



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

“ESTUDIO DEL DESEMPEÑO ELECTROQUÍMICO Y
MICROBIOLÓGICO PARA UN DISEÑO DE CCM TIPO
PEM EN CUATRO FASES”

Tesis que presenta

BIOL. DIANA ESTELA SÁNCHEZ HERRERA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. México
Diciembre 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades de Energías Renovables y Biotecnología, dentro de los laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán. Noviembre de 2011.

Biol. Diana E. Sánchez-Herrera

El presente trabajo de tesis se realizó en los laboratorios de la Unidad de Energía Renovable y Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección de la Dra. Liliana Alzate-Gaviria, y la Co-dirección de la Dra. Blondy Canto Canché.

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

*Science is an imaginative adventure of the mind
seeking truth in a world of mystery.*

Sir Cyril Herman Hinshelwood

Dedico la presente tesis a mi familia que con su apoyo y formación, me han proveído de la seguridad y perseverancia para perseguir nuevas metas. Demostrado que no existe límite alguno más que el de la imaginación, quién nos provee de ideas innovadoras y la capacidad de superar cualquier obstáculo a pesar de los retos que se presenten en el camino.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero de CONACYT, mediante la beca de posgrado (294070) y el proyecto de Investigación Científica Básica (55099).

A el apoyo y dirección de la Dra. Liliana Alzate-Gaviria y la Dra. Blondy Canto Canché, que permitieron la elaboración y conclusión satisfactoria del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Xochitl Domínguez Benetton, por su tutoría y recomendaciones para la elaboración del presente trabajo de tesis.

Al M. C. Jorge Domínguez-Maldonado y al M. C. Miguel Tzec-Simá, por su apoyo y asesoría técnica en el empleo del equipo y pruebas realizadas dentro de los laboratorios de Energía Renovable y Biotecnología.

Al Dr. Rafael Rojas Herrera, por su apoyo y asesoría técnica, así como la prestación de las instalaciones y equipo del laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán, para la realización de las pruebas de biología molecular en la identificación de los microorganismos empleados en el presente trabajo.

Al Dr. Bill Eggers y la Dra. Daniella Esperanza Pacheco Catalán por sus asesorías para el análisis de los datos obtenidos en las pruebas electroquímicas de voltametría cíclica e impedancia.

Al Ing. Leonardo Gus Peltinovich y al Ing. César Ortiz Clavel, por su apoyo y asistencia técnica en el ensamblado de las CCM.

A la Ing. Silvia Andrade, por la adquisición de las microscopias electrónicas de barrido empleadas en el presente trabajo.

Al apoyo de mis compañeros de laboratorio Br. Merly Zurai Arguello Imterian y al Ing. Bioq. Isaías Peraza Baeza, mis compañeros de la segunda generación de la maestría en energía renovable, y a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron para que el presente trabajo llegara a buen término.

INDICE

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1	5
ANTECEDENTES	5
1.1 Funcionamiento de una celda de combustible microbiana.....	5
1.2 Celdas de combustible microbianas para generación de energía alternativa y tratamiento de aguas residuales.	7
1.3 Retos.....	8
1.4 Inóculos microbianos mixtos.....	10
1.5. Interacciones en comunidades bacterianas.....	12
1.6 Influencia del pH	14
1.7 Parámetros de evaluación del desempeño de una CCM.....	17
1.7.1 Demanda química de oxígeno.....	17
1.7.2 Densidad de potencia (P_{An}).....	17
1.7.3 Densidad de corriente (i).....	17
1.7.4 Eficiencia coulombica.....	18
1.7.5 Curvas de polarización.....	18
1.7.6 Espectroscopia de impedancia electroquímica.	22
1.7.7 Voltamperometría cíclica (VC).....	26
1.8 Mecanismos de transferencia de electrones.....	28
1.8.1 Transferencia Directa de electrones (TDE): procede a través de proteínas redox de membrana (sin implicar especies disueltas).....	28
1.8.2. Transferencia Mediada de electrones (TME)	32
i. Mediadores artificiales.....	32
ii. Metabolitos primarios	33

iii. Metabolitos secundarios.....	39
1.9 Técnicas de identificación.....	41
1.10 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	45
JUSTIFICACIÓN.....	47
HIPÓTESIS.....	47
CAPÍTULO 2.....	48
METODOLOGÍA.....	48
2.1 Diseño de la CCM.....	48
2.2 Pruebas de estanqueidad, inicio de las CCMs y determinación de las fases de estudio.....	50
2.3 Inóculo y fuente de carbono.....	53
2.4 Modo de operación de la CCM.....	53
2.5 Evaluación del desempeño de la CCM.....	53
2.5.1 Pruebas químicas y físicas.....	53
2.5.2 Pruebas eléctricas y electroquímicas.....	54
2.6 Identificación microbiana.....	58
2.7 Análisis de microscopía.....	61
CAPÍTULO 3.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
3.1 Densidades de corriente y de potencia, potencial a circuito abierto y pH.....	62
3.2 Demanda química de oxígeno.....	64
3.3 Eficiencia coulombica, AGVs y porcentaje de CH ₄ e H ₂	64
3.4 Voltametría cíclica.....	65
3.5 Impedancia.....	70
3.5.1 Selección de elementos del circuito equivalente.....	71
3.5.2 Representaciones gráficas (Nyquist y Bode) y ajuste de datos al circuito equivalente.....	72
3.5.3 Resistencia interna y resultados del ajuste del circuito equivalente (R _Ω , R _{TC} y R _D).....	84
3.6 Análisis del anolito y electrodo mediante DGGE.....	89

3.7 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	93
CONCLUSIONES	97
PERSPECTIVAS	98
BIBLIOGRAFÍA	99

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Comunidades bacterianas en diferentes CCM operadas con diferentes inóculos y sustratos.	11
Tabla 2. Desempeño de CCM con inóculos bacterianos puros y mixtos.	12
Tabla 3. Potenciales medidos para la TDE en diferentes especies bacterianas.	30
Tabla 4. Eficiencia energética teórica de la TDE. ³	31
Tabla 5. Mediadores redox exógenos empleados en CCM. ³	33
Tabla 6. Potenciales biológicos estándares de donadores y aceptores de electrones. ³	35
Tabla 7. Especies bacterianas identificada en CCM y su posible metabolismo y vía de transferencia de electrones. ¹⁸	38
Tabla 8. Mediadores redox bacterianos. ³	40
Tabla 9. Técnicas moleculares para identificación de microorganismos en CCM. ²³	42
Tabla 10. Técnicas pre-genómicas para identificación de electrogénicos en CCM.	44
Tabla 11. Pruebas realizadas con relación a las fases de análisis planteadas para el presente estudio.....	52
Tabla 12. Arreglo de electrodos para los estudios realizados.....	57
Tabla 13. Comparativa de las R_{int} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.	86
Tabla 14. Comparativa de las R_{Ω} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.	87

Tabla 15. Comparativa de las R_{TC} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio. 88

Tabla 16. Comparativa de las R_D obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio. 89

Tabla 17. Picos de reacción de las VC en cámara anódica, anolito y biopelícula, de las cuatro fases de estudio y sus probables reacciones. NI: no identificado..... 44

