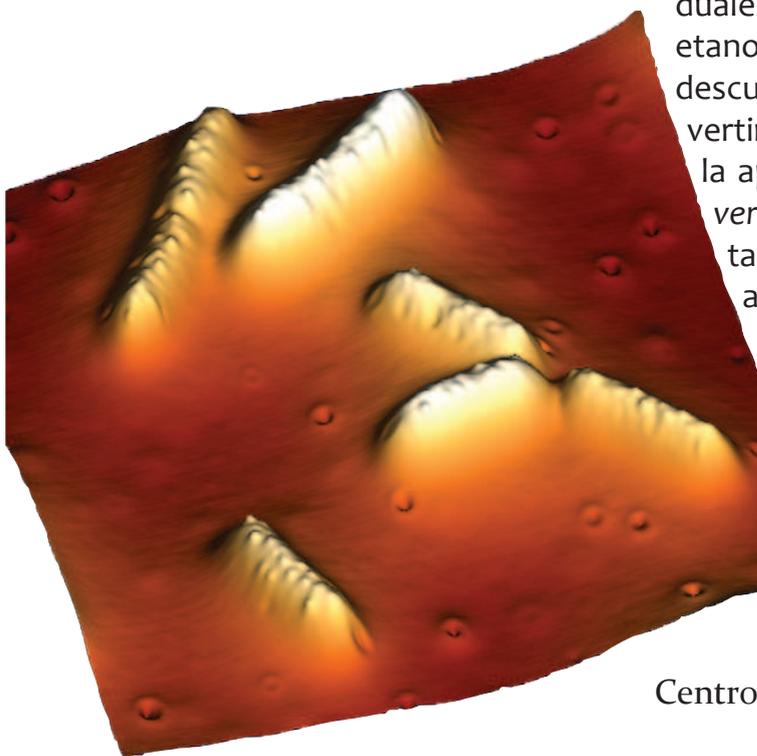


Bacterias productoras de electricidad

Del subsuelo a la pila de combustible

El uso incontrolado de los combustibles fósiles ha disparado una crisis energética global, despertando el interés por obtener fuentes de energía renovables con el mínimo impacto sobre el medio ambiente. Hasta ahora el compromiso energético de la microbiología ambiental se había dirigido a optimizar la producción de hidrógeno, aprovechar el metano generado en los tratamientos de aguas residuales, o generar biocombustibles como el etanol o el biodiésel. Sin embargo, el reciente descubrimiento de bacterias capaces de convertir la energía química en eléctrica sugiere la aparición de una nueva forma de *energía verde*, cuya explotación supondrá un importante reto biotecnológico en los próximos años.



Abraham Esteve-Núñez
Laboratorio de Ecología Molecular
Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Madrid
estevena@inta.es

¿CÓMO CONVERTIMOS LA ENERGÍA QUÍMICA EN ELÉCTRICA UTILIZANDO BACTERIAS?

Aunque este artículo terminará con una sección especial dedicada al diseño y aplicaciones de esta nueva tecnología, he creído conveniente presentar unos principios básicos del proceso electroquímico antes de entrar en los estrictamente microbiológicos.

La conversión de energía química en eléctrica es posible en ciertos dispositivos electroquímicos denominados **células o pilas de combustible (Fuel Cells)**, donde la electricidad se obtiene a partir de una fuente externa de combustible química que suele ser hidrógeno o etanol. Algunos de los vehículos de transporte público de nuestras ciudades utilizan ya esta tecnología limpia que tiene al inocuo vapor de agua como único residuo. Una variante reciente de esta célula de combustible es la **célula de combustible microbiana (Microbial Fuel Cell, MFC)** (Logan *et al.*, 2006). En las MFC se utilizan microorganismos para oxidar el combustible, materia orgánica, y transferir los electrones a un electrodo (ánodo), que está conectado a un cátodo a través de un material conductor que contiene una resistencia. Las cámaras que albergan estos electrodos, la anódica (anaerobia) y la catódica (aerobia), están comunicadas por una membrana de intercambio catiónico que permite el paso de protones. De esta forma, los protones generados en la oxidación de la materia orgánica se combinan con oxígeno y con los electrones que llegan al cátodo para formar agua (Figura 1a). Existe también la posibilidad de alojar una pila de combustible en una hábitat natural y obtener energía eléctrica a partir de las comunidades microbianas naturales. En este caso, el diseño recibe el nombre de **célula de combustible sedimentaria** y requiere el enterramiento del ánodo en un sedimento anaerobio que hace las veces de cámara anódica, mientras que el cátodo queda expuesto en la fase acuosa aeróbica que cubre el sedimento (Figura 1b).

