato/bicarbonato) fue calculado como (por convención se escribe por mol de dador electrónico):



A partir de los valores de  $\Delta G_{\text{formación}}^0$  de cada una de las especies involucradas (Heijnen y Kleerebezem 2010) se determinó un  $\Delta G_{\text{cupla dadora}} = -247.9 \frac{\text{kJ}}{\text{mol acetato}}$  (pH = 7.5 y 30°C).

## Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo

Se estimó luego la variación de energía asociada a la cupla aceptora. En nuestro caso, el electrodo actúa como aceptor final. En este marco, el potencial del ánodo es cualitativamente análogo a - y juega el rol de - la 'concentración' de aceptor electrónico (Kato Marcus et al, 2007). Esto permite adoptar la aproximación de Heijnen y Kleerebezem (2010), de acuerdo con la cual la energía de Gibbs (por mol de electrones) del proceso puede vincularse directamente con el potencial *redox* de la hemirreacción de interés ( $\Delta G_{e/aceptor} = - F \cdot \Delta E_{e/aceptor}$ ). Para calcular  $\Delta E_{e/aceptor}$  debe definirse primero un potencial de referencia respecto del cual expresar el potencial del ánodo (potencial de polarización). En nuestro caso se utilizó como referencia el potencial anódico de media onda ( $E_{KA}$ , **Figura 4.24**), el cual representa la tendencia del *biofilm* electro-activo a transferir electrones al ánodo en función de su potencial (Kato Marcus et al, 2007; Torres et al, 2008; Lee et al, 2009). De acuerdo al potencial de trabajo (0.2 V *vs* Ag/AgCl) y al  $E_{KA}$  (- 0.24 V *vs* Ag/AgCl), el  $\Delta E_{e/aceptor} = E_{ánodo} - E_{KA} = 0.44$  V. En consecuencia, el  $\Delta G_{e/aceptor} = - F \cdot \Delta E_{e/aceptor} = - 42.45 \frac{\text{kJ}}{\text{mol } e^-} = - 339.6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol acetato}}$ .

Con la información precedente,  $\Delta G_{\text{catabólico}} = \Delta G_{\text{cupla daora}} + \Delta G_{\text{cupla aceptora}} = - 587.5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol acetato}}$ .

## Cálculo de $\Delta G_{\text{disipación}}$

Para producir nueva biomasa los microorganismos utilizan parte de la energía ganada en el proceso catabólico, mientras que otra parte es empleada en procesos de mantenimiento celular ( $m_{Ac}$ ) y/o disipada como energía libre ( $\Delta G_{\text{disipación}}$ ). Se ha demostrado que el  $\Delta G_{\text{disipación}}$  es independiente de la naturaleza del aceptor electrónico, así como también del tipo de microorganismo involucrado y/o de la naturaleza del dador electrónico (von Stockar et al, 2006). Esto ha revelado la existencia de un proceso disipativo adaptado durante la evolución microbiana, que conduce a un equilibrio entre la velocidad de crecimiento y la cantidad de microorganismos que se desarrollan. Sin embargo, el  $\Delta G_{\text{disipación}}$  depende de la cantidad de átomos de carbono presentes en el dador electrónico, así como también de su grado de reducción (cantidad de electrones disponibles en la reacción de oxidación por mol de carbono del compuesto). Esto ha llevado al desarrollo de funciones de correlación empíricas para estimar los valores de  $\Delta G_{\text{disipación}}$  en sistemas microbianos. Para un proceso de crecimiento a partir de acetato (2 átomos de carbono y un grado de reducción  $\delta_C = 4 \frac{\text{mol } e^-}{\text{mol C acetato}}$ ), el  $\Delta G_{\text{disipación}}$  puede estimarse a partir de (von Stockar et al, 2006; Heijnen y Kleerebezem, 2010):

$$- \Delta G_{\text{disipación}} = 200 + 18 (6 - N^{\text{roC}})^{1.8} + \exp [((3.8 - \delta_C)^2)^{0.16} (3.6 + 0.4 N^{\text{roC}})]$$

Lo que conduce a un  $\Delta G_{\text{disipación}} = - 432.12 \frac{\text{kJ}}{\text{mol C de X}}$ .

## Cálculo de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )

Esta velocidad fue calculada a partir de una función de correlación termodinámica, obtenida considerando la velocidad máxima de transporte electrónico en la cadena respiratoria como el factor limitante en el proceso de producción de energía catabólica (Heijnen y Kleerebezem, 2010). De acuerdo con dicha función, para un proceso anaeróbico a 30°C se tiene:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{[3 \frac{(-\Delta G_{\text{catabólico}})}{\delta_{\text{acetato}}} - 3.3]}{-\Delta G_{\text{disipación}}} \cdot \exp \left[ \frac{-69000}{R} \left( \frac{1}{303} - \frac{1}{298} \right) \right]$$

donde  $R = 8.31 \frac{\text{J}}{\text{K.mol}}$  y  $\delta_{\text{acetato}}$  es el grado de reducción por mol de acetato ( $\delta_{\text{acetato}} = 8 \frac{\text{mol e}^-}{\text{mol acetato}}$ ).

De acuerdo con los valores obtenidos para  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  y  $\Delta G_{\text{disipación}}$ ,  $\mu_{\text{máx}} = 0.795 \text{ h}^{-1}$ . Este valor podría parecer *a priori* elevado comparado con otras velocidades máximas de crecimiento de microorganismos electro-activos en condiciones anaeróbicas; por ejemplo,  $0.15 \text{ h}^{-1}$  para cultivos planctónicos de *G. sulfurreducens* consumiendo acetato (Esteve-Núñez et al, 2005) o  $0.1 \text{ h}^{-1}$  para *biofilms* de *G. sulfurreducens* crecidos sobre electrodos de oro (Yoho et al, 2014). Sin embargo, la máxima velocidad de crecimiento depende fuertemente de las condiciones de trabajo, como por ejemplo el tipo de aceptor electrónico (soluble o insoluble), el crecimiento asistido por potenciostato o no, el potencial del electrodo (en sistemas polarizados), la temperatura, entre otros. En los ejemplos mencionados, los valores más bajos de velocidad pueden ser justificados por la utilización de aceptores electrónicos solubles (fumarato) sin asistencia por polarización (Esteve-Núñez et al., 2005) y/o por el uso de polarización pero a potenciales considerablemente más bajos que los utilizados en nuestro estudio ( $-0.217 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ), lo que conduce a bajos valores de  $\Delta G_{\text{catabólico}}$  y, consecuentemente, de  $\mu_{\text{máx}}$ . De hecho, cuando se consideran *biofilms* bacterianos electro-activos (*G. sulfurreducens*) crecidos a temperaturas y potenciales de polarización comparables a las de nuestro sistema (Schrott et al, 2014), se obtienen velocidades máximas de crecimiento similares a las calculadas de acuerdo con la aproximación termodinámica abordada. Asimismo, se han reportado, para *biofilms* electro-activos en condiciones de flujo continuo de materia orgánica, velocidades máximas ( $\mu_{\text{máx}} = 0.827 \text{ h}^{-1}$ ) en excelente acuerdo con los valores calculados (Ledezma et al, 2012).

Reemplazando finalmente cada una de las cantidades calculadas en la expresión de la velocidad de crecimiento (Ecuación 4.3, Capítulo 4), se obtiene la siguiente relación:

$$\mu = (0.795 \text{ h}^{-1}) \cdot \exp \left( - \frac{2.86 \times 10^{-4} \frac{\text{mol acetato}}{\text{L}}}{[\text{acetato}]} \right) \quad \text{Ecuación A1.1}$$

## Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo

A partir de esta expresión se estimaron las velocidades de crecimiento de los microorganismos electro-activos en función de la concentración de acetato para cada concentración de orina. En la **Tabla A1.1** se muestran las cantidades estequiométricas de acetato calculadas a partir de la fermentación de creatinina, y la concentración final de acetato utilizada para estimar la carga teórica recuperada para cada concentración de orina.

**Tabla A1.1**

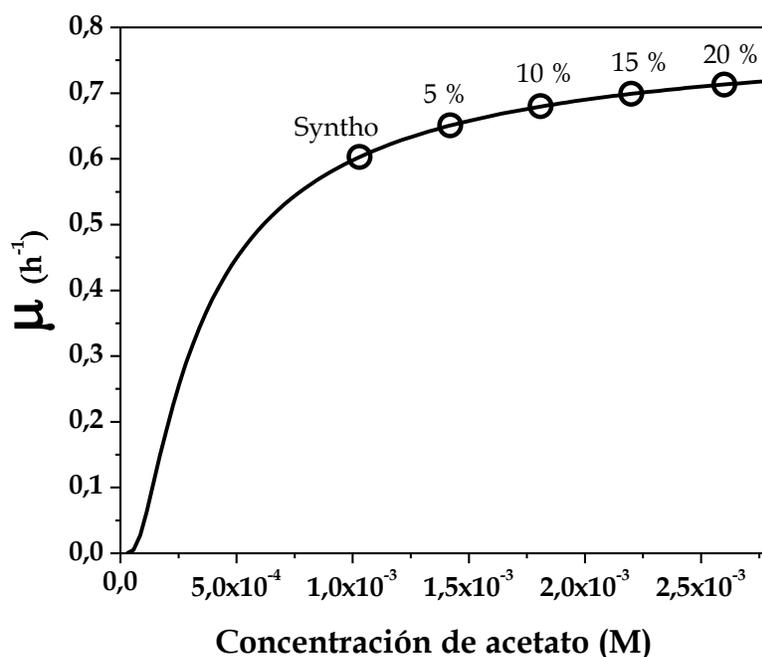
Concentraciones de creatinina y acetato en función de la concentración de orina:  $[\text{creatinina}]_{\text{orina}}$  corresponde a la concentración de creatinina en la orina;  $[\text{acetato}]_{\text{creatinina}}$  representa la concentración teórica de acetato que sería generada por fermentación de creatinina;  $[\text{acetato}]_{\text{orina}}$  corresponde a la concentración de acetato en la orina; y  $[\text{acetato}]_{\text{Syntho}}$  representa la concentración de acetato aportada por Syntho.

[orina] (% v/v)	[Creatinina] <sub>orina</sub> (mM)	[acetato] <sub>creatinina</sub> (mM)	[acetato] <sub>orina</sub> (mM)	[acetato] <sub>Syntho</sub> (mM)	[acetato] <sub>total</sub> (mM)
0 (Syntho)	-	-	-	1.03	1.03
5	0.52	0.42	0.02	0.98	1.42
10	1.04	0.83	0.05	0.93	1.81
15	1.56	1.25	0.07	0.88	2.2
20	2.08	1.66	0.09	0.82	2.57

Al considerar la expresión de velocidad de crecimiento debe tenerse en cuenta que la misma fue desarrollada a partir de un análisis estadístico para bacterias *planctónicas*. Sin embargo, de la misma manera que la expresión de Monod - derivada para cultivos planctónicos - ha sido adaptada y utilizada en *biofilms* electro-activos (Lee et al, 2009); también es posible abordar el crecimiento microbiano en *biofilm* a partir de la **Ecuación A1.1**. Para esto, se consideró la diferencia conceptual entre dinámica de crecimiento microbiano (dada por  $\mu$ ) y dinámica de consumo de sustrato (dada por  $q$ ). Solo este último parámetro representa un indicador del desempeño fisiológico de los microorganismos (Heffernan et al, 2009), vinculándose directamente con la velocidad de producción de carga eléctrica. Esta diferencia puede verse claramente a partir de la **Ecuación 4.6**, en donde velocidades de crecimiento similares pueden conducir a velocidades de consumo de sustrato diferentes, dependiendo del rendimiento máximo en microorganismos ( $Y_{Ac,X}^{max}$ ) y de los requerimientos energéticos de mantenimiento celular ( $m_{Ac}$ ), estos últimos dependientes de las condiciones propias de cada cepa y del estrés al que los microorganismos estén sometidos.