LISTADO DE FIGURAS

< Figura 1. Principio de funcionamiento de una CCM. e-: Electrones, C+: Cationes, A: Aniones, O: Oxígeno. ^{3, 18}	6
Figura 2. (a) Microscopia electrónica de barrido (MEB) de la cepa <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1, se muestra la presencia de nanocables que la interconectan con otras cepas bacterianas (b) Ánodo de una CCM colonizada por <i>S. oneidensis</i> MR-1. (c) Imagen de una SEM de <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> y <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (señalada con una flecha) en co-cultivos metanogénicos, interconectadas por nanocables. ⁸⁰	13
Figura 3. Potenciales de los electrodos (vs. Calomel saturado [SCE]), en función de la densidad de corriente obtenida de las cuatro CCM a diferentes pHs (ánodo: cátodo). ●, ■, ▲: datos del ánodo. ○, □, △: datos del cátodo. ⁹²	16
Figura 4. Curva de polarización ideal para una CCM. ⁴⁴	20
Figura 5. Efectos de polarización. (A) densidades de corriente generadas por el potencial de la celda. (B) densidades de potencia vs densidad de corriente. Los datos fueron tomados cada hora durante un intervalo de 12-24 hrs, de los días 20 al 30 de experimentación. F1: fase 1 (20-31 días), F2: fase 2 (103-114 días). ⁵⁰	21
Figura 6. Representación de Nyquist obtenida de los espectros de impedancia de dos CCM con electrodos de tela de carbón y fibra de grafito. ³³	23
Figura 7. Dependencia de la R_{int} respecto al voltaje de la celda, bajo cuatro condiciones diferentes. MR-1: cepa modificada de <i>Shewanella oneidensis</i> ; esferas SS: acero inoxidable. ⁵¹	24
Figura 8. Impedancia del ánodo en ausencia o presencia de <i>S. oneidensis</i> MR-1, y del cátodo con platino: (a) módulo de impedancia (b) fase de ángulo. ⁵⁴	25

Figura 9. Resistencias de polarización del ánodo y cátodos, en función del pH del electrolito. R_p^a : resistencia de polarización del ánodo. R_p^c : resistencia de polarización del cátodo. ⁵⁵	25
Figura 10. Voltametrías cíclica de la biopelícula formada por <i>G. sulfurreducens</i> , a las 0 hrs cuando se realizó la inoculación, y a las 72 h cuando se observó la máxima generación de corriente. ⁴⁷	27
Figura 11. Voltametrías cíclicas a diferentes concentraciones de acetato en el sustrato (μM). ⁴⁷	28
Figura 12. Ilustración de la TDE vía (A) citocromos de membrana, (B) nanocables electroconductores. ³	29
Figura 13. Microscopia de escaneo por tunelamiento, sobre nanocables aislados de una cepa silvestre MR-1, con un diámetro lateral de 100 nm. Las flechas indican la ubicación del nanocable y un desnivel en la superficie del ánodo de grafito. ⁸³	30
Figura 14. Representación esquemática de la TME vía metabolitos primarios por aceptores terminales de electrones reducidos (en el citoplasma) AE^{red} : Aceptor de electrones reducido. AE^{ox} : Aceptor de electrones oxidado. ³	34
Figura 15. Representación esquemática de la TME vía metabolitos primarios por la oxidación de productos reducidos de la fermentación. AE^{red} : Aceptor de electrones reducido. AE^{ox} : Aceptor de electrones oxidado. ³	37
Figura 16. TME a través de metabolitos secundarios Med^{ox} : mediador oxidado. Med^{red} : mediador reducido. ³	40
Figura 17. MEB de la biopelícula establecida a los 36 días en una CCM (tipo PEM) alimentada con hidrolizado de trigo y ARS. Aumento 6000 X, a 40KV. Escala $1\mu\text{m}$. ¹³⁵ ...	45
Figura 18. Celda ensamblada	49

Figura 19. Soporte de la membrana.....	49
Figura 20. Configuración de cámara anódica y catódica.	49
Figura 21. Pruebas de estanqueidad de las cámaras de la CCM. C_{NM} : Colorante naranja de metilo. C_{AM} : colorante azul de metileno.....	50
Figura 22. Pruebas de fugas en las tapas de la CCM.....	51
Figura 23. Diagrama general del diseño experimental.....	52
Figura 24. Densidades de corriente y de potencia máximas, y potenciales de circuito abierto (\leftrightarrow) obtenidos semanalmente.....	62
Figura 25. Concentración de ácidos grasos volátiles (butírico, propiónico y acético) presentes en cada una de las cuatro fases de análisis.	65
Figura 26. Voltamperograma del blanco CCM. J: densidad de corriente, Ewe: potencial en volts. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.....	66
Figura 27. Voltamperograma cámara anódica: Fase I, II y III. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.	67
Figura 28. Voltamperograma cámara anódica: Fase IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.	67
Figura 29. Voltamperograma biopelícula: Fase I, II, III y IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.....	68
Figura 30. Voltamperograma biopelícula: Fase IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.....	69
Figura 31. Voltamperograma anolito: Fase I, II, III y IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.....	70

Figura 32. Circuito equivalente propuesto para el análisis de impedancia en las pruebas experimentales de cámara anódica, biopelícula y anolito. R1: resistencia óhmica. R2: resistencia por transferencia de carga. R3: resistencia por procesos de difusión. Q2: elemento de fase constante. W3: elemento de warburg.....	70
Figura 33. Diagrama de Nyquist del blanco, media celda. $-Im(Z)$: impedancia parte imaginaria. $Re(Z)$: impedancia parte real.	73
Figura 34. Diagrama de Bode: blanco. Phase (Z) deg: Ángulo de fase en °. Freq/Hz, log spacing: Logaritmo de la frecuencia en Hz.	74
Figura 35. Diagrama de Nyquist cámara anódica (A: fase I y B: fase II).	75
Figura 36. Diagrama de Bode media celda (A: fase I, B: fase II y C: fase III).	77
Figura 37. Diagrama de Nyquist biopelícula (A: fase I y B: fase II)	79
Figura 38. Diagrama de Bode biopelícula (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV)..	81
Figura 39. Diagrama de Nyquist anolito (A: fase I y B: fase II).	82
Figura 40. Diagrama de Bode, anolito (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV).	83
Figura 41. Amplificación por PCR de fragmentos del ADNr 16S empleando los primers V1-V5. MP: marcador de peso molecular, 1Kb. AI, AII.: anolito fase I, anolito fase II...; EI, EII...: electrodo fase I, electrodo fase II...; I: inóculo; -: control negativo; +: control positivo	89
Figura 42. Amplificación por PCR de fragmentos del ADNr 16S empleando los primers V3-V5.	90
Figura 43. DGGE de las regiones hipervariables V3-V5. AI, AII, AIII y AIV: anolito fase I, II, III y IV. EI, EII, EIII y EIV: electrodo fase I, II,III y IV. I: inóculo	92

- Figura 44 .** Microscopia electrónica de barrido de la tela de carbón estéril usada para la preparación del electrodo biológico (formación posterior de biopelícula bacteriana). A: Vista general de la tela a 40X. B: Acercamiento a las fibras de la tela de carbón (6000 X) 93
- Figura 45 .** Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase I. A: Vista panorámica a 70X. B: Acercamiento a 22 000 X. 93
- Figura 46.** Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase II. A: Vista panorámica a 30X. B-J: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías. 94
- Figura 47.** Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase III. A: Vista panorámica a 30X. B-G: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías. 95
- Figura 48.** Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase IV. A: Vista panorámica a 33X. B-I: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías. 96