¿QUÉ TIPO DE BACTERIAS PUEDE GENERAR ELECTRICIDAD?

Como suele ocurrir con muchas cuestiones científicas que hoy nos parecen novedosas, las primeras observaciones tuvieron lugar mucho tiempo atrás. Así, el primer ejemplo de actividad eléctrica con microorganismos fue mostrado por Potter en 1910; en sus experimentos recurrió a cultivos de *E. coli* y electrodos de platino para generar corrientes eléctricas que por su pequeña magnitud pasaron desapercibidas para la comunidad científica. Este tipo de procesos no despertó el interés hasta la década de los años ochenta, con la utilización de mediadores redox solubles que aumentaban la producción de corriente y la potencia de estos sistemas. Los mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos por los microorganismos. Normalmente son de naturaleza

Abraham Esteve Núñez (Murcia, 1972) se licenció en Bioquímica por la Universidad de Murcia (1995) y se doctoró en Bioquímica, con premio extraordinario, por la Universidad de Granada (2000). Su proyecto de tesis doctoral, bajo la dirección del Dr. Juan Luis Ramos, fue realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), donde estudió el metabolismo anaerobio del nitroaromático explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por bacterias del género *Pseudomonas*. Financiado por una *European Science Foundation fellowship* realizó una estancia en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Konstanz (Alemania), donde identificó por primera vez la respiración microbiana de nitroaromáticos.



Posteriormente, realizó una estancia postdoctoral en el grupo del Dr. Derek Lovley, en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Massachusetts (Amherst, USA, 2001-2005). Su investigación se centró en el estudio de *Geobacter sulfurreducens*, un microorganismo de gran relevancia ambiental por su capacidad para respirar hierro en el subsuelo. El objetivo de esta línea de investigación fue combinar estudios básicos de fisiología microbiana en quimiostatos con técnicas de genómica funcional, proteómica y el uso de un modelo celular *in silico*, con el fin de elucidar cómo *Geobacter* adapta sus redes metabólicas para optimizar la reducción de metales. En la actualidad desarrolla su actividad científica como investigador contratado en el Centro de Astrobiología (CSIC-INTA) de Madrid. Sus principales líneas de investigación son: i) estudiar los aspectos moleculares que intervienen en la respiración microbiana de aceptores insolubles, utilizando como modelo la interacción *Geobacter*-electrodo, y ii) explorar nuevas aplicaciones en el campo de las células de combustible microbianas.

metalorgánica o colorantes, como el rojo neutro, el azul de metileno, la tionina, la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, o incluso el Fe (III)-EDTA. Estos compuestos presentan cierta toxicidad por lo que su aplicación en MFCs se ve limitada por cuestiones ambientales.

Los análisis de comunidades microbianas asociadas a los ánodos de las MFC muestran una gran biodiversidad de géneros bacterianos dependiendo de la naturaleza del inóculo, del combustible y del tipo de MFC utilizada (Logan y Regan, 2006). A pesar de ello, en la mayoría de los casos no podemos asegurar qué organismo muestra una participación activa en el proceso electrogénico ya que parte de esa población recurre probablemente a metabolismos alternativos como fermentaciones del combustible utilizado, y el ánodo es sólo un soporte físico sobre el que crecer. En cambio, cuando se utilizan pilas sedimentarias, tanto en sedimentos marinos como de agua dulce, sí parece existir un consenso que identifica a las δ -proteobacterias, y en concreto a la familia *Geobacteraceae*, como los microorga-

nismos dominantes, con probada actividad electrogénica cuando se ensayan utilizando cultivos puros.