Respecto a la **dinámica de crecimiento**, no hay consenso en la literatura al comparar microorganismos planctónicos y aquellos formadores de *biofilms*. De hecho, algunos estudios han mostrado velocidades de crecimiento de *biofilms* superiores a las de los microorganismos suspendidos

en el medio de cultivo (Ellwood et al, 1982; Bester et al, 2005), mientras que otros han reportado lo opuesto (Caldwell y Lawrence, 1986; Barton et al., 1996). Por este motivo, se han utilizado frecuentemente cinéticas de crecimiento planctónico en modelos de bio-reactores para simular el crecimiento microbiano de *biofilms* (Shareefdeen et al, 1993; Mirpuri et al., 1997). Sin embargo, en cuanto a la **dinámica de consumo de sustrato**, no hay dudas que los fenotipos planctónicos superan a sus contrapartes sésiles (*biofilm*) (Mirpuri et al, 1997; Kurzbaum et al, 2010). De esta forma, el modelo propuesto aproxima la velocidad de crecimiento bacteriano a partir de la **Ecuación A1.1**, pero adoptando una velocidad efectiva de consumo de acetato para el *biofilm* (denominada  $q_{Ac,efectiva}$ ), con el fin de contemplar las diferencias en esta variable respecto al escenario planctónico. La **Figura A1.1** muestra la velocidad de crecimiento microbiano electro-activo obtenida a partir de la **Ecuación A1.1** en función de la concentración total de acetato para cada concentración de orina.



**Figura A1.1.** Velocidad de crecimiento en función de la concentración de acetato. Sobre la curva se indican los valores correspondientes a cada concentración de orina.

## **Etapas 2: cálculo de la velocidad de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ )**

Una vez estimada la velocidad de crecimiento, ésta fue utilizada para determinar la velocidad de consumo de acetato (segunda etapa, **Figura 4.27**). Como se mencionó, la velocidad a la que el acetato es consumido (y luego transformado en carga eléctrica) depende además de la máxima cantidad de

## Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo

microorganismos capaces de crecer bajo las condiciones utilizadas ( $Y_{Ac,X}^{max}$ ), así como también del flujo de energía necesario para el mantenimiento celular ( $m_{Ac}$ ). Estos parámetros pueden ser calculados a partir de leyes de primeros principios. En particular,  $Y_{Ac,X}^{max}$  se calculó a partir de un balance en el grado de reducción (conservación de electrones) entre el dador electrónico y la biomasa formada, de acuerdo con estudios de literatura (Heijnen y Kleerebezem, 2010; Picioreanu et al, 2007):

$$Y_{Ac,X}^{max} = \frac{(-\Delta G_{\text{catabólico}})}{(-\Delta G_{\text{disipación}}) + \frac{\delta_{\text{mol C de X}}}{\delta_{\text{mol C acetato}}} (-\Delta G_{\text{catabólico}})}$$

$$Y_{Ac,X}^{max} = 0.397 \frac{\text{mol C de X}}{\text{mol C acetato}}$$

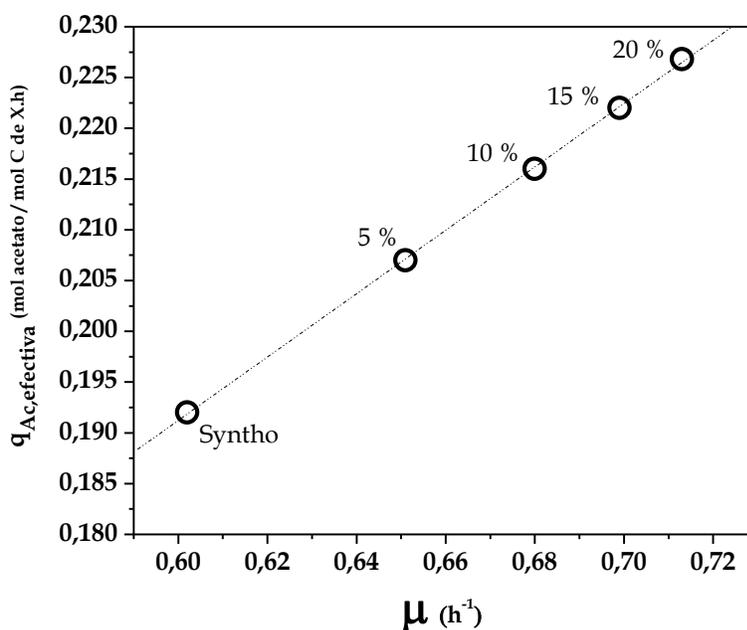
donde  $\delta_{\text{mol C de X}}$  es el grado de reducción por mol de carbono de biomasa formada ( $4.2 \frac{\text{mol e}^-}{\text{mol C de X}}$ , para una biomasa de composición elemental  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$  y considerando  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno); y  $\delta_{\text{mol C acetato}}$  es el grado de reducción de acetato por mol de carbono ( $4 \frac{\text{mol e}^-}{\text{mol C de acetato}}$ ) (Heijnen y Kleerebezem, 2010).

Por su parte,  $m_{Ac}$  se determinó de acuerdo con una correlación de tipo Arrhenius (Heijnen and Kleerebezem, 2010; Korth et al., 2015):

$$m_{Ac} = \frac{3.3}{-\Delta G_{\text{cat}}} \cdot \exp \left[ -\frac{69000}{R} \left( \frac{1}{303} - \frac{1}{298} \right) \right]$$

$$m_{Ac} = 0.018 \frac{\text{mol C acetato}}{\text{mol C de X} \cdot \text{h}}$$

Una vez determinados estos parámetros, se estimó finalmente la velocidad efectiva de consumo de acetato ( $q_{Ac,efectiva}$ ) para cada velocidad de crecimiento. Respecto de esta dinámica *efectiva* de consumo, y de acuerdo con estudios de la literatura que comparan velocidades de utilización de sustrato para *biofilms* y microorganismos en suspensión, se consideró la actividad en el *biofilm* como un 20-30% de la correspondiente a bacterias planctónicas (Mirpuri et al, 1997, Kurzbaum et al, 2010). La **Figura A1.2** muestra la relación entre estas variables, de acuerdo con la ecuación de Pirt (**Ecuación 4.6**, Capítulo 4).



**Figura A1.2.** Velocidad *efectiva* de consumo de acetato en función de la velocidad de crecimiento de acuerdo con la ecuación de Pirt.

### Etapa 3: cálculo de las densidades de corriente (*j*)

Las velocidades efectivas de consumo de acetato se utilizaron en la etapa final de cálculo (tercera etapa, **Figura 4.27**) para estimar las densidades de corriente (*j*, **Ecuación 4.4**, Capítulo 4) para cada concentración de orina. La **Tabla A1.2** muestra los valores obtenidos.

**Tabla A1.2**

Densidad de corriente calculada y experimental para cada concentración de orina. Se indica la velocidad efectiva de consumo de acetato ( $q_{Ac,efectiva}$ ) y la cantidad de biomasa electro-activa (*X*) expresada por mol de carbono.

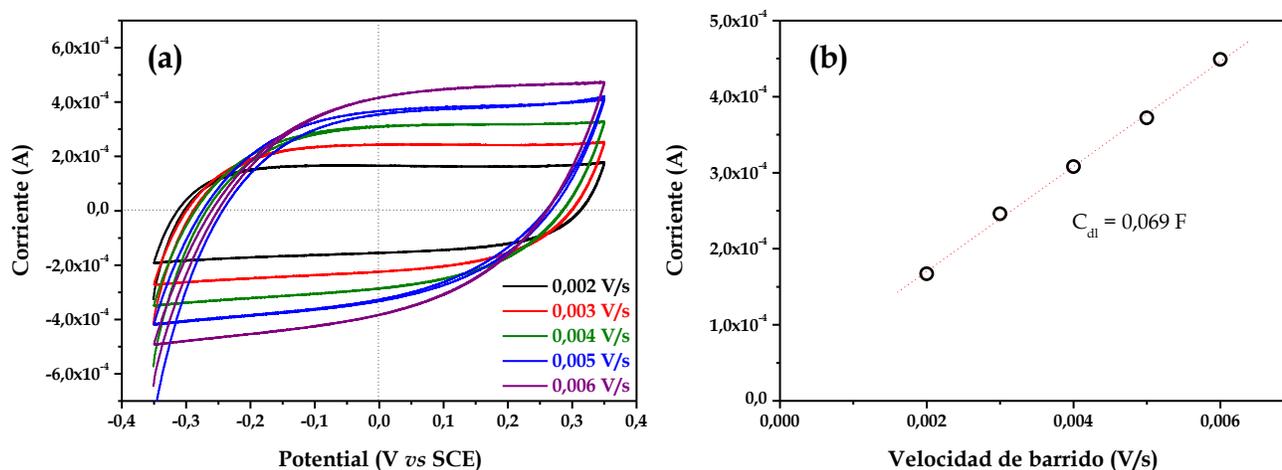
[orina] (% v/v)	$q_{Ac,efectiva}$ ( $\frac{mol\ Ac}{mol\ de\ C\ de\ X \cdot h}$ )	$X_{experimental}$ ( $\times 10^{-5}\ C \cdot mol$ )	$j_{calculada}$ ( $\frac{A}{m^2}$ )	$j_{experimental}$ ( $\frac{A}{m^2}$ )
0 (Syntho)	0.192	1.75	<b>0.83</b>	0.68 ± 0.07
5	0.207	4.44	<b>2.28</b>	2.33 ± 0.85
10	0.216	5.33	<b>2.85</b>	3.08 ± 0.53
15	0.222	5.76	<b>3.17</b>	3.20 ± 0.64
20	0.227	5.99	<b>3.37</b>	3.56 ± 0.21

Las densidades de corriente calculadas se graficaron finalmente en superposición con los valores experimentales. Esto se muestra en la **Figura 4.28** (Capítulo 4).