RESUMEN

Una de las aplicaciones de las CCM es la generación de energía eléctrica a partir de sustratos orgánicos, empleando microorganismos como biocatalizadores, además permiten el tratamiento de aguas residuales de altas o bajas cargas orgánicas, dado a eficiencias de hasta un 99% en remoción. El presente estudio evalúa el desempeño de una CCM tipo PEM y la evolución de la composición de la biopelícula establecida en el ánodo. Se elaboraron nueve celdas: cuatro para análisis electroquímicos, cuatro para análisis de microscopía electrónica de barrido y una blanco (sin inóculo). Se implementó el mismo inóculo mixto y modo de operación (Semi batch, alimentación cada 24 hrs con acetato y agua residual sintética). La evaluación del desempeño se determinó mediante densidades de corriente y potencia, y pruebas electroquímicas (voltametría cíclica e impedancia), empleando un potenciostato BioLogic, modelo VSP (Science Instruments) y software EC-Lab® (Versión 10.18). La demanda química de oxígeno se determinó de acuerdo a la APHA. Se tomaron fotomicrografías de microscopía, mediante un microscopio electrónico de barrido de presión variable marca Jeol, modelo JSM-6360 LV; empleando la técnica según Bretschger (2008). Los resultados obtenidos demuestran una tendencia del sistema hacia el incremento en la densidad de potencia ($15.32\text{-}68.28 \text{ W/m}^2$) y la densidad de corriente ($210.88\text{-}347 \text{ mA/m}^2$). Se observa estabilidad en el potencial a circuito abierto ($520\text{-}704 \text{ mV}$). La tendencia en la disminución de la resistencia interna del sistema en media celda de la fase II a la fase IV ($10.4\text{-}4.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$), comprueba teorías previas que atribuyen dicho patrón al establecimiento de biopelículas bioelectroquímicamente activas, permitiendo una mejor transferencia de electrones en el sistema. Los estudios de voltametría cíclica (VC) comprueban la actividad electroquímica de la cámara anódica, la biopelícula y el anolito. Se atribuye la transferencia de electrones de manera indirecta por presencia de mediadores redox exógenos en el anolito y directa por la actividad electroquímica reportada en el caso de la biopelícula en la última fase de análisis (fase IV). Las fotomicrografías mostraron un incremento en la diversidad morfológica de los microorganismos, conforme aumenta el tiempo de exposición de la película. En la Fase I (70 días) se observa una dominancia de bacilos, mientras que en la Fase II (84 días) se observa la presencia otras formas

microbianas tales como diplobacilos, cocos, estreptococos y estafilococos; además de apéndices bacterianos (posiblemente nanocables) interconectando células entre sí, y promoviendo la adherencia de las mismas al electrodo. En las fases III y IV se observa un incremento considerable en cuanto a la cantidad de microorganismos y su colonización entre las fibras de electrodo de la cámara anódica. Con base a los resultados previos se concluye que el diseño de CCM planteado es funcional y competitivo en cuanto a las densidades de potencia obtenidas, considerando la ausencia de catalizador en el cátodo, y por la presencia de microorganismos electroquímicamente activos tanto en la biopelícula como en el anolito (como se demuestra en los estudios de VC). La mayoría de las pérdidas energéticas se encontraron relacionadas con las resistencias generadas por los procesos de transferencia de carga, por lo cual se propone la implementación de estrategias para la disminución de la misma, esperando promover un sistema bioelectroquímico más eficiente en cuanto a las densidades de corriente generadas.

ABSTRACT

One of the applications of the MFC is the energy generation through catalytic reactions of microorganisms using organic substrates; moreover it allows the wastewater treatment with high and low organic loads, with a removal up to 99%. The present research evaluates the performance on a PEM MFC, and the evolution of the composition of the biofilm established on the anode. Nine cells were constructed: four for the electrochemical analysis, four for the scanning electron microscopy (SEM) analysis, and one as a control (without inoculum). The same mixed inoculum and operation mode were use in each cell (semi-batch, 24 h alimentation with acetate and synthetic wastewater). The MFC performance were determinate by the calculation of the power and current density, and electrochemical analysis (cyclic voltammetry and impedance), using a BioLogic potentiostat, VSP model (Science Instruments) and the software EC-Lab® (Version 10.18). The oxygen chemical demand was determinate as described by APHA. The photomicrographs were taken with a SEM Jeol model JSM-6360 LV, using the technique of Bretschger (2008). The results present a system tendency to increment the power density ($15.32-68.28 \text{ W/m}^2$) and current density ($210.88-347 \text{ mA/m}^2$). It was show a relative stable open circuit voltage ($520-705 \text{ mV}$). The tendency on the diminishment of the internal resistance from the phase II to the phase IV ($10.4-4.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$), may be proof of previous theories that attribute this tendency to the establishment of an electrochemical active biofilm, allowing an improvement in the electron transfer at the system. The studies of cyclic voltammetry (CV) prove an electrochemical activity at the anode chamber, biofilm and anolyte; therefore is possible that the electron transfer take place indirectly by the presence of natural exogenous redox mediators at the anolyte, and also directly by the electrochemical reactions reported in the biofilm analysed at the last phase of analysis (phase IV). The photomicrographs show an increment on the morphological diversity of the microorganisms, as the time of the biofilm exposition was prolonged. A predominance of bacillus at the phase I (70 days) were shown, while in the phase II (84 days) other microbial morphologies appear, like: diplobacillus, coccus, streptococcus and staphylococcus, also there were show bacterial appendix (possibly nanowires) between cells, providing a way to

colonize the electrode. In the phases III and IV a considerable increment of the amount of microorganism were show, also this increment were show by the colonization in between the fibres. Based on the previous statements, it can be conclude that the MFC design appears to be functional and competitive in terms of power density (considering no artificial catalyst were used at the cathode) and the presence of electrochemical active microorganisms at the biofilm and the anolyte as well (as show by the VC analysis). Most of the energetic loses were related to the resistances generated by the charge transfer process, therefore the implementation of strategies for the diminishment of this type of losses is proposed in the behalf of the improvement of the bioelectrochemical system, in terms of generated current density.

INTRODUCCIÓN

De manera general, una celda de combustible microbiana (CCM) puede definirse como un dispositivo bioelectroquímico que emplea microorganismos para la oxidación de sustratos (biodegradables), mediante una actividad catalítica autótrofa u heterótrofa, capaz de lograr la conversión de la energía química contenida en los mismos, a energía eléctrica.¹⁻

³ Las principales ventajas de este tipo de sistema bioelectroquímico, son su capacidad de operación en condiciones mesofílicas y una gama ilimitada de sustratos potenciales para su utilización.³

Se ha encontrado, por medio de técnicas electroquímicas y de microscopía, que los microorganismos contribuyentes a la producción de energía son aquellos que colonizan de manera selectiva la superficie del electrodo.^{4,5} Algunos de los factores determinantes de dicho proceso son la estructura y tipo de material del electrodo, composición y condiciones del medio^{4,6} así como el origen del inóculo bacteriano.^{7,8}

Se han llevado a cabo varios estudios enfocados al análisis de las comunidades bacterianas empleando técnicas de filogenética molecular (ej., análisis de secuencia de genes 16S rRNA)⁹⁻¹⁷. Sin embargo, la presencia de microorganismos no identificables en diferentes CCM, dificulta correlacionar la estructura de la comunidad, la actividad microbiana y el desempeño de la celda.⁹⁻¹⁷

Rabaey *et al.* (2004) llevaron a cabo un análisis de la comunidad bacteriana (de una planta procesadora de papas en Waregem, Bélgica) establecida a través del tiempo en una CCM (tipo PEM) alimentada con glucosa (1 g glucosa/L·día). Empleando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y secuenciando las bandas dominantes, encontraron gran diversidad genética. Lograron identificar secuencias pertenecientes a bacterias de los taxones Firmicutes y β -, γ - y α -Proteobacteria.¹⁰ Se reportó una predominancia de bacterias anaerobias facultativas, tales como *Alcaligenes faecalis* (Gram-negativa) y *Enterococcus gallinarum* (Gram-positiva), probablemente debido al

empleo de un sustrato fermentable (glucosa). Las muestras colectadas y analizadas de este reactor generaron electricidad (4.31 W/m^2) y produjeron importantes concentraciones de mediadores de elevada coloración azul, tales como la ficocianina azul generada por *Pseudomonas aeruginosa*. Por consiguiente, se dedujo que la producción de mediadores fue la principal razón de la alta potencia eléctrica, en conjunto con la disminución del sobrepotencial anódico, considerando como factores limitantes en el desarrollo de la comunidad microbiana, el oxígeno y el ferricianuro.¹⁰

La variación en la conformación de las comunidades bacterianas en función del tipo de sustrato empleado en CCM tipo PEM, puede ser apreciada en el estudio realizado por Phung *et al.* (2004). Estos autores identificaron las comunidades bacterianas con base en las secuencias de fragmentos de los 16S rDNA y por detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por su siglas en inglés). Empleando un inóculo proveniente del sedimento de un río; cuando la CCM fue alimentada con agua del río, la evolución de la biopelícula predominantemente estuvo conformada por β -Proteobacterias (relacionadas con *Leptothrix* spp), mientras que al alimentar el sistema con una mezcla de glucosa-ácido glutámico, predominaron las α -Proteobacterias (principalmente Actinobacterias).