La gran revolución en el campo de las MFC se ha producido en el último lustro, con el descubrimiento de **microorganismos electrogénicos** que son capaces de transferir los electrones al ánodo en ausencia de mediadores redox artificiales (Lovley, 2006). De esta manera, se eliminan los problemas de toxicidad en los dispositivos electroquímicos y los medios utilizados quedan restringidos al combustible orgánico que se desee utilizar y al microorganismo que actúe como catalizador biológico. Podemos distinguir dos tipos de bacterias electrogénicas, aquellas que producen sus propios mediadores redox, que son secretados al medio y reaccionan con el electrodo, y aquellas que interactúan de forma directa con el electrodo sin mediador soluble alguno. Aunque se ha probado la existencia de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* electrogénica productora de fenazinas como mediadores redox, el principal representante de este grupo corresponde a las bacterias reductoras de Fe (III) del género *Shewanella*. Un reciente estudio publicado en los *Proceedings of the National Academy of Sciences* parece haber resuelto el enigma de la actividad electrogénica de *Shewanella*, al identificar a las riboflavinas secretadas por los biofilm como los mediadores redox que establecen la comunicación entre bacteria y electrodo (Marsili et al., 2008). Otras bacterias con probada actividad electrogénica son *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum*, si bien no existe información sobre la forma en que transfieren los electrones al electrodo. Por último, estarían aquellas bacterias capaces de transferir los electrones por contacto directo con el ánodo, siendo el género *Geobacter* el modelo mejor estudiado dada la disponibilidad de cultivos puros y su dominancia dentro de las comunidades microbianas electrogénicas (Figura 1c).

GEOBACTER COMO MODELO DE ELECTROGÉNESIS

Este tipo de bacterias habita de forma natural en el subsuelo y durante millones de años han utilizado los óxidos de hierro insolubles como aceptores de electrones para la oxidación de la materia orgánica. Los mecanismos responsables de establecer una comunicación redox entre la bacteria y la superficie de los óxidos de hierro han contribuido a “dar forma” a la corteza terrestre, y comprenderlos constituye uno de los retos actuales en el campo de la microbiología ambiental. Esta habilidad microbiana fue probablemente lo que, al comienzo de esta década, llamó la atención del Departamento de Energía estadounidense (DOE, USA), convirtiéndola en una de las estrellas del ambicioso proyecto científico *Genomes to Life*, dedicado a impulsar el estudio de aquellos sistemas vivos con aplicaciones en el campo de la energía. La apuesta de la agencia gubernamental era segura; desde que *Geobacter* fue descubierta por Derek Lovley en un sedimento del río Potomack (Washington, 1987) la bacteria no ha dejado de sorprendernos. A su capacidad para producir magnetita en los ambientes sedimentarios terrestres siguió el descubri-

miento de la respiración de uranio, la biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos derivados del petróleo, la respiración de ácidos húmicos en ambientes naturales, la respiración de electrodos conductores con la consiguiente producción de electricidad y la identificación de pili conductores (*nanowires*) como posible mecanismo de transferencia electrónica sobre óxidos de hierro. Todos ellos han llegado a nosotros a través de las páginas de *Nature* y *Science* durante los últimos 20 años. Cuando me incorporé al equipo del Dr. Lovley en 2001, apenas había un par de artículos sobre la fisiología del metabolismo central de *Geobacter*, pero el impulso del Departamento de Energía aceleró de forma determinante la investigación de este microorganismo, haciéndolo traspasar las fronteras biogeoquímicas en la que estaba confinado. En un período relativamente corto de tiempo se secuenció su genoma, se abordó un análisis transcripcional mediante *microarrays* de ADN, y se analizó su proteoma. En paralelo, se optimizó el cultivo de *Geobacter* en quimiostatos lo que permitió estudiar el metabolismo redox en condiciones de relevancia ambiental (Esteve-Núñez et al., 2005), pero también ofrecer la reproducibilidad que el análisis genómico funcional y proteómico requerían. Además, el estudio del metabolismo en quimiostatos, junto a la secuenciación del genoma, permitió la construcción de un modelo celular *in silico*, y con ello la entrada del microorganismo en una nueva disciplina: la biología de sistemas. La modelización del metabolismo central de esta bacteria (Mahadevan et al., 2006) fue desarrollada por la empresa *Genomatica* (San Diego, USA), fundada por el experto en bioingeniería de procesos B. Palsson, y cuya web (www.genomatica.com) es de visita obligada para estar al día en el campo de la modelización celular. Este tipo de modelos ofrece la distribución de flujos metabólicos de la célula (metaboloma) bajo unas determinadas condiciones fisiológicas elegidas por el investigador, permitiendo obtener predicciones o incluso analizar la distribución de flujos en mutantes virtuales. De especial relevancia han sido las predicciones obtenidas para el metabolismo de *Geobacter* cuando se encuentra limitado en aceptor de electrones, unas condiciones que simulan situaciones como la biorrecuperación de acuíferos contaminados con uranio, o como la producción de electricidad en las MFC donde el combustible (acetato) está en exceso frente a la disponibilidad del electrodo que hace las veces de aceptor.