## Anexo B

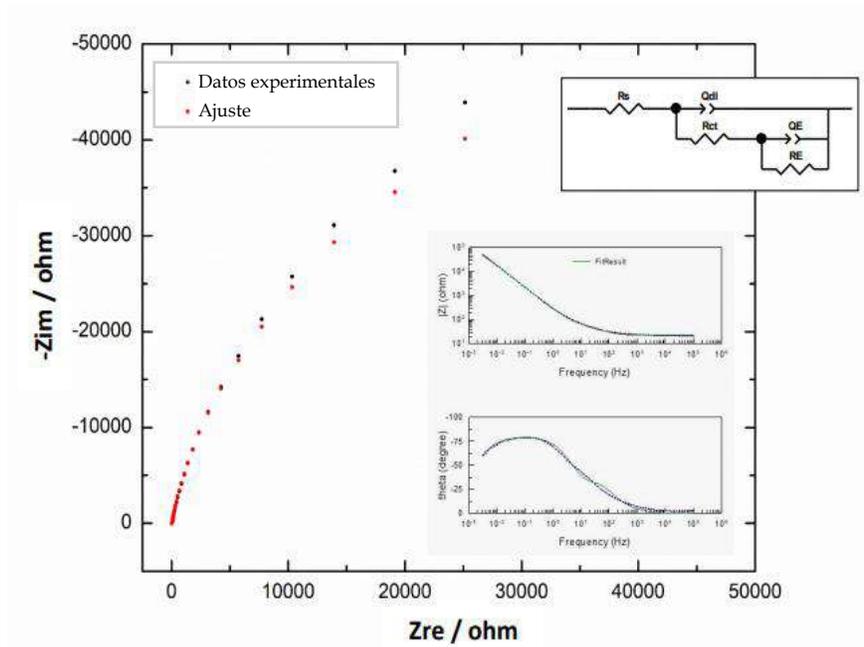
# Determinación de áreas superficiales por unidad de volumen

El área superficial volumétrica de los electrodos porosos se calculó a partir de valores de capacitancia de doble capa eléctrica ( $C_{dl}$ ) obtenidos por voltametría cíclica (CV). Las voltametrías se realizaron en un reactor de tres electrodos utilizando un potenciostato VoltaLab10 PGZ-100 (Radiometer Analytical). Se utilizó una solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1 M como electrolito soporte, un electrodo de Calomel saturado (SCE) como referencia, un cable de platino bobinado como contra-electrodo y cada uno de los electrodos de  $\text{Ti}_4\text{O}_7$  preparados como electrodos de trabajo (evaluados por separado). Los estudios se realizaron empleando diferentes velocidades de barrido, como muestra la **Figura B.1 (a)** (en este caso, a modo de ejemplo, para el electrodo E-14), en una ventana de potencial de -0,35 V/0,35 V frente a SCE. Los valores de  $C_{dl}$  se determinaron por regresión lineal de las curvas de corriente de carga (A) (medida a 0 V vs SCE) obtenidas frente a la velocidad de barrido (V/s) (**Figura B.1 (b)**).



**Figura B.1.** Determinación de la capacitancia de doble capa eléctrica ( $C_{dl}$ ) para el electrodo E-14. **(a)** Corriente de carga vs. potencial (SCE) para diferentes velocidades de barrido (de 0.002 V/s a 0.006 V/s), **(b)** Corriente de carga (medida a 0 V frente a SCE) en función de la velocidad de barrido. La leyenda en (b) muestra la  $C_{dl}$  calculada a partir de la pendiente de la regresión lineal.

Las áreas electroquímicamente activas se calcularon finalmente a partir de los valores de  $C_{dl}$ , dividiendo los mismos por el valor correspondiente a la capacitancia efectiva ( $C_{efectiva}$ ) del  $Ti_4O_7$ . En la mayor parte de los estudios que emplean electrodos de  $Ti_4O_7$  se ha utilizado una  $C_{efectiva}$  estándar de  $60 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Sin embargo, este valor - correspondiente a superficies de óxidos metálicos genéricos - no es necesariamente aplicable a cualquier óxido independientemente de la naturaleza del ion metálico implicado y/o el grado de hidratación de su superficie. Debido a esto, se calculó en primer lugar la  $C_{efectiva}$  correspondiente *estrictamente* al material  $Ti_4O_7$  bajo las condiciones experimentales utilizadas. Para esto se realizaron estudios de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) (Gamry Ref600), bajo modulación de corriente alterna entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^{-2}$  Hz. Para las medidas se emplearon celdas de tres electrodos, en una solución 0.1 M de  $Na_2SO_4$  como electrolito soporte, un SCE como referencia y un cable bobinado de platino como contra-electrodo. Para simplificar el análisis se utilizó, como electrodo de trabajo, una estructura no porosa de  $Ti_4O_7$ , con una superficie expuesta de  $0,64 \text{ cm}^2$ . Las curvas de impedancia experimentales se ajustaron con un modelo de circuito equivalente (EC) desarrollado utilizando los programas ZView 3.4e y ZSimpWin 3.21. La **Figura B.2** muestra la curva de impedancia obtenida (en sus representaciones habituales de Nyquist y Bode) y el ajuste correspondiente.



**Figura B.2.** Representaciones de Nyquist y Bode (*inset*) de los datos experimentales de EIS para el electrodo de  $Ti_4O_7$  no poroso. El circuito equivalente (EC) utilizado para ajustar los datos experimentales se muestra en la parte superior derecha.

El circuito equivalente (EC) utilizado para el ajuste se compone de una resistencia óhmica correspondiente a la solución ( $R_s$ ), una pseudo-capacitancia de doble capa ( $Q_{dl}$ , que representa la acumulación de especies cargadas en la superficie del electrodo), la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) en la doble capa, y dos parámetros asociados al electrodo: la resistencia al movimiento de portadores de carga ( $R_E$ ) y una pseudo-capacitancia asociada a la polarización del material ( $Q_E$ ), asociada a la separación y acumulación de especies cargadas en su superficie. El modelo EC utiliza elementos de fase constante (CPE) en lugar de capacitancias puras, lo que se representa de la siguiente manera:

$$Z_{CPE} = 1/Q(j\omega)^\alpha \quad \text{Ecuación B1}$$

donde la pseudo-capacidad ( $Q$ ) y el parámetro de inhomogeneidad ( $\alpha$ ) son los parámetros CPE independientes de la frecuencia. En la Ecuación B1,  $j$  es la densidad de corriente y  $\omega$  la frecuencia de la señal de impedancia sinusoidal de corriente alterna. Los valores de ajuste de los resultados de EIS, de acuerdo con el circuito equivalente mostrado en la **Figura B.2**, se muestran en la **Tabla B.1**.

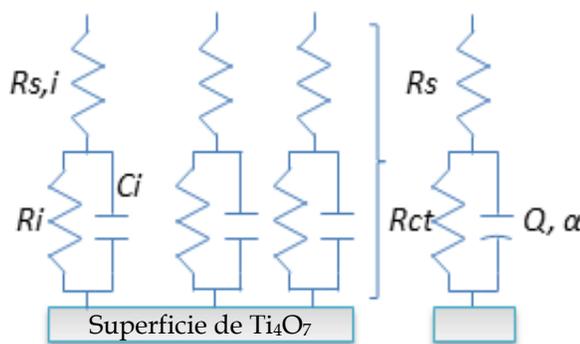
**Tabla B.1**

Valores obtenidos para cada uno de los parámetros del circuito equivalente (EC) utilizado para el ajuste de los puntos experimentales de la curva de EIS (Figura B.2).

Elementos EC	Valor	Error (%)
$R_s (\Omega)$	22.85	1.3
$R_{ct} (\Omega)$	66.98	10
$Q_{dl} (1/\Omega \cdot s^\alpha)$	$2.69 \times 10^{-4}$	12
$\alpha_{dl}$	0.86	4.8
$Q_E (1/\Omega \cdot s^\alpha)$	$3.85 \times 10^{-4}$	13
$\alpha_E$	0.93	4.4
$R_E (\Omega)$	$1.38 \times 10^2$	7

Una vez ajustados los puntos experimentales con el circuito equivalente general, se aplicó un modelo más específico para abordar (de manera más precisa) la interpretación física particular del sistema electroquímico estudiado. Para esto, los valores de ajuste mostrados en la **Tabla B.1** fueron utilizados como parámetros de alimentación (semilla) del nuevo modelo. De acuerdo con las propiedades atribuidas a la superficie del óxido  $Ti_4O_7$ , y debido a que no hay formación de ningún tipo de recubrimiento sobre el electrodo, se utilizó el Modelo de Brug (Brug et al, 1984) para determinar la  $C_{efectiva}$  del material. Este modelo suele ser utilizado para el análisis de superficies de electrodos que pueden desarrollar fenómenos de dispersión constantes de tiempo (B.Hirschron et al, 2010).

La **Figura B.3** muestra la representación de este modelo, que considera una distribución de elementos eléctricos sobre la superficie del electrodo de acuerdo con los fenómenos físicos asociados a la interfaz electrodo/solución.



**Figura B.3.** Representación esquemática del modelo de *distribución superficial* (Brug), donde  $R_s$  es la resistencia óhmica de la solución (Tabla B.1),  $R_{ct}$  es la resistencia a la transferencia de carga en la doble capa (Tabla B.1),  $Q$  es la pseudo-capacitancia de la doble capa (en particular, en este caso,  $Q = Q_{dl}$ , Tabla B.1) y  $\alpha$  es el parámetro de inhomogeneidad ( $\alpha_{dl}$ , Tabla B.1). El subíndice  $i$  denota cada uno de los elementos distribuidos en la superficie del electrodo.

## Determinación de áreas superficiales por unidad de volumen

A partir del análisis de Brug para este sistema, la  $C_{\text{efectiva}}$  asociada a la  $Q_{\text{dl}}$  puede expresarse como:

$$C_{\text{efectiva}} (\text{F}/\text{cm}^2) = Q_{\text{dl}}^{(1/\alpha)} \cdot (R_s^{-1} + R_{\text{ct}}^{-1})^{(\alpha-1)/\alpha} \quad \text{Ecuación B2}$$

Esta ecuación se ha utilizado ampliamente para determinar los valores  $C_{\text{efectiva}}$  para electrodos porosos, películas poliméricas y/o películas pasivadas (Jovic et al, 2003; Jurczakowski et al, 2004; Harrington et al, 2008).

El análisis descrito fue realizado para cada uno de los electrodos evaluados. La superficie específica por unidad de volumen se calculó finalmente como el cociente de los valores de  $C_{\text{dl}}$  (diferentes para cada electrodo) y  $C_{\text{efectiva}}$  (único para el material  $\text{Ti}_4\text{O}_7$ ), de acuerdo con el volumen de electrodo sumergido en la solución durante los experimentos de voltametría. La Tabla 5.3 (Capítulo 5) resume los valores obtenidos en cada caso.

# Anexo C

## Código de R

En este anexo se proporciona el código utilizado para el tratamiento de los datos experimentales mostrados en el Capítulo 6 (espaciados interlaminares, concentraciones de orina y densidades volumétricas de corriente) para la construcción de las superficies de respuesta. Se utilizó el software libre 'R' como entorno de programación.

```
#Prologue #####
# IMPORTANT: REOPEN THIS FILE WITH ENCONDING UTF-8 (to load especial characters in plots)
# Libraries
library(rsm)
library(plotly)
library(ggplot2)
library(ggrepel)
library(viridis)
library(readr)
#Loading raw data
urine <- c(0,0,0,0,0,5,5,5,5,5,5,10,10,10,10,10,15,15,15,15) # concentrations, %
spacing <- c(5,10,12,14,19,5,10,12,14,19,27,12,14,19,27,12,14,19,27) # in micrometers
j_current <- c(214,748,504,433,232,1547,1823,2802,1520,1417,1354,5214,3554,2798,2175,3555,3016,1916,1623) #in
A.m^-3
Results <- data.frame(urine,spacing,j_current)
# FIRST BATCH (fb) ANALYSIS#####
## Copying data corresponding to first batch#####
Results.fb <- Results[!(Results$spacing==12 | Results$spacing==14),]
```