Analizando la composición bacteriana encontrada, en función con la fuente de inóculo, se puede hacer referencia a los trabajos de caracterización de inóculos mixtos provenientes de aguas residuales, realizados por Kim *et al.* (2004) y Lee *et al.* (2003), quienes encontraron una composición similar de biopelículas en sus sistemas experimentales. Kim *et al.* (2004) hallaron 25% β - y 20% α -Proteobacteria, y 19% de grupos Cytophaga, Flexibacter y Bacteroides, mientras que Lee *et al.* (2003) identificaron un 24% α -, 7% β -, 21% γ - y 21% δ -Proteobacteria. De manera similar en el caso de inóculos provenientes de sedimentos marinos, Logan *et al.* (2005) analizaron la composición bacteriana establecida, mediante las secuencias obtenidas de bandas identificadas mediante DGGE y una librería de clonas de 16S rDNA; encontrando que la comunidad bacteriana mayoritaria pertenecía a gamma-Proteobacterias (97%), de las cuales

la mayoría presentaron una gran similitud a *Shewanella affinis* KMM 3686 (40 % de las clonas), siendo *Vibrio* spp. y *Pseudoalteromonas* spp. las siguientes en abundancia.

A diferencia de las CCM tipo PEM mencionadas anteriormente, en una CCM de sedimentos se aprecia una tendencia hacia la dominancia de δ -Proteobacterias. En estos sistemas, el ánodo se encuentra inmerso en un sedimento anóxico y condiciones de estricta anaerobiosis. En una CCM de sedimento marino, el 71% de las secuencias obtenidas de la librería de clonas 16S rDNA, pertenecían a δ -Proteobacterias, y 70% de estas correspondieron a la familia Geobacteraceae.¹⁷ En un sistema similar Tender *et al.* (2002) reportaron un 76% de δ -Proteobacterias, de las cuales el 59% pertenecían a la familia Geobacteraceae, presentando más de 95% de similaridad a *Desulfomonas acetoxidans*. En una comparación de muestras de sedimentos marinos, agua dulce y marismas, llevada a cabo en cinco laboratorios y mediante pruebas de campo (en sedimentos de marismas de Nueva Jersey y estuarios en Oregón, EU), se observó la predominancia de δ -Proteobacterias (54-76% de las secuencias de genes fueron obtenidas de muestras tomadas del ánodo), seguidas en abundancia por gamma-Proteobacteria (9-10%), Cytophaga y Firmicutes (11.6%).¹⁷ No obstante, las similitudes encontradas en cuanto a las comunidades bacterianas identificadas en este tipo de sistemas (por diferentes autores), requiere de estudios de mayor análisis que permitan identificar la predominancia de ciertos grupos bacterianos y el desempeño de la CCM.

Considerando lo anterior, los trabajos realizados dentro de este campo de investigación, han planteado estrategias de estudio que implementan un análisis enfocado a aspectos microbiológicos o bien a aspectos de diseño y desempeño de la CCM. Es por ello que el presente estudio pretende colaborar en el área, aportando conocimiento respecto al desempeño electroquímico de la CCM y la sucesión de la biopelícula establecida en el ánodo, planteando un enfoque que integre ambos tipos de análisis para un mejor entendimiento en cuanto el funcionamiento y la mejora del desempeño en cuanto a las CCM tipo PEM.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación del desempeño electroquímico y microbiológico en CCM tipo PEM, para cuatro fases de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y ensamblar un prototipo de CCM tipo PEM.

Para cada una de las fases de estudio:

- Analizar el desempeño de la CCM en función de las densidades de corriente y potencia obtenidas, así como de los resultados de las pruebas electroquímicas de impedancia y voltametría cíclica.
- Determinar las concentraciones de ácidos grasos volátiles, y porcentajes de metano e hidrógeno.
- Realizar un análisis sobre la sucesión microbiológica de la biopelícula establecida en el ánodo mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE).
- Identificar la presencia de mecanismos de transferencia de electrones en la CCM, mediante las pruebas de voltametría cíclica realizadas en media celda, biopelícula y anólito

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

El presente capítulo tiene como objetivo, proporcionar información referente al marco teórico sobre el presente trabajo de investigación, partiendo desde el funcionamiento y definición de una CCM, hasta aspectos tales como: aplicación para la generación de energías alternas y tratamiento de aguas residuales, principales retos, inóculos mixtos empleados, interacciones de las comunidades bacterianas, influencia del pH, parámetros de evaluación del desempeño, mecanismos de transferencia de electrones, técnicas para identificación microbiana y la aplicación de microscopía electrónica de barrido en la caracterización de la comunidad bacteriana del electrodo.

1.1 Funcionamiento de una celda de combustible microbiana.

De manera general, una celda de combustible microbiana (CCM) puede definirse como un dispositivo bioelectroquímico que emplea microorganismos para la oxidación de sustratos (biodegradables), mediante una actividad catalítica autótrofa u heterótrofa, capaz de lograr la conversión de la energía química contenida en los mismos, a energía eléctrica.¹⁻³ El principio básico de su funcionamiento, se basa en la extracción de la energía disponible en el sustrato orgánico suministrado al sistema (en el caso de CCM heterótrofas), convirtiéndolo de manera directa en electricidad, protones y CO₂. Esto se logra cuando las bacterias cambian su aceptor final de electrones natural, como oxígeno o nitrato, a un aceptor soluble (ánodo) o insoluble (mediador).¹⁸ Los mecanismos de transferencia de electrones al ánodo son discutidos en la sección 1.8 del presente documento.

Los microorganismos en la cámara anódica oxidan los sustratos, generando electrones y protones, entre otros productos. Los electrones son transferidos al ánodo y posteriormente pasan al cátodo a través de un circuito eléctrico externo. El flujo de electrones se genera debido a la diferencia de potencial entre los electrodos, permitiendo así la generación de electricidad. El intercambio iónico dentro de la CCM puede darse a través de una membrana de intercambio en el caso de CCM tipo PEM (dichas membranas pueden ser: protónicas, aniónicas o bipolares), por separadores porosos tales como membranas de

filtración microporosas, de fibra de vidrio o fibras de celulosa, o bien por un puente salino;¹⁹ de igual forma puede no emplearse ninguno de los separadores anteriormente mencionados y permitir el paso de los iones de manera directa a la región catódica, donde se reducen en presencia de oxígeno (por medio de un catalizador artificial como el platino, o bien un biocatalizador como enzimas o bacterias), generando agua.¹⁸ Dicho proceso se puede observar en la figura 1.