La gran versatilidad de *Geobacter* para transferir electrones fuera de la célula (flujo exocelular) ha sido siempre relacionada con la presencia de citocromos C. No en vano es el organismo secuenciado con mayor número de genes codificantes de estos transportadores de electrones (más de cien). Para estudiar el papel de estas proteínas en el flujo exocelular de electrones recurrimos a la espectroscopía de fluorescencia, a la vez que desarrollamos y patentamos un nuevo método no invasivo, que permite monitorizar *in vivo* el estado redox de estas proteínas. Esta metodología permite el uso de fibra óptica, y por tanto la detección remota de la bacteria basada en su particular espectro de fluorescencia (Esteve-Núñez et al., 2008).

Lo que hace especial a *Geobacter* es la presencia de una red de citocromos C multihemo (algunos de ellos albergan hasta 27 grupos hemo) que, distribuidos entre la membrana interna, periplasma y membrana externa, permitirían transferir electrones desde el citoplasma hasta el exterior de la célula para respirar sustratos extracelulares como el Fe (III). O al menos éste ha sido tradicionalmente el papel otorgado a estas abundantes proteínas en *Geobacter*. No obstante, una serie de hechos ponen en duda que la respiración de Fe (III) extracelular sea la única razón de estas extensas redes multihemo. Expresar un centenar de citocromos distintos supone un coste energético elevado para la célula, que estaría plenamente justificado si el objetivo final es la respiración de sustratos extracelulares; pero ¿cómo interpretar entonces que *Geobacter* sintetice esta misma red de citocromos cuando respira sustratos solubles como fumarato o nitrato, cuya reducción tiene lugar en la membrana interna? Por otro lado, el estudio del genoma de otra δ -proteobacteria respiradora de Fe (III), *Pelobacter carbonilus*, mostró la casi ausencia de citocromos C, lo que demuestra que estas redes multihemo no son necesariamente un requisito para respirar sustratos extracelulares.

¿Para qué produce entonces *Geobacter* tantos citocromos C? Con la intención de esclarecer este punto, realizamos una serie de experimentos que sugerían cómo, en ausencia de otros aceptores de electrones, esta red multihemo podía actuar como sumidero de electrones en la célula, comportándose como un “capacitor biológico” (Esteve-Núñez *et al.*, 2008). Se ha estimado que la red de grupos hemo podría albergar hasta casi 20 millones de electrones por célula, lo que le permitiría consumir el poder reductor del citoplasma (como si de una respiración se tratase), al tiempo que mantendría el gradiente protonmotriz y por tanto la capacidad para producir ATP o hacer rotar el flagelo. La presencia del flagelo es imprescindible para la respiración de óxidos de Fe (III) en *Geobacter*, probablemente para desplazarse de una partícula sólida a otra, una vez agotado el óxido respirable. De este modo, la red de citocromos bien podría conferirle a *Geobacter* un tiempo de motilidad extra que podría ser una interesante ventaja frente a otros respiradores de hierro de su mismo hábitat natural.