## Código de R

```
# Codification of variables for rsm analysis, by identifying half width and minimum of each independent variable
x1.fb.hw = (max(Results.fb[1])-min(Results.fb[1]))/2 #hw = half width, x1 represents codified urine
x2.fb.hw = (max(Results.fb[2])-min(Results.fb[2]))/2 #hw = half width, x2 represents codified dll
x1.fb.min = min(Results.fb[1]) # min = minimum
x2.fb.min = min(Results.fb[2])
x1.fb.max = max(Results.fb[1]) # maximum is useful for graphical representations later
x2.fb.max = max(Results.fb[2])
# Data is finally codified in a new table such that x1 and x2 range from -1 to +1
Results.fb.cod <- coded.data(Results.fb,
                             x1 ~ (urine - (x1.fb.min+x1.fb.hw))/x1.fb.hw, # x1 = codified urine concentration
                             x2 ~ (spacing - (x2.fb.min+x2.fb.hw))/x2.fb.hw) # x2 = codified dll, inter-laminar spacing
## running rsm analysis ####
Results.fb.cod.rsm <- rsm(j_current ~ SO(x1,x2), data = Results.fb.cod) #Second order regression
summary(Results.fb.cod.rsm)
Results.fb.cod.rsm
# bar graph of polynomial coefficients
## Extractiong coefficients from rsm
Results.fb.cod.rsm.reg <- summary(Results.fb.cod.rsm)$coefficients
Results.fb.cod.rsm.reg.coeff <- Results.fb.cod.rsm.reg[,1] #First column corresponds to coefficients
Results.fb.cod.rsm.reg.sderror <- Results.fb.cod.rsm.reg[,2] #Second column corresponds to standard error
Results.fb.cod.rsm.reg.terms <- c('x0','x1','x2','x12','x11','x22') #Naming coefficients
Results.fb.cod.rsm.reg.df <- data.frame(Results.fb.cod.rsm.reg.terms,
                                       Results.fb.cod.rsm.reg.coeff,
                                       Results.fb.cod.rsm.reg.sderror) #Building dataframte
Results.fb.cod.rsm.reg.df$ymin = Results.fb.cod.rsm.reg.df$Results.fb.cod.rsm.reg.coeff-
Results.fb.cod.rsm.reg.df$Results.fb.cod.rsm.reg.sderror
Results.fb.cod.rsm.reg.df$ymax = Results.fb.cod.rsm.reg.df$Results.fb.cod.rsm.reg.coeff+
Results.fb.cod.rsm.reg.df$Results.fb.cod.rsm.reg.sderror
## Making graph
g <- ggplot(data = Results.fb.cod.rsm.reg.df, aes(x=Results.fb.cod.rsm.reg.terms, y=Results.fb.cod.rsm.reg.coeff))+
  geom_bar(stat="identity")+
  geom_errorbar(aes(ymin=ymin,
                   ymax=ymax,
                   size=1, width=0.5))+
  theme_bw()+
  labs(x = "Coefficient type", y = "Coefficient value")
g
```

## Anexo C

```
# Isoresponse plot
contour(Results.fb.cod.rsm, ~ x1 + x2, at = summary(Results.fb.cod.rsm)$canonical$xs)
# 3D perspective plot
persp(Results.fb.cod.rsm, x2 ~ x1,
      zlab = "current density (A/m³)",
      contours = list(z = "bottom", col = "colors"),
      at = c(summary(Results.fb.cod.rsm)$canonical$xs)),
      theta = -15, r = 100, phi = 20)
### Using regression equation for subsequent plots #####
Results.fb.cod.eq <- function(x1.corr, x2.corr){
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[1]+
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[2]*x1.corr+
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[3]*x2.corr+
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[4]*x1.corr*x2.corr+
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[5]*x1.corr^2+
  Results.fb.cod.rsm$coefficients[6]*x2.corr^2
}
# Adding to copied dataframe (Results.fb) the codified variables
Results.fb$x1reg <- (Results.fb$urine - (x1.fb.min+x1.fb.hw))/x1.fb.hw # codified urine
Results.fb$x2reg <- (Results.fb$spacing - (x2.fb.min+x2.fb.hw))/x2.fb.hw # codified spacing
# With codified data, current densities predicted by the adjusted equation can be computed
Results.fb$j_current_predicted <- Results.fb.cod.eq(Results.fb$x1reg, Results.fb$x2reg)
# New column with tag for each point in Results.fb
Results.fb$Tag <- paste("Urine:", Results.fb$urine, "&", "Spacing:", Results.fb$spacing, sep = " ")
# Plotting predicted vs. recorded current densities
fit.fb.g <- ggplot(data=Results.fb, aes(x=j_current_predicted/1000, y=j_current/1000))+
  geom_abline(intercept = 0, slope = 1, color = "gray", linewidth = 1)+
  geom_point(aes(color=as.factor(spacing)),size = 4)+
  geom_label_repel(aes(label = paste("[urine]:",urine,"%")),
                  size = 3) +
  theme_bw()+
  xlim(0,3)+
  ylim(0,3)+
  labs(x = expression("j"[predicted]*" (kA.m-3 ")),
       y = expression("j"[experimental]*" (kA.m-3 "))+
  guides(color = guide_legend(title = expression("d"[11]*" (μm)")))+
  theme(axis.text=element_text(size=14, face="bold"),
```

## Código de R

```
axis.title=element_text(size=16,face="bold"),
legend.position = c(0.9, 0.2))+
scale_colour_viridis_d(option = "viridis") #viridis scale
fit.fb.g
### 3D plot #####
## Creating a matrix of z-values (predicted density current), needed for 3d graph in plotly.
res.res.fb = 0.01 # resolution of the matrix, in codified units
res.lim.fb = 1 #Upper and lower limits of the matrix, in terms of codified values (in case different 'zoom' levels need to be
visualized)
x1.corr.fb = seq(from = -res.lim.fb, to = res.lim.fb, by = res.res.fb) #Sequence of x1 values (codified urine concentration)
x2.corr.fb = seq(from = -res.lim.fb, to = res.lim.fb, by = res.res.fb) #Sequence of x2 values (codified inter-laminar spacing)
matrix.fb <- data.frame(x1.corr.fb,x2.corr.fb)
# Creating matrix of z-values (predicted current density) from rsm equation
z.fb.corr <- outer(x1.corr.fb,x2.corr.fb,Results.fb.cod.eq)
##### un-codifying x1 and x2 to map matrix in 3D plot #####
x1.fb.cod.step = res.res.fb*x1.fb.hw # resolution of x1 in terms of urine concentration unit (%)
x2.fb.cod.step = res.res.fb*x2.fb.hw # resolution of x2 in terms of inter-laminar spacing unit (micrometer)
x1.fb.decod.min = x1.fb.min-((res.lim.fb-1)/res.res.fb)*x1.fb.cod.step # minimum of un-codified x1 (must be equal to line
23)
x2.fb.decod.min = x2.fb.min-((res.lim.fb-1)/res.res.fb)*x2.fb.cod.step # minimum of un-codified x2
x1.fb.decod.max = x1.fb.max+((res.lim.fb-1)/res.res.fb)*x1.fb.cod.step # maximum of un-codified x1
x2.fb.decod.max = x2.fb.max+((res.lim.fb-1)/res.res.fb)*x2.fb.cod.step # maximum of un-codified x2
matrix.fb$x1.fb.decoded = seq(from = x1.fb.decod.min, to = x1.fb.decod.max, by = x1.fb.cod.step) # Sequence of un-codified
x1 values
matrix.fb$x2.fb.decoded = seq(from = x2.fb.decod.min, to = x2.fb.decod.max, by = x2.fb.cod.step) # Sequence of un-codified
x2 values
### Plotly graph#####
Sur.fb <- plot_ly(x = ~matrix.fb$x2.fb.decoded, y = ~matrix.fb$x1.fb.decoded, z = ~z.fb.corr/1000,
type = "surface", colors = rainbow(6, rev = T),
hovertemplate = paste(' <b>d<sub>ll</sub></b>: % {x} (µm) <br />',
'<b>[urine]</b>: % {y} (% v/v)<br />',
'<b>j</b>: % {z} (kA.m-3)<extra></extra>')
) %>%
layout(scene = list(
xaxis = list(title="<b>d<sub>ll</sub></b> (µm)</b>",
showgrid = T,
color="black"),
```

## Anexo C

```
yaxis = list(title="<b>[urine] (% v/v)</b>",
             showgrid = T,
             range = list(15,0),
             nticks= 4,
             color="black"),
zaxis = list(title="<b>j (kA.m-3)</b>",
             range = list(0.01,2.6),
             showgrid =T,
             nticks = 10,
             tickangle = 30,
             color="black")) %>%
add_surface(contours = list(
  z = list(
    show=T,
    usecolormap=TRUE,
    highlightcolor="#ff0000",
    project=list(z=TRUE)
  )
),
  showscale = FALSE) %>%
colorbar(title = "<b>j (kA.m-3)</b>")
Sur.fb
# SECOND BATCH ANALYSIS #####
## Codification of variables for rsm analysis, by identifying half width and minimum of each independent variable
x1.hw = (max(Results[1])-min(Results[1]))/2 #hw = half width, x1 represents codified urine
x2.hw = (max(Results[2])-min(Results[2]))/2 #hw = half width, x2 represents codified dll
x1.min = min(Results[1]) #min = minimum
x2.min = min(Results[2])
x1.max = max(Results[1]) # maximum is useful for graphical representations later
x2.max = max(Results[2])
# Data is finally codified in a new table such that x1 and x2 range from -1 to +1
Results.cod <- coded.data(Results,
                          x1 ~ (urine - (x1.min+x1.hw))/x1.hw, # x1 = codified urine concentration
                          x2 ~ (spacing - (x2.min+x2.hw))/x2.hw) # x2 = codified dll, inter-laminar spacing
Results.cod
## running rsm analysis #####
Results.cod.rsm <- rsm(j_current ~ FO(x1,x2) + PQ(x1,x2), data = Results.cod)
```

## Código de R

```
summary(Results.cod.rsm)
Results.cod.rsm
#Results.cod.SO.rsm <- rsm(j_current ~ SO(x1,x2), data = Results.cod)
#summary(Results.cod.SO.rsm)
# Isoresponse plot
contour(Results.cod.rsm, ~ x1 + x2, at = summary(Results.cod.rsm)$canonical$xs)
# 3D perspective plot
persp(Results.cod.rsm, x2 ~ x1,
      zlab = "current density (A/m³)",
      contours = list(z = "bottom", col = "colors"), # posicion y color
      at = c(summary(Results.cod.rsm)$canonical$xs),
      theta = -15, r = 100, phi = 20)
### Using regression equation for subsequent plots ####
Results.eq <- function(x1reg, x2reg){
  Results.cod.rsm$coefficients[1]+
  Results.cod.rsm$coefficients[2]*x1reg+
  Results.cod.rsm$coefficients[3]*x2reg+
  Results.cod.rsm$coefficients[4]*x1reg^2+
  Results.cod.rsm$coefficients[5]*x2reg^2}
# Adding the codified variables to original dataframe (Results)
Results$x1reg <- (Results$urine - (x1.min+x1.hw))/x1.hw # codified urine concentration
Results$x2reg <- (Results$spacing - (x2.min+x2.hw))/x2.hw # codified dll (spacing)
# With codified data, current densities predicted by the adjusted equation can be computed
Results$j_current_predicted <- Results.eq(Results$x1reg, Results$x2reg)
# New column with tag for each point in Results
Results$Tag <- paste("Orina:", Results$urine, "&", "spacing:", Results$spacing, sep = " ")
# Plotting predicted vs. recorded current densities
fit.g <- ggplot(data=Results, aes(x=j_current_predicted/1000, y=j_current/1000))+
  geom_abline(intercept = 0, slope = 1, color = "gray", linewidth = 1)+
  geom_point(aes(color=as.factor(spacing)),size = 4)+
  geom_label_repel(aes(label = paste("[urine]:",urine,"%")),
                  size = 3) +
  theme_bw()+
  xlim(0,3.9)+
  ylim(0,5.5)+
  labs(x = expression("j"[predicted]*" (kA.m-3 ")),
       y = expression("j"[experimental]*" (kA.m-3 ")))
```