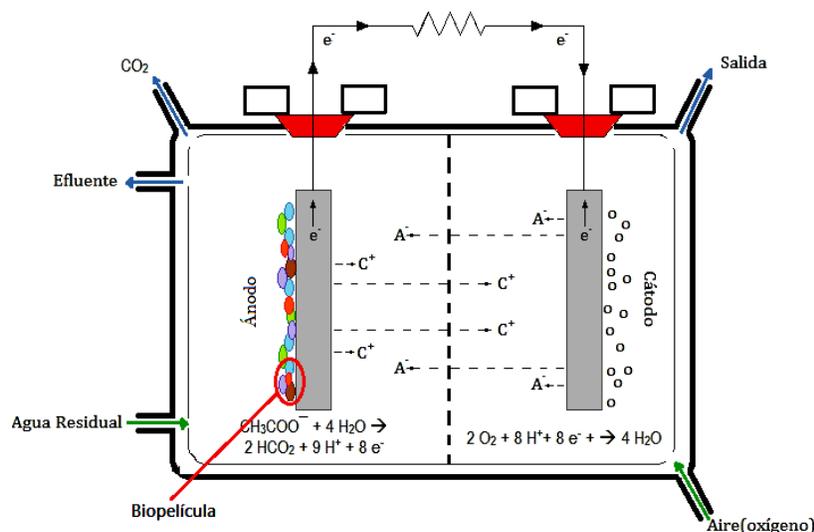
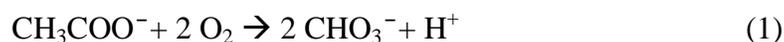


Figura 1. Principio de funcionamiento de una CCM. e-: Electrones, C+: Cationes, A: Aniones, O: Oxígeno.^{3, 18}

De acuerdo a Du *et al.* (2007) las reacciones típicas llevadas a cabo en los electrodos (usando acetato como sustrato) en condiciones estándar con una concentración 5 mM, un pH de 7, a una temperatura de 298.15 °K y presión de 0.2 bar, son las siguientes:

Reacción general:



Con una generación de potencia teórica máxima de 1.101 V.²¹

Reacción anódica:



Potencial de la reacción de oxidación en condiciones de equilibrio: 0.187 V (NHE).²¹

Reacción catódica:



Potencial de la reacción de reducción en condiciones de equilibrio: 1.229 V (NHE).²¹

1.2 Celdas de combustible microbianas para generación de energía alternativa y tratamiento de aguas residuales.

Las energías renovables prometen ser parte de la solución a la crisis energética actual, además de ser una alternativa amigable con el ambiente. En este aspecto la generación de electricidad a través de este tipo de tecnologías, ha abierto un campo favorable en para promover su implementación.⁵⁶

Las CCM poseen varias ventajas, tanto operacionales como funcionales, en comparación con las actuales tecnologías empleadas para la generación de electricidad a partir de residuos orgánicos o aguas residuales.^{20,22-23} Por lo general los compuestos fácilmente bio-degradables son carbohidratos sencillos tales como monosacáridos y disacáridos, o bien ácidos orgánicos de bajo peso molecular, almidón y aminoácidos.^{14, 34, 57-59} Muchos de ellos, se emplean como materia prima para la generación de productos químicos de alto valor agregado. Desde este punto de vista, las CCM pueden emplear aguas residuales, materia orgánica de sedimento marino u otros residuos orgánicos que no representan una pérdida potencialmente económica, ya que actualmente no son valorizados para la fabricación de productos de interés.⁵⁶

La generación directa de electricidad en las CCM no requiere de una inversión de energía externa para llevar a cabo la conversión de la materia orgánica a energía con una eficiencia de hasta el 98%,²⁴ a diferencia de los tratamientos basados en procesos anaeróbicos que solo recuperan un tercio de la energía empleada durante el proceso de combustión térmica del biogás, con una pérdida energética considerable, superior al 60%.²³⁻

24

Durante el tratamiento de aguas residuales en CCM se promueve el crecimiento de microorganismos electroquímicamente activos que poseen buena estabilidad operacional. En algunos casos se ha reportado una remoción de compuestos orgánicos con más del 95% de demanda química de oxígeno (DQO)⁶²⁻⁶³ y eficiencias coulombicas de hasta 90%.⁵⁹ Hay

que destacar que dichos resultados, se han dado en sistemas que emplearon Pt u otros catalizadores artificiales tales como ferrocianuro, en el cátodo.

De manera teórica se ha calculado, que una CCM a gran escala puede llegar a generar una densidad de corriente de hasta 1000 A/m^3 , esto es considerando una carga orgánica de 7.1 kg/m^3 , lo cual semeja los valores contemplados para sistemas convencionales en el tratamiento de aguas residuales, tales como lodos activos con $0.5\text{-}2 \text{ kg DQO/m}^3$ (equivalente a $380\text{-}960 \text{ W/m}^3$) y sistemas anaeróbicos con $8\text{-}20 \text{ kg DQO/m}^3$ (equivalente a $1200\text{-}3000 \text{ W/m}^3$).⁶⁵ No obstante la máxima densidad de corriente reportada en la literatura ha sido de 20 A/m^2 .⁶⁴

1.3 Retos.

Las densidades de potencia de las CCM empleando agua residual sintética u otros compuestos de fácil degradación, disminuyen cuando éstas mismas son alimentadas con aguas residuales reales domésticas, agrícolas o de la industria alimenticia; dado que éstas poseen una gran diversidad de compuestos complejos la velocidad de reacción por oxidación del sustrato, se lleva a cabo de manera más lenta por parte de los microorganismos.²⁵ Esto puede deberse a que la comunidad microbiana anódica no puede degradar compuestos orgánicos complejos con la misma facilidad que los sustratos más simples; o bien, debido a otros procesos metabólicos que compiten por la utilización del sustrato tales como la metanogénesis.²⁶ Ejemplo de dicha limitación es el experimento llevado a cabo por Liu y Logan (2004), quienes empleando una CCM de una cámara (fuente de carbono: acetato) lograron generar una densidades de potencia de $494\pm 21 \text{ mW/m}^2$ (CCM sin PEM) a $262\pm 10 \text{ mW/m}^2$ (CCM con PEM), y de $146\pm 8 \text{ mW/m}^2$ (CCM sin PEM) a $28\pm 3 \text{ mW/m}^2$ (CCM con PEM) cuando emplearon agua residual doméstica (ARD) como fuente de alimentación.

Las CCM se han empleado en la remoción de componentes inhibidores de fermentación en efluentes de biorefinerías de compuestos celulósicos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido vanílico, 4-hidroxibesaldehído y 4-hidroxiacetofenona)²⁸ en búsqueda de un óptimo aprovechamiento de los residuos generados en este tipo de procesos. El empleo de agua residual real (ARR) puede llegar a contener ciertas

concentraciones de sustancias inhibitoras de procesos biológicos, que conllevan a una disminución en el desempeño de las CCM.²⁵ Un ejemplo de ello, es el estudio realizado para comprobar la influencia de la concentración de amonio durante la alimentación de una CCM, la adaptación de la comunidad microbiana se vio afectada por las altas concentraciones de amonio, observando un decaimiento de hasta 1.4 W/m^3 a una concentración de 10 gr/L ²⁹. Este tipo de pérdidas, por inhibición y presencia de componentes complejos en las ARR, se han intentado compensar por medio de pretratamiento de las mismas o aclimatación del inóculo mediante la adición gradual del ARR. Un ejemplo de ello es el trabajo de Feng *et al.* (2010), quien emplea una CCM con deflectores como separadores y 2 cátodos aireados. Realiza una primera estabilización de la CCM aplicado una alimentación con agua residual sintética (ARS) y glucosa (1 gr/L) durante 30 días, posteriormente emplea ARR de una procesadora de maíz pretratada con steam-explosion (por sus siglas en inglés) adicionando 1 g/L de glucosa, 12.5 mL/L de solución de metales traza y 5 mL/L vitaminas. Finalmente, de manera gradual disminuye la concentración de glucosa en un 20% cada 2 días, con el propósito de aclimatar el consorcio bacteriano al ARR. Con lo anterior la densidad de potencia máxima obtenida fue de 10.7 W/m^3 con ARR, lo cual representó casi el 50 % de lo generado con ARS y glucosa (20.8 W/m^3).