Parece razonable pensar que todo este mecanismo de conducción exocelular de electrones tenga algún papel en la capacidad electrogénica de *Geobacter* que le permita oxidar el acetato y transferir a electrodos los electrones generados, con una eficiencia coulombimétrica que se ha comprobado que supera el 90 %. Efectivamente, la implicación de los citocromos C de *Geobacter* ha sido propuesta, pero hasta ahora, la única evidencia experimental se reducía al estudio de un mutante en un citocromo de membrana externa (OmcS) que, si bien probaba su participación en el proceso de transporte, no aportaba información sobre la íntima comunicación redox entre bacteria y electrodo. Para abordar esta interfase bacteria-electrodo recurrimos a un enfoque multidisciplinar, donde la electroquímica tuviera un mayor peso y se concibiera al microor-

ganismo como un elemento redox más. Así, en los últimos dos años hemos realizado avances significativos fruto de la estrecha colaboración entre el Centro de Astrobiología y el Grupo de Electroquímica de la Universidad de Alicante. En primer lugar, mostramos cómo los elementos redox sobre la superficie de *Geobacter* se ven alterados por el potencial de polarización del electrodo, y cómo estos cambios son reversibles e identificables por técnicas clásicas electroquímicas como la voltametría cíclica (Busalmen *et al.*, 2008). Más recientemente, hemos recurrido a las técnicas de espectroscopía de infrarrojo más sensibles (SEIRAS y SNIFTIRS) para estudiar, por primera vez y de forma detallada, los primeros nanómetros en la interfase generada entre una célula viva (*Geobacter*, con su actividad electrogénica intacta) y un electrodo de oro (Busalmen *et al.*, 2008a). El estudio, que acaba de ser aceptado por la prestigiosa revista de química *Angewandte Chemie*, no sólo ha demostrado que los grupos hemo de los citocromos C más externos descargan sus electrones de forma directa sobre la superficie del electrodo (Figura 2), sino que además, supone la presentación de una nueva técnica para estudiar *in vivo* la interacción entre células y materiales conductores, que confiamos hará evolucionar de forma positiva el campo de la bio-nanotecnología.

¿CUÁLES SON LAS APLICACIONES REALES DE LAS CÉLULAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS?

Una vez tratados los microorganismos presentes en las MFC y los mecanismos que utilizan, evaluemos la tecnología y sus posibles aplicaciones. Las MFC son en realidad biorreactores, que albergan la oxidación de un combustible orgánico catalizada por microorganismos. Como en cualquier otro proceso de ingeniería bioquímica, existen distintos diseños que se adaptan a la naturaleza del combustible y a la finalidad del ensayo. Las MFC más sencillas usadas a escala de laboratorio, suelen ser de dos compartimentos y tener forma de H, como la mostrada en la figura 1, pero también las hay planas y tubulares. No obstante, a la hora de escalar el proceso, la búsqueda de reducción de costes y la simplicidad del diseño, aconsejan el uso de MFC de un compartimento único con exposición directa del cátodo al aire. Todos estos diseños permiten tratamientos tanto en condiciones de estanqueidad como en continuo, y las distintas variantes han sido objeto de una reciente revisión (Du *et al.*, 2007). Otro elemento importante en el diseño de estos dispositivos es el material de los electrodos. Aunque el platino produce los mejores resultados, su elevado coste hace que el grafito, en cualquiera de sus variantes (prensado en barra, papel, fieltro, polvo), se haya convertido en el material de referencia. Comparar la eficiencia entre MFCs es complicado, dada la variabilidad de diseños y materiales empleados. No obstante, se ha llegado al consenso de utilizar como magnitud la potencia por unidad de superficie de electrodo (W/m^2) o, en algunos casos, por unidad de volumen de la cámara anódica (W/m^3). Desde el descubrimiento de los microorganismos electrogénicos, la eficiencia de las MFC ha

aumentado más de 1000 veces y en la actualidad se puede lograr una potencia de W/m² frente a los mW/m² obtenidos hace tan sólo unos años. El desarrollo de esta tecnología está todavía en su infancia, por lo que el diseño de dispositivos con menor resistencia interna, el ensayo de nuevos materiales conductores, y el empleo de cepas bacterianas electrogénicas óptimas llevará a MFC de mayor potencia.