## Anexo C

```
guides(color = guide_legend(title = expression("dll" (μm))))+
theme(axis.text=element_text(size=14, face="bold"),
      axis.title=element_text(size=16,face="bold"),
      legend.position = c(0.1, 0.7))+
scale_colour_viridis_d(option = "viridis") #viridis scale
fit.g
## 3D plot #####
## Creating a matrix of z-values (predicted density current), needed for 3d graph in plotly.
res.res = 0.01 # resolution of the matrix, in codified units
res.lim = 1 #Upper and lower limits of the matrix, in terms of codified values (in case different 'zoom' levels need to be
visualized)
x1.corr = seq(from = -res.lim, to = res.lim, by = res.res) #Sequence of x1 values (codified urine concentration)
x2.corr = seq(from = -res.lim, to = res.lim, by = res.res) #Sequence of x2 values (codified inter-laminar spacing)
matrix <- data.frame(x1.corr,x2.corr)
# Creating matrix of z-values (predicted current density) from rsm equation
z.corr <- outer(x1.corr,x2.corr,Results.eq)
##### un-codifying x1 and x2 to map matrix in 3D plot #####
x1.cod.step = res.res*x1.hw # resolution of x1 in terms of urine concentration unit (%)
x2.cod.step = res.res*x2.hw # resolution of x2 in terms of inter-laminar spacing unit (micrometer)
x1.decod.min = x1.min-((res.lim-1)/res.res)*x1.cod.step # minimum of un-codified x1 (must be equal to line 123)
x2.decod.min = x2.min-((res.lim-1)/res.res)*x2.cod.step # minimum of un-codified x2
x1.decod.max = x1.max+((res.lim-1)/res.res)*x1.cod.step # maximum of un-codified x1
x2.decod.max = x2.max+((res.lim-1)/res.res)*x2.cod.step # maximum of un-codified x2
matrix$x1.decoded = seq(from = x1.decod.min, to = x1.decod.max, by = x1.cod.step) # Sequence of un-codified x1 values
matrix$x2.decoded = seq(from = x2.decod.min, to = x2.decod.max, by = x2.cod.step) # Sequence of un-codified x2 values
#### Plotly graph #####
Sur <- plot_ly(x = ~matrix$x2.decoded, y = ~matrix$x1.decoded, z = ~z.corr/1000,
              type = "surface", colors = rainbow(6, rev = T),
              hovertemplate = paste(' <b>d<sub>ll</sub></b>: % {x} (μm) <br />',
                                    '<b>[urine]</b>: % {y} (% v/v)<br />',
                                    '<b>j</b>: % {z} (kA.m-3)<extra></extra>')
              ) %>%
layout(scene = list(
  xaxis = list(title="<b>d<sub>ll</sub></b> (μm)</b>",
              showgrid = T,
              color="black"),
  yaxis = list(title="<b>[urine] (% v/v)</b>",
```

## Código de R

```
    showgrid = T,
    nticks = 4,
    range = list(15,0),
    color="black"),
zaxis = list(title="<b>j (kA.m-3)</b>",
    range = list(0.01,4),
    showgrid=T,
    nticks = 10,
    tickangle = 30,
    color="black"))) %>%
add_surface(contours = list(
  z = list(
    show=T,
    usecolormap=TRUE,
    highlightcolor="#ff0000",
    project=list(z=TRUE)
  )
),
showscale = FALSE) %>%
colorbar(title = "<b>j (kA.m-3)</b>"
```

# Producción científica

Los resultados obtenidos en esta Tesis fueron publicados en revistas científicas de alcance internacional y en congresos nacionales. A continuación se detalla esta producción:

## Artículos

- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Busalmen, J. P.; Romeo, H. E. 'Urine dilution with a synthetic wastewater (Syntho) boosts the electricity production in a bio-electrochemical system powered by un-pretreated human urine', *Bioelectrochemistry*, **2021**, 107639 (ISSN 1567-5394).
- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Busalmen, J. P.; Romeo, H. E. 'Thermodynamic approach to simulate current densities of energy-harvesting microbial electrochemical systems fed with human urine', *Bioresour. Technol. Rep.*, **2022**, 101058 (ISSN 2589-014X).
- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Procaccini, R. A.; Rodriguez, N. A.; Romeo, H. E. 'Flow-through laminar anodes with variable interlaminar distance to modulate the current density of urine-fed bio-electrochemical systems', *Bioelectrochemistry*, **2023**, 108408 (ISSN 1567-5394).

## Congresos

- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Busalmen, J. P.; Romeo, H. E. 'Microstructured electrodes for microbial energy conversion: from organic matter to electrical current'. IV Congreso de Microfluídica Argentina; Paraná, Entre Ríos, Argentina (octubre de 2017).
- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Romeo, H. E. 'Producción de corriente eléctrica a partir de orina'. II Jornadas de Investigación de la Universidad Nacional de Mar del Plata; Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (octubre de 2020).

## Producción Científica

- ❖ Prudente, M.; Romeo, H. E.; Busalmen, J. P.; Massazza, D. A. 'Bioproduction of electricity from human urine'. XVII Congreso Argentino de Microbiología General; Los Cocos, Córdoba, Argentina (octubre de 2022).
- ❖ Prudente, M.; Massazza, D. A.; Rodríguez, N. A.; Romeo, H. E. 'Flujo a través de electrodos porosos para optimizar la producción microbiológica de corriente eléctrica a partir de orina'. IV Jornadas de Jóvenes Bionanocientíficos; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (noviembre de 2022).

# Referencias

- Aelterman**, P.; Rabaey, K.; Clauwaert, P.; Verstraete, W. 'Microbial fuel cells for wastewater treatment', *Water Science and Technology*, **2006**, 9.
- Almeida**, D. G.; Soares da Silva, R. de C. F.; Luna, J. M.; Rufino, R. D.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. 'Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates', *Front. Microbiol.*, **2017**, 157.
- Anton**, S. R.; **Sodano**, H. A. 'A review of power harvesting using piezoelectric materials (2003–2006)', *Smart Mater. Struct.*, **2007**, R1.
- Araujo**, P.; **Janagap**, S. 'Doehlert uniform shell designs and chromatography', **2012**, 14.
- Bachmann**, H., Bruggeman, F. J., Molenaar, D., Branco dos Santos, F., Teusink, B. 'Public goods and metabolic strategies', *Curr. Opin. Microbiol.*, **2016**, 109.
- Barbosa**, S. G.; Peixoto, L.; Ter Heijne, A.; Kuntke, P.; Alves, M. M.; Pereira, M. A. 'Investigating bacterial community changes and organic substrate degradation in microbial fuel cells operating on real human urine', *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, **2017**, 897.
- Barbosa**, S. G.; Rodrigues, T.; Peixoto, L.; Kuntke, P.; Alves, M. M.; Pereira, M. A.; Ter Heijne, A. 'Anaerobic biological fermentation of urine as a strategy to enhance the performance of a microbial electrolysis cell (MEC)', *Renew. Energy*, **2019**, 936.
- Barlett**, P. N. 'Bioenergetics and biological electron transport', Capítulo 1 en *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications*. John Wiley & Sons Ltd., Estados Unidos, (2008).
- Bartholomew**, R. F.; **Frankl**, D. R. 'Electrical properties of some titanium oxides', *Phys. Rev.*, **1969**, 828.
- Barton**, A. J.; Sagers, R. D.; Pitt, W. G. 'Measurement of bacterial growth rates on polymers', **1996**, *J. Biomed. Mater. Res.*, 271.
- Baudler**, A.; Langner, M.; Rohr, C.; Greiner, A.; Schröder, U. 'Metal-polymer hybrid architectures as novel anode platform for microbial electrochemical technologies', *ChemSusChem*, **2016**, 253.
- Bestler**, E.; Wolfaardt, G.; Joubert, L.; Garny, K.; Saftic, S. 'Planktonic-cell yield of a *Pseudomonad* biofilm', *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 7792.

## Referencias

**Bettencourt**, L. M. A.; Trancik, J. E.; Kaur, J. 'Determinants of the pace of global innovation in energy technologies', *PloS one*, **2013**, e67864.

**Bezerra**, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Silveira Villar, L.; Escaleira, L. A. 'Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry', *Talanta*, **2008**, 965.

**Björnsson**, L.; Hugenholtz, P.; Tyson, G. W.; Blackall, L. L. 'Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal', *Microbiology*, **2002**, 2309.

**Boeije**, G.; Corstanje, R.; Rottiers, A.; Schowanek, D. 'Adaptation of the CAS test system and synthetic sewage for biological nutrient removal: Part I: Development of a new synthetic sewage', *Chemosphere*, **1999**, 699.

**Bond**, D. R.; Lovley, D. R. 'Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes', *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 1548.

**Bond**, D. R.; Holmes, D. E.; Tender, L. M.; Lovley, D. R. 'Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments', *Science*, **2002**, 483.

**Bond**, D. R.; Strycharz-Glaven, S. M.; Tender, L. M.; Torres, C. I. 'On electron transport through *Geobacter* biofilms', *ChemSusChem*, **2012**, 1099.

**Booth**, I. R. 'Regulation of cytoplasmic pH in bacteria', **1985**, *Microbiol. Rev.*, 359.

**Bouatra**, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorndahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S. 'The human urine metabolome', *Plos One* **8**, **2013**, e73076.

**Box**, G. E. P.; **Draper**, N. R. 'Empirical model-building and response surfaces', *John Wiley & Sons* (**1987**).

**Box**, G. E. P.; **Hunter**, J. T. 'Multifactor experimental designs for exploring response surfaces', *Ann. Math. Stat.*, **1957**, 195.

**Box**, G. E. P.; **Wilson**, K. B. 'On the experimental attainment of optimum conditions', *J. R. Stat. Soc. B*, **1951**, 1.

**Bradley**, R. A. 'Determination of optimum operating conditions by experimental methods. Par I', *Ind. Qual. Control*, **1958**, 16.

## Referencias

**Brug**, G. J.; van den Eeden, A. L. G.; Sluyters-Rehbach, M.; Sluyters, J. H. 'The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element', *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, 275.

**Busalmen**, J. P.; Esteve-Nuñez, A.; Feliu, J. M. 'Approach to microbial fuel cells and their applications', Capítulo 8 en 'Fuel cell science. Theory, fundamentals and biocatalysis'. A. Wieckowski, J. K. Norskov (Eds.). Wiley, New Jersey, USA (2010).

**Caldwell D. E;** **Lawrence J. R.** 'Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments', *Microb. Ecol.*, **1986**, 299.

**Candal**, R. J.; Bilmes, S. A.; Blesa, M. A. 'Semiconductores con actividad fotocatalítica', Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. Editor: Miguel Blesa, Red CYTED VIII-G (2001): 79.

**Capodaglio**, A. G.; Molognoni, D.; Dallago, E.; Liberale, A.; Cella, R.; Longoni, P.; Pantaleoni, L. 'Microbial fuel cells for direct electrical energy recovery from urban wastewaters'. *The Scientific World Journal*, **2013** (2013).

**Carter**, C. B.; **Norton**, M. G. *Ceramic materials: science and engineering*, New York, United States, Springer, (2013).

**Castañeda**, M. T. 'Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano', *Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata, Argentina*, **2019**.

**Chae**, K-J.; Choi, M-J.; Lee, J-W.; Kim, K-Y.; Kim, I. S. 'Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells', *Biores. Technol.*, **2009**, 3518.