Otro reto importante es el escalamiento para su comercialización, ya que Las CCM se encuentran en una fase de desarrollo a nivel experimental y piloto; los reactores de mayor capacidad reportados poseen un volumen anódico interno de 0.388 a 15 L.³¹⁻³⁷ En Yatala, Queensland, Australia existe una planta piloto que opera con 12 CCM tubulares de $3 \text{ m} \cdot 0.18 \text{ m}$, y un volumen de 2,500 L. Dicha planta piloto, alimentada por agua residual de una cervecería, con una carga orgánica de 0.5 Kg/L y un pH de 4.5, genera una densidad de potencia catalítica de 0.5 W/m^2 y volumétrica de 8.5 W/m^3 , y logra una remoción de $\approx 0.2 \text{ Kg/ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$.³⁸

1.4 Inóculos microbianos mixtos

Inicialmente, las bacterias electroquímicamente activas fueron consideradas como las reductoras de hierro, entre las que se encuentran *Shewanella* spp.⁶⁶ y *Geobacter* spp.⁶⁷ sin embargo, análisis posteriores revelaron una diversidad bacteriana mucho mayor.^{10-12,14}

Existen factores que deben tenerse en cuenta en la construcción de una CCM: arquitectura, materiales empleados, parámetros fisicoquímicos a medir, donador de electrones y tipo de inóculo microbiano. Dichos factores a su vez, también afectan otros procesos como son la eficiencia en la transferencia de protones, y desempeño de ánodo en las CCM. El tipo y concentración de amortiguadores químicos empleados en una CCM, perturban principalmente la eficiencia en la transferencia de protones y por lo tanto afectan la comunidad microbiana anódica.⁶⁹ Entre los estudios que han investigado sistemáticamente los efectos del inóculo microbiano en el arranque y el desempeño de las CCM, se encuentran el trabajo de Kim *et al.* (2005) y Vázquez-Larios *et al.* (2011). Kim *et al.* (2005) compararon desempeños de CCM inoculadas con lodo anaeróbico sin tratamiento, una comunidad enriquecida con hierro férrico, y un inóculo previamente aclimatado en otra CCM. La inoculada con la muestra del consorcio previamente aclimatado tuvo un mejor desempeño, mientras que la del inóculo enriquecido con hierro férrico presentó un efecto negativo. Así, concluyen que el arranque es más exitoso cuando se inocula la CCM con una muestra colectada de otra CCM en funcionamiento. Vázquez-Larios *et al.* (2011) evalúan la disminución de la resistencia interna aplicando diferentes inóculos y cambiando la configuración de la CCM. Sus resultados corroboran el efecto del tipo de inóculo y la arquitectura, concluyendo que la CCM de una sola cámara ensamblada con un arreglo en forma de “sándwich” ánodo-PEM-cátodo, en conjunto con los inóculos de bacterias sulfato reductoras y aeróbicas, presentan una resistencia menor (1,200 y 100,00 Ω respectivamente) en comparación con la CCM de una cámara con el arreglo convencional de electrodos separados a la PEM, que presento una resistencia de 3,900 Ω con el inóculo de bacterias sulfato reductoras, y 130,000 con bacterias aeróbicas.

Un resumen sobre la variación de géneros microbianos identificados, respecto al origen de inóculo, alimentación y arquitectura de la CCM puede verse en la tabla 1. El

porcentaje de abundancia de cada uno de los microorganismos identificados en dichos sistemas presenta una gran variación, en el caso de CCM de dos cámaras existe una predominancia de β -Proteobacteria en la diversidad filogenética anódica como se puede observar en el caso de Kim *et al.* (2004), Phung *et al.* (2004) y Kim *et al.* (2007). Sin embargo al cambiar de arquitectura (CCM de sedimentos) y el tipo de inóculo (sedimentos marinos), se presenta una dominancia de δ -Proteobacteria como se observa en el caso de Holmes *et al.* (2004), observándose una tendencia hacia la predominancia del mismo grupo cuando se emplea un inóculo similar (plancton marino), a pesar de emplear una arquitectura diferente (CCM de dos cámaras), en el caso de Reimers *et al.* (2007). Referente a inóculos anaeróbicos alimentados por glucosa o acetato en CCM de dos cámaras, se observa una predominancia del grupo Firmicutes.^{7, 71}

Tabla 1. Comunidades bacterianas en diferentes CCM operadas con diferentes inóculos y sustratos.

Sustrato	Inóculos ^a y configuración de CCM ^b	Proteobacteria (%)				Firmicutes (%)	Ref.
		α -	β -	γ -	δ -		
Glucosa /glutamato	SR DC	64.4	21.1	3.3	0.0	0.0	11
Glucosa/glutamato	LA DC	1.4	6.8	36.5	14.9	27.0	71
Almidón	DA DC	27.2	40.9	0.0	0.0	4.5	12
Agua de río	SR DC	10.8	46.2	12.9	12.9	0.0	11
Acetato	DA DC	0.0	0.0	0.0	0.0	24.1	7
Sedimento de agua dulce	SAD S	0.0	7.0	9.7	53.5	3.0	17
Sedimento de agua dulce	SAD S	0.0	7.0	9.7	53.5	3.0	17
Sedimento de agua salina	SAS S	7.1	0.0	8.75	65.2	3.0	17
Sedimento marino	SM DC	7.5	0.0	2.35	70.0	11.6	17
Etanol	DA DC	0.0	82.6	0.0	17.4	0.0	5
Agua marina	PM DC	0.0	0.0	1.0	25.0	0.0	35

^aSR: sedimento de río; LA: lodo anaerobio; DA: efluente de digester anaerobio, SM: sedimento marino; SAD: sedimento de agua dulce; SAS: sedimento de agua salina; PM: plancton marino. ^bDC: dos cámaras; S: de sedimentos.

En general las densidades de corriente elevadas en las CCM, se presentan cuando se emplean cultivos mixtos (provenientes de sedimentos marinos, aguas residuales y lodos activos), en vez de cultivos puros, como se ve en la tabla 2.⁷²

Tabla 2. Desempeño de CCM con inóculos bacterianos puros y mixtos.

<i>Cultivo</i>	I (mA)	P (mW/m ²)	P (mW/m ³)	Ref.
<i>Cultivos puros</i>				
<i>Proteus vulgaris</i>	0.8	4.5	18	73
<i>Erwinia dissolvens</i>	0.7	0.3	n.r.	74
<i>Proteus vulgaris</i>	0.7	85	9	75
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0.1	0.00	0.1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.10	88	8.8	76
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	0.4	13	0.4	77
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	0.2	8	0.3	78 ^a
	0.6	17	1.7	78 ^b
	0.5	33	0.9	78 ^c
<i>Escherichia coli</i>	3.3	1.2	7.6	79 ^b
	2.6	91	3.6	79 ^a
<i>Cultivos Mixtos</i>				
<i>De agua salada (sedimentos marinos)</i>	0.2	10	n.r.	15
	60	32	n.r.	16
<i>De lodos activos</i>	30	3600	216	59
	0.2	8	1.6	12
	11	5.3	34	79 ^b
	2.6	788	32	79 ^a
<i>Aguas residuales</i>	4.9	26	1.6	27
	6.2	23	47	34 ^d
	5.0	18	37	34 ^e
	1.3	506	13	57 ^f
	0.5	305	7.6	57 ^g

^aElectrodo de grafito sólido, ^bElectrodo de fibras de grafito, ^cElectrodo poroso de grafito, ^dAlimentado con sacarosa, ^eAlimentado con glucosa, ^fAlimentado con acetato, ^gAlimentado con butirato. n.r. No reportado.