Los combustibles que pueden utilizarse para alimentar estas MFC van desde soluciones de compuestos sencillos como el acetato o la glucosa a mezclas complejas ricas en materia orgánica como los residuos vegetales o las presentes en las aguas residuales. Es precisamente la depuración de estas últimas, mediante la utilización de MFC, una de las aplicaciones que más atención está recibiendo en la actualidad (Du *et al.*, 2007). Asimismo, se ha propuesto la adaptación de estas MFC para conseguir, en última instancia, que la corriente eléctrica se emplee en producir hidrógeno dentro del propio reactor (Cheng y Logan, 2007). Estos nuevos dispositivos bioelectroquímicos han sido denominados *Bioelectrochemical Assisted Microbial Reactor* (BEAMR). En ellos, los H⁺ se convierten en los nuevos aceptores de electrones, generándose H₂ en la cámara del cátodo. En la actualidad, y en colaboración con el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, intentamos sustituir la etapa metanogénica clásica de los tratamientos de aguas residuales por otra bioelectroquímica mediante el uso de bacterias electrogénicas como *Geobacter*, de manera que la depuración microbiana genere la electricidad necesaria para la producción de hidrógeno, un vector energético sin impacto negativo para el medio ambiente. Las MFC sedimentarias, aunque no pueden competir en potencia con las diseñadas para operar como biorreactor, en cambio sí presentan aplicaciones interesantes, ya que son los propios ciclos naturales del carbono los que proporcionan *in situ* una fuente de combustible inagotable. De este modo, es factible alimentar pequeños dispositivos analíticos situados en lugares remotos como fondos marinos o lagos. Algunos de estos han sido diseñados en los laboratorios del Departamento de Defensa estadounidense y se han denominado BUGs (Benthic Unattended Generators, <http://www.nrl.navy.mil/code6900/bug>). Otra variante de pila sedimentaria microbiana, que en la actualidad estoy desarrollando en el Centro de Astrobiología, utiliza el exudado radicular de plantas como combustible natural para bacterias electrogénicas en suelos y sedimentos.

Es importante resaltar que el desarrollo de todas estas tecnologías está todavía en sus comienzos, y que los diseños deben ser estudiados y optimizados para ofrecer

resultados competitivos. No obstante, considero que utilizar microorganismos con fines energéticos debería convertirse en un desafío científico que muestre el compromiso de la ciencia en general -y de la microbiología en particular- por intentar resolver la crisis energética global presente y futura. En el camino para lograr este pragmático objetivo -y por fortuna para los que seguimos creyendo en el valor de la ciencia básica- conseguiremos elucidar uno de los metabolismos más antiguos del planeta: la respiración microbiana anaerobia de aceptores de electrones insolubles.

REFERENCIAS

- Busalmen JP, Esteve-Núñez A y J Feliu. 2008. Electrochemical analysis of the exocellular electron-transfer to graphite electrodes in *G. sulfurreducens*. *Environ Sci Technol.* **42**: 2445-2450.
- Busalmen JP, Esteve-Núñez A, Berná A y J Feliu. 2008. Cytochromes plug electricity-producing bacteria to electrodes. *Angewandte Chemie, en prensa.*
- Cheng S y BE Logan. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* **104**: 18871-18873.
- Du Z, Li H y Gu T 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol adv* **25**: 464-482.
- Esteve-Núñez A, M Rothermich, M Sharma, y DR Lovley. 2005. Growth of the iron-reducer *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ Microbiol* **7**: 641-648.
- Esteve-Núñez A, J Sosnik, P Visconti, y DR Lovley. 2008. Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol* **10**: 497-505.
- Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, y Rabaey K. 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* **17**: 5181-591.
- Logan BE y JM Regan. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology* **14**: 512-518.
- Lovley DR. 2006 Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**, 497-508
- Mahadevan R, DR Bond, JE Butler, A Esteve-Núñez, MV Coppi, BO Palsson, CH Schilling y DR Lovley. 2006. Characterization of metabolism in the Fe (III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1558-1568.
- Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA y Bond DR. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci. USA* **105**: 3968-3973.