**Chen**, S.; Hou, H.; Harnish, F.; Patil, S. A.; Carmona Martínez, A. A.; Agarwal, S.; Zhang, Y.; Sinha-Ray, S.; Yarin, A. L.; Greiner, A.; Schröder, U. 'Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis', *Energy Environ. Sci.*, **2011**, 1417.

**Chen**, X.; Liu, L.; Huang, F. 'Black titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanomaterials', *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 1861.

**Chong**, P.; Erable, B.; Bergel, A. 'Effect of pore size on the current produced by 3-dimensional porous microbial anodes: a critical review', *Bioresour. Technol.*, **2019**, 121641.

**Chouler**, J.; Padgett, G. A.; Cameron, P. J.; Preuss, K.; Titirici, M-M.; Ieropoulos, I. A.; Di Lorenzo, M. 'Towards effective small scale microbial fuel cells for energy generation from urine', *Electrochim. Acta*, **2016**, 89.

**Davis**, O. L. *Design and analysis of industrial experiments*. Imperial Chemical Industries, Oliver and Boyd, New York, Hafner Pub. Co. (1956).

## Referencias

**D'Andrilli**, J.; Cooper, W. T.; Foreman, C. M.; Marshall, A. G. 'An ultrahigh-resolution mass spectrometry index to estimate natural organic matter lability', *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2015**, 2385.

**de Ramón-Fernández**, A., Salar-García, M. J., Ruiz-Fernández, D., Greenman, J., Ieropoulos, I. A. 'Modelling the energy harvesting from ceramic-based microbial fuel cells by using a fuzzy logic approach', **2019**, *Appl. Energy*, 113321.

**de Ramón-Fernández**, A., Salar-García, M. J., Ruiz-Fernández, D., Greenman, J., Ieropoulos, I. A. 'Evaluation of artificial neural network algorithms for predicting the effect of the urine flow rate on the power performance of microbial fuel cells', **2020**, *Energy*, 118806.

**De Zan**, A. T. 'Principios de metodología de superficie de respuesta para modelos logísticos', *Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España (2006)*.

**Delgado**, A. G.; Fajardo-Williams, D.; Kegerreis, K. L.; Parameswaran, P.; Krajmalnik-Brown, R. 'Impact of ammonium on syntrophic organohalide-respiring and fermenting microbial communities', *mSphere*, **2016**, 1.

**Deville**, S. 'Freeze-casting of porous ceramics: a review of current achievements and issues', *Adv. Eng. Mater.*, **2008**, 155.

**Díaz**, L. A.; Clark, G. G.; Lister, T. E. 'Optimization of the electrochemical extraction and recovery of metals from electronic waste using response surface methodology', *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2017**, 26.

**Diebold**, U. 'The surface science of titanium dioxide', *Surf. Sci. Rep.*, **2003**, 53.

**Dominguez Dominguez**, R. 'Efecto del co-dopado con iones de  $\text{Sm}^{3+}$  y  $\text{Li}^+$  sobre las propiedades estructurales y luminiscentes de  $\text{TiO}_2$  nanocristalino sintetizado por irradiación con microondas', *Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, México*, **2016**.

**Ellwood** D. C.; Keevil C. W.; Marsh P. D.; Brown C. M.; Wardell J. N.; Roux N. L. 'Surface-associated growth', *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **1982**, 517.

**Enerdata**, 2021. <https://datos.enerdata.net/energia-total/produccion-energetica-mundial.html>

**Erable**, B.; Etcheverry, L.; Bergel, A. 'From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater', *Biofouling*, **2011**, 319.

**Esteve-Núñez**, A.; Rothermich, M.; Sharma, M.; Lovley, D. 'Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture', *Environ. Microbiol.*, **2005**, 641.

## Referencias

- Etheridge**, D.; Steele, L. P.; Langenfelds, R.; Francey, R.; Barnola, J.; Morgan, V. 'Natural and anthropogenic changes in atmospheric CO<sub>2</sub> over the last 1000 years from air in Antarctic ice and firn', *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, **1996**, 4115.
- Eyert**, V.; Schwingenschlögl, U.; Eckern, U. 'Charge order, orbital order, and electron localization in the Magnéli phase Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub>', *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, 151.
- Feng**, C.; Yue, X.; Li, F.; Wei, C. 'Bio-current as an indicator for biogenic Fe (II) generation driven by dissimilatory iron reducing bacteria', *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 51.
- Ferreira**, S. L. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H. S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandao, G. C.; da Silva, E. G. P.; Portugal, L. A.; dos Reis, P. S.; Souza, A. S.; dos Santos, W. N. L. 'Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods', *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 179.
- Ferreira Mata Cerqueira**, U. M.; Bezerra, M. A.; Ferreira, S. L. C.; Araujo, R. de J.; da Silva, B. N.; Novaes, C.G. 'Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis - a review', *Food Chem.*, **2021**, 130429.
- Ferroukhi**, R.; Renner, M.; García-Baños, C.; Elsayed, S.; Khalid, A.; Brent, W. 'Renewable energy and jobs: annual review 2020', **2020**.
- Franzetti**, A.; Daghighi, M.; Parenti, P. 'Monod kinetics degradation of low concentration residual organics in membraneless microbial fuel cells', *J. Electrochem. Soc.*, **2017**, H3091.
- Freguia**, S. 'Organics oxidation', Capítulo 11 en *Bioelectrochemical systems: from extracellular transfer to biotechnological application*, Eds. Rabaey, K.; Angenent, L.; Schröder, U.; Keller, J. IWA Publishing, Londres, UK (**2010**).
- Freguia**, S.; Rabaey, K.; Yuan, Z.; Keller, J. 'Syntrophic processes drive the conversion of glucose in microbial fuel cell anodes', *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, 7937.
- Friedman**, M.; **Savage**, L. J. 'Planning experiments seeking maxima'. En *Techniques of statistical analyses*, Capítulo 8, Eisenhart, C; Hastay, M. W.; Wallis, W. A (Eds.), McGraw-Hill (**1947**).
- Fuel cell handbook. EG&G Services, Ralph M. Parsons Company, Science Applications International Corporation. DIANE Publishing, **2000**.
- Fujishima**, A.; Zhang, X. 'Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches', *Comptes Rendus Chimie*, **2006**, 750.

## Referencias

**Garip, S.;** Bozoglu, F.; Severcan, F. 'Differentiation of mesophilic and thermophilic bacteria with Fourier transform infrared spectroscopy', *Appl. Spectrosc.*, **2007**, 186.

**Goldman, J. C.;** Caron, D. A.; Dennett, M. R. 'Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio', *Limnol. Oceanogr.*, **1987**, 1239.

**Guizard, C;** Leloup, J.; Deville, S. 'Crystal Templating with mutually miscible solvents: a simple path to hierarchical porosity', *J. Am. Ceram. Soc.*, **2014**, 1.

**Gutiérrez, M. C.;** García-Carvajal, Z. Y.; Hortigüela, M. J.; Yuste, L.; Rojo, F.; Ferrer, M. L.; del Monto, F. 'Biocompatible MWCNT scaffolds for immobilization and proliferation of *E. coli*', *J. Mater. Chem.*, **2007**, 2992.

**Haider, A. J.;** Jameel, Z. N.; Hussaini, I. H. M. 'Review on: titanium dioxide applications', *Energy Procedia*, **2019**, 17.

**Han, K.;** Levenspiel, O. 'Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition', *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 430.

**Hanaor, D.;** Sorrell, C. 'Review of the anatase to rutile phase transformation', *J. Mat. Sci.*, **2011**, 855.

**Harms, C.;** Schleicher, A.; Collins, M. D.; Andreesen, J. R. '*Tissierella creatinophila* sp. nov., a Gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism', *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1998**, 983.

**Harrington, S. P.;** Devine, T. M. 'Analysis of electrodes displaying frequency dispersion in Mott-Schottky tests', *J. Electrochem. Soc.*, **2008**, C381.

**He, L.;** Du, P.; Chen, Y.; Lu, H.; Cheng, B.; Wang, Z. 'Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment', *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **2017**, 388.

**He, G.;** Gu, Y.; Schröder, U.; Chen, S.; Hou, H. 'Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells', *Bioresour. Technol.*, **2011**, 10763.

**Heffernan, B.;** Murphy, C. D.; Casey, E. 'Comparison of planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas fluorescens* DSM 8341 cells grown on fluoroacetate', *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, 2899.

**Heijnen, J. J.;** Kleerebezem, R. 'Bioenergetics of microbial growth', en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Ed. Flickinger, M. C. John Wiley & Sons, Inc. (2010).

## Referencias

**Hirschron**, B.; Orazem, M. E.; Tribollet, B.; Vivier, V.; Frateur, I.; Musiani, M. 'Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters', *Electrochim. Acta*, **2010**, 6218.

**Hotelling**, H. 'Experimental determination of the maximum of a function', *Ann. Math. Stat.*, **1941**, 20.

**Höglund**, C. 'Urine diversion - hygienic risks and microbial guidelines for reuse', Capítulo 1 - Tesis doctoral (Evaluation of microbial health risks associated with the reuse of source separated human urine) (**2001**). ISBN 91-7283-039-5.

**Ieropoulos**, I. A.; Greenman, J.; Melhuish, M. 'Urine utilisation by microbial fuel cells; energy fuel for the future', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 94.

**Ieropoulos**, A. I.; Greenman, J.; Melhuish, C. 'Miniature microbial fuel cells and stacks for urine utilization', *Int. J. Hydrog. Energy*, **2013**, 492.

**Ieropoulos**, I. A.; Ledezma, P.; Stinchcombe, A.; Papaharalabos, G.; Melhuish, C.; Greenman, J. 'Waste to real energy: the first MFC powered mobile phone', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15312.

**Ieropoulos**, I. A.; Winfield, J.; Greenman, J.; Melhuish, C. 'Small scale microbial fuel cells and different ways of reporting output', *ECS Transactions*, **2010**, 1.

**Inglis**, A. D.; Le Page, Y.; Strobel, P.; Hurd, C. M. 'Electrical conductance of crystalline  $Ti_nO_{2n-1}$  for  $n=4-9$ ', *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **1983**, 317.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 'Climate change 2007: The physical science basis', **2007**, 333.

**Ioroi**, T.; Senoh, H.; Yamazaki, S.; Siroma, Z.; Fujiwara, N.; Yasuda, K. 'Stability of corrosion-resistant Magnéli-phase  $Ti_4O_7$ -supported PEMFC catalysts at high potentials', *J. Electrochem. Soc.*, **2008**, B321.

**Jadhav**, D. A.; Carmona-Martínez, A. A.; Chendake, A. D.; Pandit, S.; Pant, D. 'Modeling and optimization strategies towards performance enhancement of microbial fuel cells', *Bioresour. Technol.*, **2020**, 124256.

**Jovic**, V. D.; Jovic, B. M. 'EIS and differential capacitance measurement onto single crystal faces in different solutions: Part II: Cu (111) and Cu (100) in 0.1 M NaOH', *J. Electroanal. Chem.*, **2003**, 13.

**Jurczakowski**, R.; Hitz, C.; Lasia, A. 'Impedance of porous Au based electrodes', *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 355.

**Kadam**, P. C.; **Boone**, D. R. 'Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens', *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, 4486.

## Referencias

**Kang**, H-W.; Tabata, Y.; Ikada, Y. 'Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering', *Biomaterials*, **1999**, 1339.

**Kato Marcus**, A.; Torres, C. I.; Rittman, B. E. 'Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell', *Biotechnol. Bioeng*, **2007**, 1171.