1.5. Interacciones en comunidades bacterianas.

Los consorcios y mecanismos cooperativos son necesarios, para la conversión efectiva de la materia orgánica a electricidad, desde este punto de vista los cultivos mixtos son más favorables en comparación con los puros, ya que poseen una especificidad y

generación de potencia más alta al poder oxidar sustratos más complejos, por medio de interacciones sinérgicas y diferentes tipos mecanismos de transferencia de electrones.⁴⁹ Se han encontrado pruebas de la relación entre células bacterianas mediante nanocables electroquímicamente activos, ejemplo de ello son las simbiosis entre bacterias fermentativas y metanogénicas. Es ampliamente conocido que la cercana proximidad física es ventajosa para ambos microorganismos, ya que les facilita el intercambio de hidrógeno y permite la transferencia de electrones entre las especies y el electrodo.⁸⁰ Un análisis morfológico más detallado del filamento generado por *P. thermopropionicum*, muestra una alta semejanza con el nanocable generado por *S. oneidensis* MR-1.⁸⁰ Las mediciones de microscopía de escaneo por tunelamiento, comprobaron que los filamentos de la cepa MR-1 son conductivos y pueden ser considerados como nanocables⁸³ (figura 2 a) al igual que los finos filamentos producidos por *Geobacter sulfurreducens*.⁸⁴ Análisis sobre micrografías de biopelículas formadas en electrodos, por *Shewanella*, muestran que algunos de estos nanocables no sólo se encuentran enlazando a la célula con el electrodo, sino que también interconectan a células entre sí (figura 2 b). Estas observaciones, plantean la posibilidad de que los nanocables, jueguen un papel importante dentro de la transferencia de electrones entre las células, y el desarrollo de la comunidad bacteriana.⁸⁰ Co-cultivos estudiados por Ishii *et al.* (2008) muestran la presencia de flagelos filamentosos entre *Pelotomaculum thermopropionicum* (fermentadora de propionato) y *Methanothermobacter thermautotrophicus* (metanogénica, figura 2 c).



Figura 2. (a) Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la cepa *Shewanella oneidensis* MR-1, se muestra la presencia de nanocables que la interconectan con otras cepas bacterianas (b) Ánodo de una CCM colonizada por *S. oneidensis* MR-1. (c) Imagen de una SEM de *Pelotomaculum thermopropionicum* y *Methanothermobacter thermautotrophicus* (señalada con una flecha) en co-cultivos metanogénicos, interconectadas por nanocables.⁸⁰

Existen otro tipo de interacciones mediante metabolitos secundarios, Pham *et al.* (2008) lograron observarla entre *Pseudomonas spp.* y bacterias Gram-positivas (*Brevibacilli sp.*) en una CCM tipo PEM alimentada por acetato. Las Gram-positivas emplearon los metabolitos secundarios generados por *Pseudomonas spp.* (fenazina-1-carboxamida), notándose un incremento en la densidad de potencia de la CCM. Sin embargo Pham *et al.* (2008), remarcan la importancia de realizar diferentes estudios que analicen otro tipo de interacciones en las comunidades bacterianas establecidas en las CCM, tales como la percepción de quórum (quórum-sensing por sus siglas en inglés) u otros tipos de mediadores.

Se han llevado a cabo estudios, que permiten una mejor comprensión sobre las interacciones generadas entre microorganismos exoelectrógenos y fermentadores.^{6,86} Estas se generan, debido a la competencia entre microorganismos por la disponibilidad del sustrato. Así en el caso de sustratos como la glucosa, se ha observado que los microorganismos fermentadores son quienes ganan dicha competencia, consumiendo entre el 60 y 90% de los carbohidratos.⁸⁶ La alta competitividad de los microorganismos fermentadores por el aprovechamiento del sustrato, no implica una disminución en cuanto al desempeño de la CCM, si se considera que las interacciones entre estos y los exoelectrógenos, permite el aprovechamiento de los productos fermentativos (ej. propionato, butirato, lactato, etanol y formato) que son fácilmente oxidados por parte de exoelectrógenos.^{5,57,79,87-88}

1.6 Influencia del pH

Las aguas residuales domésticas por lo general poseen una alcalinidad de 50 a 200 mg/l (CaCO₃), lo cual equivale a un amortiguador de fosfato de 1 - 4 mM.²⁶ Dicha alcalinidad puede limitar el desempeño del bioánodo y, en consecuencia, de la CCM.²⁶ Una solución a esta limitante es la elaboración de un diseño de CCM que permita la recirculación del efluente del ánodo al cátodo, así los protones acumulados en el electrolito del ánodo (por la baja transferencia de los mismos a través de la membrana, en el caso de las PEM), pueden ser aprovechados directamente en el cátodo, al mismo tiempo que aumenta la generación de densidad de potencia de 811 a 1540 mW/m².⁴¹ Otra alternativa

para la disminución de la alcalinidad, es la adición de amortiguadores sintéticos a la CCM, como lo plantea Torres *et al.* (2008) quienes analizan la densidad de corrientes generada en función del cambio en la concentración de los mismos. Cuando incrementaron la concentración del amortiguador fosfatos de 12.5 a 100 mM, la densidad de corriente aumentó más de cuatro veces, llegando a generar hasta 10 A/m^2 . No atribuyeron dicho efecto al incremento de la conductividad por la adición del amortiguador, ya que al adicionar cantidades similares de cloruro de sodio, la densidad de corriente solo aumentó en un 15%. Sin embargo, lo atribuyen al incremento del transporte de los cationes a través de la PEM por el aumento de la concentración del buffer, puesto que se requiere de mayor flujo de cationes para mantener tanto la densidad de corriente como el balance del pH. Fan *et al.* (2007) evaluaron el uso de bicarbonato (0.2 M) a diferentes pHs, para mejorar la generación de potencia, siendo mejor en el ánodo el pH de 9, ya que disminuyó la resistencia interna de 4 a 3.8Ω , generando un densidad de potencia de 1550 W/m^3 (2770 W/m^2). Borole *et al.* (2009) mejoraron la densidad de potencia en una CCM de 56 W/m^3 hasta 203 W/m^3 , al implementar un amortiguador 200 mM de fosfatos y 50 mM ferricianuro en el cátodo; también notaron un incremento de 101 W/m^3 al aumentar la concentración del ferricianuro a 200 mM.

Otro factor que influye en las densidades de corriente en la CCM es la variación de pH a lo largo del espesor de la biopelícula establecida en el electrodo, los estratos más cercanos a la superficie del electrodo cuentan con pHs menores a aquellas zonas más cercanas al anolito. Lo anterior es comprobado en los estudios realizados por Franks *et al.* (2009) quienes encontraron que la superficie anódica presentaba un pH de 6.1, mientras que el pH de la zona de la biopelícula en contacto con el medio fue de 7; dicha diferencia es justificada en función a la acumulación cationica dentro de la biopelícula.

Se han realizado estudios sobre los pHs óptimos para una mayor densidad de potencia, observándose una tendencia hacia pHs más ácidos en el cátodo. Zhuang *et al.* (2010) lograron un buen desempeño en una CCM con un pH de 10 en el ánodo y un pH de 2 en el cátodo, aplicando 0.2 M de NaOH y HCl. Bajo estas condiciones, alcanzaron un potencial a circuito abierto de 1.04 V y una densidad de potencia máxima de 29.9 W/m^3 , valores por

arriba de lo reportado en el caso de CCM alimentadas con aguas residuales de cervecerías, que se encuentran entre 0.58-0.65 V y 5.1-12.0 W/m².³⁹³⁻³⁹⁵ Después de emplear diferentes potenciales de hidrógeno de 7:2, 10:2 y 7:7 (relación de ánodo:cátodo), Zhuang *et al.* (2010) determinaron que la disminución en la generación de potencia de la CCM, es debida al decremento del pH en el ánodo y a su incremento en el cátodo. Atribuyen dichos resultados al aumento del pH del anolito, generando un potencial más negativo como se ve en la figura 3, de igual forma su disminución en el cátodo, generó un potencial positivo más elevado a comparación de los demás casos. Deducen que el incremento en los potenciales les permitió alcanzar un mayor voltaje y reducir pérdidas óhmicas, por transferencia de masa y disminución del sobrepotencial. También observaron que la al implementar un pH anódico alcalino, se favoreció el crecimiento de microorganismos exoelectrógenos, en lugar de los metanogénicos.