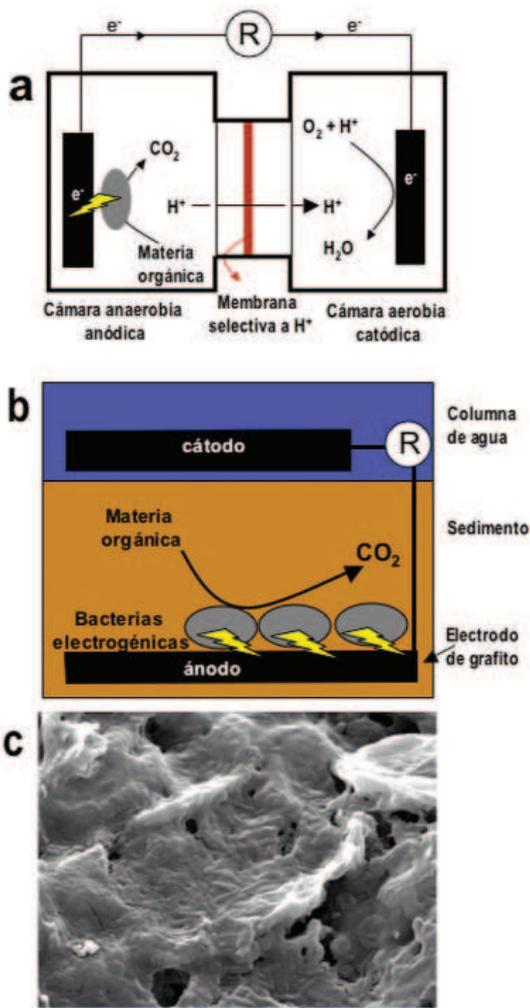


Figura 1. Pila de combustible microbiana (a) y sedimentaria (b). (c) Imagen de SEM de un biofilm electrogénico de *Geobacter sulfurreducens* sobre electrodo de grafito polarizado a 0.6 V.

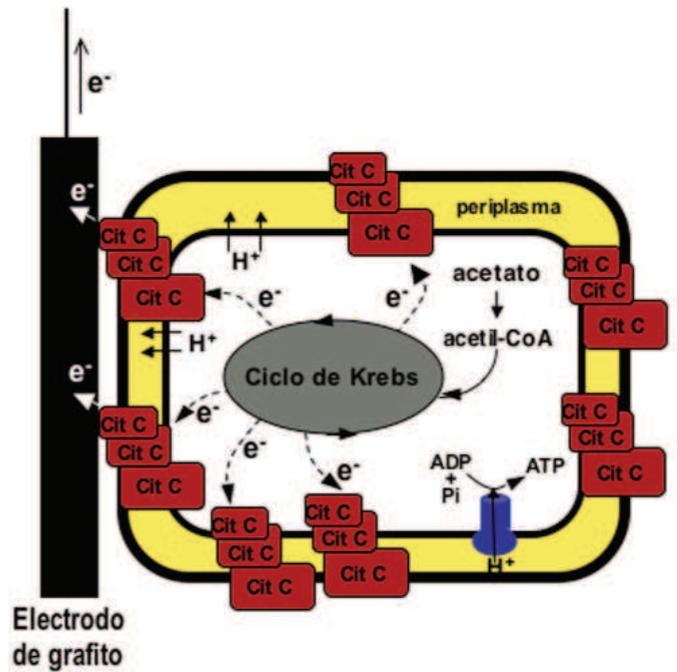


Figura 2. Modelo del metabolismo electrogénico de *Geobacter*. El acetato es completamente oxidado a través del ciclo de Krebs y el poder reductor se emplea en reducir la extensa red de citocromos C multihemo, que conecta el citoplasma con la membrana externa. Los electrones son transferidos de forma directa sobre el electrodo a través de los citocromos más externos. Los cambios redox reversibles en estos citocromos han sido detectados por espectroscopía de infrarrojo. En ausencia de sustrato respiratorio, la red de de citocromos multihemo podría aceptar electrones, actuando como un capacitor que permitiría mantener el gradiente protonmotriz y la síntesis de ATP, para mantener a la célula activa en su búsqueda de nuevos aceptores de electrones.