**Kato Marcus**, A.; Torres, C. I.; Rittman, B. E. 'Analysis of a microbial electrochemical cell using the proton condition in biofilm (PCBIOFILM) model', *Bioresour. Technol.*, **2011**, 253.

**Katuri**, K.; Ferrer, M. L.; Gutiérrez, M. C.; Jiménez, R.; del Monte, F.; Leech, D. 'Three-dimensional microchanneled electrodes in flow-through configuration for bioanode formation and current generation', *Energy Environ. Sci.*, **2011**, 4201.

**Kim**, J.; Kim, H.-S.; Han, S.; Lee, J.-Y.; Oh, J.-E.; Chung, S.; Park, H.-D. 'Hydrodynamic effects on bacterial biofilm development in a microfluidic environment', *Lan Chip*, **2013**, 1846.

**Kissel** J. C, Mccarty P. L, Street R. L. 'Numerical-simulation of mixed-culture biofilm', *J Environ Eng-Asce.*, **1984**, 393.

**Kitada**, G.; Hasegawa, Y.; Kobayashi, K.; Kanamori, K.; Nakanishi, H.; Kageyama. 'Selective preparation of macroporous monoliths of conductive titanium oxides  $Ti_nO_{2n-1}$  ( $n = 2, 3, 4, 6$ )', *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 10894.

**Kobayashi**, K. 'Spectroscopic studies of metal oxides with competing electron-electron and electron-lattice interactions', *Tesis doctoral, Universidad de Tokio, Japón*, **1999**.

**Kolbrecka**, K.; **Przyluski**, J. 'Sub-stoichiometric titanium oxides as ceramic electrodes for oxygen evolution – structural aspects of the voltammetric behaviour of  $Ti_nO_{2n-1}$ ', *Electrochim. Acta*, **1994**, 1591.

**Korth**, B.; Rosa, L. F. M.; Harnisch, F.; Picioreanu, C. 'A framework for modeling electroactive microbial biofilms performing direct electron transfer', *Bioelectrochemistry*, **2015**, 194.

**Kuntke**, P.; Smiech, K. M.; Bruning, H.; Zeeman, G.; Saakes, M.; Sleutels, T. H. J. A.; Hamelers, H. V. M.; Buisman, C. J. N. 'Ammonium recovery and energy production from urine by a microbial fuel cell', *Water Res.*, **2012**, 2627.

**Kurzbaum**, E.; Kirzhner, F.; Sela, S.; Zimmels, Y.; Armon, R. 'Efficiency of phenol biodegradation by planktonic *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (a constructed wetland isolate) vs. root and gravel biofilm', **2010**, *Water Res.*, 5021.

## Referencias

- Kuznetsov, A. M.; Ulstrup, J.** 'Electron transfer in chemistry and biology. An introduction to the theory', *John Wiley & Sons Ltd., Estados Unidos, (1999)*.
- Ledezma, P.; Greenman, J.; Ieropoulos, I. A.** 'Maximizing electricity production by controlling the biofilm specific growth rate in microbial fuel cells', *Biores. Technol.*, **2012**, 615.
- Le Quéméner, E., Bouchez, T.** 'A thermodynamic theory of microbial growth', **2020**, *ISME J.*, 1747.
- Lee, H.-S., Torres, C. I., Rittmann, B. E.** 'Effects of substrate diffusion and anode potential on kinetic parameters for anode-respiring bacteria', *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 7571.
- Liborio, L.; Mallia, G.** 'Electronic structure of the Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> Magnéli phase', *Phys. Rev. B*, **2009**, 245133.
- Littfinski, T.; Stricker, M.; Nettmann, E.; Gehring, T.; Hiegemann, H.; Krimmler, S.; Lübken, M.; Pant, D.; Wichern, M.** 'A generalized whole-cell model for wastewater-fed microbial fuel cells', *Appl. Energy*, **2022**, 119324.
- Liu, Y.; Lin, Y.-M.; Yan, S.-F.** 'A thermodynamic interpretation of the Monod equation', *Curr. Microbiol.*, **2003**, 233.
- Lovley, D. R.** 'Electromicrobiology', *Annual review of microbiology*, **2012**, 391.
- Lu, S.; Li, H.; Tan, G.; Wen, F.; Flynn, M. T.; Zhu, X.** 'Resource recovery microbial fuel cells for urine-containing wastewater treatment without external energy consumption', *Chem. Eng. J.*, **2019**, 1072.
- Luo, S.; Sun, H.; Ping, Q.; Jin, R.; He, Z.** 'A review of modeling bioelectrochemical systems: engineering and statistical aspects', *Energies*, **2016**, 111.
- Luna Medina, N.; de la Merced Jiménez, D.; Sebastian, P. J.** 'Los mil y un usos de los microorganismos', Instituto de Energías Renovables - UNAM, Temixco, Morelos, **2018**.
- Malato, S.; Fernandez-Ibanez, P.; Maldonado, M. I.; Blanco Galvez, J.** 'Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends', *Catal. Today*, **2009**, 1.
- Maragatha, J.; Rani, C.; Rajendran, S.; Karuppuchamy, S.** 'Microwave synthesis of nitrogen doped Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> for photocatalytic applications', *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.*, **2017**, 78.
- Marsili, E.; Sun, J.; Bond, D. R.** 'Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential', *Electroanalysis*, **2010**, 865.

## Referencias

**Massazza**, D. A.; Busalmen, J. P.; Parra, R.; Romeo, H. E. 'Layer-to-layer distance determines the performance of 3D bio-electrochemical lamellar anodes in microbial energy transduction processes', *J. Mater. Chem. A*, **2018**, 10019.

**Massazza**, D. A.; Parra, R.; Busalmen, J. P.; Romeo, H. E. 'New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems', *Energy Environ. Sci.*, **2015**, 2707.

**Mirpuri**, R.; Jones, W.; Bryers, J. D. 'Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G', **1997**, *Biotechnol. Bioeng.*, 535.

**Montoya**, R. C.; Flores, M. C.; Jiménez Ramírez, J. V.; Peraza Garay, F. de J.; Osuna Pàez, A. G. 'Metodología de la superficie de respuesta: tres aplicaciones a conjuntos de datos reales', *Academia Journals*, **2019**, 1.

**Moulson**, A. J.; **Herbert**, J. M. *Electroceramics: materials, properties and applications*, West Sussex, England, Wiley, (2003).

**Munirathinam**, B.; **Neelakantan**, L. 'Role of crystallinity on the nanomechanical and electrochemical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes', *J. Electroanal. Chem.*, **2016**, 73.

**Müller**, T.; Walter, B.; Wirtz, A.; Burkovski, A. 'Ammonium toxicity in bacteria', *Curr. Microbiol.*, **2006**, 400.

**Murphy**, T. E.; Tsui, K-L.; Allen, J. K. 'A review of robust design methods for multiple responses', *Eng. Des.*, **2005**, 201.

**Myers**, R. H.; **Montgomery**, D. C. 'Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments', *John Wiley & Sons* (2002).

**Myers**, R. H.; Montgomery, D. C.; Vining, G. G.; Borror, C. M.; Kowalski, S. M. 'Response surface methodology: a retrospective and literatura survey', *J. Qual. Technol.*, **2004**, 53.

**Nam**, J-Y.; Tokash, J. C.; Logan, B. E. 'Comparison of microbial electrolysis cells operated with added voltaje or by setting the anode potential', *Int. J. Hydrogen Energy*, **2011**, 10550.

**Nayak**, S.; **Chaplin**, B. P. 'Fabrication and characterization of porous, conductive, monolithic Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> electrodes', *Electrochim. Acta*, **2018**, 299.

**Niebel**, B., Leupold, S., Heinemann, M. 'An upper limit on Gibbs energy dissipation governs celular metabolism', *Nat. Metab.*, **2019**, 125.

## Referencias

**Nopens, I.; Capalozza, C.; Vanrolleghem, P. A.** 'Stability analysis of a synthetic municipal wastewater', *Department of Applied Mathematics Biometrics and Process Control, University of Gent, Belgium*, **2001**.

**Nishihara, H.; Mukai, S. R.; Fujii, Y.; Tago, T.; Masudac, T.; Tamon, H.** 'Preparation of monolithic SiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cryogels with inter-connected macropores through ice templating', *J. Mater. Chem.*, **2006**, 3231.

**Noor, E., Bar-Even, A., Flamholz, A., Reznik, E., Liebermeister, W., Milo, R.** 'Pathway thermodynamics highlights kinetic obstacles in central metabolism', *PLoS Comput. Biol.*, **2014**, e1003483.

**Obata, O.; Salar-García, M. J.; Greenman, J.; Kurt, H.; Chandran, K.; Ieropoulos, I. A.** 'Development of efficient electroactive biofilm in urine-fed microbial fuel cell cascades for bioelectricity generation', *J. Environ. Manage.*, **2020**, 109992.

**O'Flaherty, E.; Gray, N. F.** 'A comparative analysis of the characteristics of a range of real and synthetic wastewaters', *Environmental Science and Pollution Research*, **2013**, 20.

**O'Regan, B.; Grätzel, M.** 'A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO<sub>2</sub> films', *Nature*, **1991**, 737.

**Palmer, J. M.** 'Radiometry and photometry FAQ', University of Arizona, **1999**, 1.

**Pant, D.; Van Bogaert, G.; Diels, L.; Vanbroekhoven, K.** 'A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production', *Bioresour. Technol.*, **2010**, 1533.

**Picioreanu, C.; Head, I. M.; Katuri, K. P.; van Loosdrecht, M. C. M., Scott, K.** 'A computational model for biofilm-based microbial fuel cells', *Water Res.*, **2007**, 2921.

**Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C. M., Curtis, T. P., Scott, K.** 'Model based evaluation of the effect of pH and electrode geometry on microbial fuel cell performance', *Bioelectrochemistry*, **2010**, 8.

**Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J.** 'Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two-dimensional modeling study', *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 504.

**Pirt, S. J.** 'The maintenance energy of bacteria in growing cultures', *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **1965**, 224.

**Prigogine, I. R.** <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1977/summary>.

## Referencias

**Prigogine, I. R; Stengers, I.** *La nueva alianza: metamorfosis de la ciencia*, Alianza Editorial, España (1997).

**Prudente, M.; Massazza, D. A.; Busalmen, J. P.; Romeo, H. E.** 'Urine dilution boosts the electricity production in bio-electrochemical systems powered by un-pretreated human urine', *Bioelectrochemistry*, **2021**, 107639.

**Prudente, M; Massazza, D. A.; Procaccini, R. A.; Rodríguez, N. A.; Romeo, H. E.** 'Flow-through laminar anodes with variable interlaminar distance to modulate the current density of urine-fed bio-electrochemical systems', *Bioelectrochemistry*, **2023**, 108408.

**Putnam, D. F.** 'Composition and concentrative properties of human urine', NASA-CR-1802. NASA, 1971.

**Qian, F.; Morse, D. E.** 'Miniaturizing microbial fuel cells', *Trends Biotechnol.*, **2011**, 62.

Quantitative microbial risk assessment, Application for water safety management, World Health Organization (WHO), (2016).

**Rabaey, K.** 'Bioelectrochemical systems: a new approach towards environmental and industrial biotechnology', Capítulo 1 en *Bioelectrochemical systems from extracellular electron transfer to biotechnological application*, Eds. Rabaey, K.; Angenent, L.; Schröder, U.; Keller, J. IWA Publishing, Londres, UK (2010).

**Rajagopal, R.; Massé, D. I.; Singh, G.** 'A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia', *Bioresour Technol*, **2013**, 143.

**Ren, Y.; Liu, Z.; Pourpoint, F.; Armstrong, A. R.; Grey, C. P.; Bruce, P. G.** 'Nanoparticulate TiO<sub>2</sub> (B): an anode for lithium-ion batteries', *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 2164.

**Renslow, R., Babauta, J., Kuprat, A., Schenk, J., Ivory, C., Fredrickson, J., Beyenal, H.** 'Modeling biofilms with dual extracellular electron transfer mechanisms', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 19262.

**Rimboud, M.; Pocaznoi, D.; Erable, B.; Bergel, A.** 'Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives', *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **2014**, 16349.

**Rivas-Ubach, A.; Liu, Y.; Bianchi, T. S.; Tolić, N.; Jansson, C.; Paša-Tolić, L.** 'Moving beyond the van Krevelen diagram: a new stoichiometric approach for compound classification in organisms', *Anal. Chem.*, **2018**, 6152.

## Referencias

**Romeo**, H. E.; Massazza, D. A.; Parra, R.; Busalmen, J. P. 'Non-carbonaceous electrodes for microbial electrochemical systems', Capítulo 13 en *Functional electrodes for enzymatic and microbial electrochemical systems*. V. Flexer, N. Brun (Eds.). World Scientific, Singapur (2017).

**Rousseau**, R.; Dominguez-Benetton, X.; Délia, M-L.; Bergel, A. 'Microbial electrolysis cell (MEC): strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint', *Electrochem. Commun.*, **2013**, 113938.

**Saadat**, N. P., Nies, T., Rousset, Y., Ebenhöf, O. 'Thermodynamic limits and optimality of microbial growth', *Entropy*, **2020**, 277.

**Santoro**, C.; Ieropoulos, I. A.; Greenman, J.; Cristiani, P.; Vadas, T.; Mackay, A.; Li, B. 'Current generation in membraneless single chamber microbial fuel cells (MFCs) treating urine', *J. Power Sour.*, **2013**, 190.

**Santoro**, C.; Salar García, M. J.; Walter, X. A.; You, J.; Theodosiou, P.; Obata, O.; Winfield, J.; Greenman, J.; Ieropoulos, I. A. 'Urine in bioelectrochemical systems: an overall review', *ChemElectroChem*, **2020**, 1312.

**Schlenker**, C.; Marezio, M. 'The order-disorder transition of  $Ti^{3+}$ - $Ti^{3+}$  pairs in  $Ti_4O_7$  and  $(Ti_{1-x}V_x)_4O_7$ ', *Philos. Mag. B*, **1980**, 453.

**Schrott**, G. D.; Ordóñez, M. V.; Robuschi, L.; Busalmen, J. P. 'Physiological Stratification in Electricity-Producing Biofilms of *Geobacter sulfurreducens*', *ChemSusChem*, **2014**, 598.

**Setter**, N. 'Electroceramics: looking ahead', *J. Eur. Ceram. Soc.*, **2001**, 1279.

**Setter**, N.; Waser, R. 'Electroceramic materials', *Acta Mater.*, **2000**, 151.

**Shahbazi**, M-A.; Ghalkhani, M.; Maleji, H. 'Directional freeze-casting: a bioinspired method to assemble multifunctional aligned porous structures for advanced applications', *Adv. Eng. Mater.*, **2020**, 2000033.

**Shareefdeen**, Z; Baltzis, B.C.; Oh, Y-S.; Bartha, R. 'Biofiltration of methanol vapor', **1993**, *Biotechnol. Bioeng.*, 512.

**Sharma**, M; Bajracharyaa, S.; Gildemyne, S.; Patil, S. A.; Alvarez-Gallego, Y.; Pant, D.; Rabaey, K.; Dominguez-Benetton, X. 'A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems', *Electrochim. Acta*, **2014**, 191.

**Sharma**, R.; Kumari, R.; Pant, D.; Malaviya, P. 'Bioelectricity generation from human urine and simultaneous nutrient recovery: role of microbial fuel cells', *Chemosphere*, **2022**, 133437.

## Referencias

**Shreeram**, D. D.; Hassett, D. J.; Schaefer, D. W. 'Urine-powered microbial fuel cell using a hyperpiliated *pilT* mutant of *Pseudomonas aeruginosa*', *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, 103.

**Silva Barni**, M. F.; Doumic, L. I.; Procaccini, R. A.; Ayude, M. A.; Romeo, H. E. 'Layered platforms of Ti<sub>4</sub>O<sub>7</sub> as flow-through anodes for intensifying the electro-oxidation of bentazon', *J. Environ. Manage.*, **2020**, 110403.

**Sleighter**, R. L.; Hatcher, P. G. 'The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter', *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 559.

**Sleutels**, T. H. J. A., Molenaar, S. D., Ter Heijne, A., Buisman, C. J. N. 'Low substrate loading limits methanogenesis and leads to high coulombic efficiency in bioelectrochemical systems', *Microorganisms*, **2016**, 7.

**Smith**, J. R.; Walsh, F. C.; Clarke, R. L. 'Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: the properties and applications of Ebonex® materials', *J. Appl. Electrochem.*, **1998**, 1021.

**Song**, J. L.; Au, K. H.; Huynh, K. T.; Packman, A. I. 'Biofilm responses to smooth flow fields and chemical gradients in novel microfluidic flow cells', *Biotechnol. Bioeng.*, **2013**, 597.

**Sprott**, G. D.; Patel, G. B. 'Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria', *Systematic and applied microbiology*, 1986, 7.

**Steele**, B. C. H.; **Heinzel**, A. 'Materials for fuel-cell technologies', *Nature*, **2001**, 345.

**Su**, B. L.; Sanchez, C.; Yang, X. Y. 'Hierarchically structured porous materials: from nanoscience to catalysis, separation, optics, energy, and life science'. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (**2012**).

**Sui**, S.; Wang, X.; Zhou, X.; Su, Y.; Riffat, S.; Liu, C-J. 'A comprehensive review of Pt electrocatalysts for the oxygen reduction reaction: nanostructure, activity, mechanism and carbon support in PEM fuel cells', *J. Mat. Chem. A*, **2017**, 1808.

**Tamon**, H.; Ishizaka, H.; Yamamoto, T.; Suzuki, T. 'Preparation of mesoporous carbon by freeze drying', *Carbon*, **1999**, 2049.

**Tang**, H., Prasad, K.; Sanjinès, R.; Schmid, P. E.; Lévy, F. 'Electrical and optical properties of TiO<sub>2</sub> anatase thin films', *J. Appl. Phys.*, **1994**, 2042.

## Referencias

**Teixeira Tarley**, C. R.; Silveira, G.; Lopes dos Santos, W. N.; Domingues Matos, G.; Paranhos da Silva, E. G.; Bezerra, M. A.; Miró, M.; Ferreira, S. L. C. 'Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology', *Microchem. J.*, **2009**, 58.

**Tian**, H.; Fotidis, I. A.; Kissas, K.; Angelidaki, I. 'Effect of different ammonia sources on acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens', *Bioresour. Technol.*, **2018**, 390.

**Torres**, C. I.; Kato Marcus, A.; Rittman, B. E. 'Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria', *Biotechnol. Bioeng.*, **2008**, 872.

**Trenberth**, K. E. 'Climate change caused by human activities is happening and it already has major consequences', *Journal of energy & natural resources law*, **2018**, 463.

**Tsujimoto**, Y.; Matsushita, Y.; Yu, S.; Yamaura, K.; Uchikoshi, T. 'Size dependence of structural, magnetic, and electrical properties in corundum-type Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles showing insulator-metaltransition', *J. Asian Ceram. Soc.*, **2015**, 325.

**Udert**, K. M.; Larsen, T. A.; Gujer, W. 'Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems', *Water Res.*, **2003**, 2667.

Udert, K. M.; Larsen, T. A.; Gujer, W. 'Fate of major compounds in source-separated urine', *Water Sci. Technol.*, 2006, 413.

**Vallino**, J. J.; Hopkinson, C. S.; Hobbie, J. E. 'Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: optimization replaces Monod growth kinetics', *Limnol. Oceanogr.*, **1996**, 1591.

**Verdusch**, A. G. Imperfecciones en sólidos cristalinos. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, **1964**, 153.

**Visser**, S. A. 'Application of van Krevelen's graphical-statistical method for the study of aquatic humic material', *Environ. Sci. Technol.*, **1983**, 412.

**von Stockar**, U. 'Biothermodynamics of live cells: a tool for biotechnology and biochemical engineering', *J. Non-Equilib. Thermodyn.*, **2010**, 415.

**von Stockar**, U., **Liu**, J.-S. 'Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth.', *Biochim. Biophys. Acta.*, **1999**, 191.

**von Stockar**, U.; Maskow, T.; Liu, J.; Marison, I.W.; Patiño, R. 'Thermodynamics of microbial growth and metabolism: an analysis of the current situation', *J. Biotechnol.*, **2006**, 517.

## Referencias

**Wagner**, R. C.; Call, D. F.; Logan, B. E. 'Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems', **2010**, 6036.

**Walsh**, F. C.; Wills, R. G. A. 'The continuing development of Magnéli phase titanium sub-oxides and Ebonex® electrodes', *Electrochim. Acta*, **2010**, 6342.

**Walter**, X. A.; Greenman, J.; Ieropoulos, I. A. 'From single MFC to cascade configuration: the relationship between size, hydraulic retention time and power density', *Sustain. Energy Technol. Assess.*, **2016**, 74.

World Bank Data Catalog - [datacatalog.worldbank.org](http://datacatalog.worldbank.org)

**Waschkies**, T.; Oberacker, R.; Hoffmann, M. J. 'Investigation of structure formation during freeze-casting from very slow to very fast solidification velocities', *Acta Mater.*, **2011**, 5135.

**Xie**, X.; Criddle, C.; Cui, Y. 'Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems', *Energy Environ. Sci.*, **2015**, 3418.

**Yates**, M. D.; Strycharz-Glaven, S. M.; Golden, J. P.; Roy, J.; Tsoi, S.; Erickson, J. S.; El-Naggar, M. Y.; Calabrese Barton, S.; Tender, L. M. 'Measuring conductivity of living *Geobacter sulfurreducens* biofilms', *Nature Nanotechnology*, **2016**, 910.

**Yoho**, R. A.; Popat, S. C.; Torres, C. I. 'Dynamic potential-dependent electron transport pathway shifts in anode biofilms of *Geobacter sulfurreducens*', *ChemSusChem*, **2014**, 3413.

**Yoshizawa**, T.; Miyahara, M.; Kouzuma, A.; Watanabe, K. 'Conversion of activated-sludge reactors to microbial fuel cells for wastewater treatment coupled to electricity generation', *J. Biosci. Bioeng.*, **2014**, 533.

**Yusoff**, M. Z. M.; Hu, A.; Feng, C.; Maeda, T.; Shirai, Y.; Hassan, M. A.; Yu, C. P. 'Influence of pretreated activated sludge for electricity generation in microbial fuel cell application', *Biores. Technol.*, **2013**, 90.

**Zang**, G-L.; Sheng, G-P.; Li, W-W.; Tong, Z-H.; Zeng, R. J.; Shi, C.; Yu, H-Q. 'Nutrient removal and energy production in a urine treatment process using magnesium ammonium phosphate precipitation and a microbial fuel cell technique', *Phys. Chem- Chem. Phys.*, **2012**, 1978.

**Zhang**, H.; Hussain, I.; Brust, M.; Butler, M. F.; Rannard, S. P.; Cooper, A. I. 'Aligned two- and threedimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles', *Nat. Mater.*, **2005**, 787