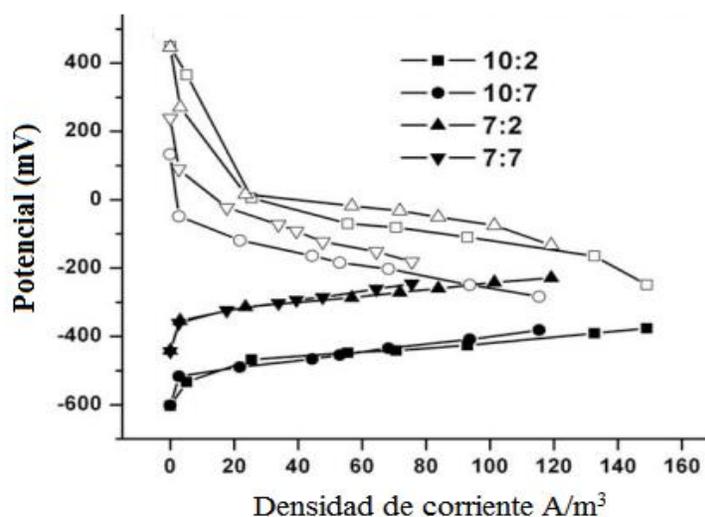


Figura 3. Potenciales de los electrodos (vs. Calomel saturado [SCE]), en función de la densidad de corriente obtenida de las cuatro CCM a diferentes pHs (ánodo: cátodo). ●, ■, ▲: datos del ánodo. ○, □, Δ: datos del cátodo.⁹²

Otros estudios han observado que valores de pH mayores a 10, suprimen por completo la actividad de microorganismos metanogénicos, inhibiendo la generación de metano y mejorando la generación de ácidos grasos de cadenas cortas, esto resulta altamente favorable debido al incremento de sustratos fácilmente oxidables por los microorganismos exoelectrógenos.⁹⁶⁻⁹⁷

1.7 Parámetros de evaluación del desempeño de una CCM

De acuerdo a Watanabe (2008), los parámetros de evaluación más importantes para determinar la eficiencia o desempeño de una CCM son: demanda química de oxígeno (DQO), densidad de potencia (DP), densidad de corriente (DC), potencial a circuito abierto (PCA), resistencia interna (R_{int}) y eficiencia coulombica (EC), entre otros.

1.7.1 Demanda química de oxígeno

Índice empleado para medir la remoción de materia orgánica contenida en el anolito, donde la carga orgánica es expresada como DQO en kg, que ingresa a la CCM es normalizada respecto al volumen neto del ánodo (m^3) en un tiempo determinado, generalmente en días.²⁴ También se puede expresar en función del porcentaje de remoción de carga orgánica, obtenida por la diferencia de la carga orgánica presente en el influente, en comparación con el efluente de la CCM.³⁹

1.7.2 Densidad de potencia (P_{An})

El cálculo de la potencia no proporciona información de la eficiencia del proceso, en función del área del electrodo empleado en el sistema. Debido a que dicha área afecta de manera directa la cantidad de potencia generada, la generación de potencia se normaliza respecto al área superficial del ánodo (A_{An}), a esto se le denomina densidad de potencia, y es calculada mediante la siguiente ecuación.⁴⁰

$$P_{An} = \frac{E_{CCM}^2}{A_{An} \cdot R_{ext}} \quad (4)$$

Donde; A_{An} : área del ánodo; R_{ext} : Resistencia externa; E_{CCM} : potencial a circuito abierto de la CCM.

1.7.3 Densidad de corriente (i)

Su cálculo permite la determinación de la cantidad de carga eléctrica que atraviesa la sección de un conductor. La densidad de corriente (A/m^2) generada en una CCM depende de varios factores entre los que se encuentran la concentración de las especies electroquímicamente activas en la superficie del ánodo, el sobrepotencial de activación del

mismo, los coeficientes de reacción y el número de electrones/protones involucrados.⁴¹ Sin embargo, para fines prácticos, generalmente se estima considerando la densidad de potencia máxima generada por el sistema (P_{\max}), resistencia interna (R_{int}) y el área superficial del ánodo (A_{An}), mediante la siguiente ecuación.²⁴

$$i_{\text{An}} = \frac{(P_{\max} \cdot R_{\text{int}})^{\frac{1}{2}}}{A_{\text{An}}} \quad (5)$$

1.7.4 Eficiencia coulombica.

Se denomina eficiencia coulombica (EC), a la fracción (o porcentaje) de electrones recuperados en la corriente generada, contra los contenidos teóricamente en la materia orgánica o sustrato, y es calculada de acuerdo a la siguiente ecuación.²⁴

$$E_C = \frac{\text{Coulombs recuperados}}{\text{Total de coulombs en el sustrato}} \quad (6)$$

Si se integra la corriente generada en el tiempo ($\int_0^{t_b} I dt$), se obtienen los coulombs transferidos en el sistema. Así, la EC puede ser calculada, para un sistema en Semi-batch, con base a la siguiente ecuación.^{21,43}

$$C_E = \frac{M_s \int_0^{t_b} I dt}{F b V_{\text{An}} \Delta DQO} \quad (7)$$

Donde; M_s es el peso molecular del sustrato, ΔDQO es el cambio en la concentración del sustrato en el ciclo batch en el tiempo (t_b). F la constante de Faraday, b es el número de moles de electrones producidos por mol de sustrato y V_{An} el volumen de operación del ánodo. Usualmente se asume que la ΔDQO va de una concentración inicial (c_0), hasta el agotamiento del sustrato empleado (ej. Acetato) ($\Delta DQO = c_0 - c = c_0 - 0 = c_0$).²¹

1.7.5 Curvas de polarización.

Las curvas de polarización permiten caracterizar la corriente en función del voltaje, obtenidos por el empleo de diferentes resistencias externas en una CCM. La máxima

potencia generada puede ser estimada en función al punto máximo de la curva de polarización obtenida del sistema.²¹

Para su elaboración se considera el establecer mediciones de descarga a potenciales constantes, considerando los siguientes puntos:

- Las especies microbianas electroquímicamente activas pueden cambiar su actividad metabólica rápidamente, o bien inhibirse dependiendo del potencial presente, ejemplo de ello es el comportamiento de la enzima hidrogenasa que se desactiva a potenciales negativos de -200mV.⁴⁸

- Los datos obtenidos a partir de la aplicación de potenciales y corrientes constantes, son de gran utilidad cuando se evalúan CCM como generadores de energía para sistemas prácticos,⁴⁴ mientras que los factores que afectan la operación estable de una CCM, son mucho más complicados que los implicados en sistemas electroquímicos tradicionales.⁴⁴

- La naturaleza de las comunidades microbianas en la CCM evolucionan con el tiempo y en función del potencial del electrodo, con constantes cambios en la biopelícula.⁴⁴ Las concentraciones de los metabolitos electroquímicamente activos y/o el sustrato pueden, también, estar en constante cambio en función del tiempo y del potencial.⁴⁴

- Los mecanismos de reacción en el electrodo y las condiciones operacionales, pueden ser diferentes para cada tipo de CCM, requiriendo diferentes puntos de extracción de muestra, que permitan hacer un análisis significativo. Sin embargo, las CCMs pueden presentar un comportamiento estable para determinaciones electroquímicas que impliquen los factores voltaje y corriente en función del tiempo, si se emplea una resistencia fija en el sistema.⁴⁴

En el caso de CCM una curva de polarización teórica, incluye tres regiones características ubicadas a diferentes intervalos de corriente, como se observa en la figura 4.⁴⁵ La zona de transferencia de carga, se localiza en un intervalo de baja corriente y deriva de la irreversibilidad de las reacciones que se llevan a cabo en la superficie de los electrodos. El sobrepotencial de la transferencia de carga depende de la naturaleza de los materiales que conforman al electrodo, de la catálisis de las reacciones llevadas a cabo en la

CCM, las actividades de los reactantes, el electrolito, mediadores electroquímicos, la biopelícula, la microestructura del electrodo, las especies microbianas y su metabolismo, y las condiciones de operación del sistema.⁴⁴ Las pérdidas de voltaje generadas en esta zona, se le denominan pérdidas de activación. Estas se presentan principalmente a bajas densidades de corriente, y pueden ser reducidas mejorando los catalizadores en el cátodo, empleando inóculos altamente electroactivos, o mejorando la transferencia de electrones entre las bacterias y el electrodo.²¹

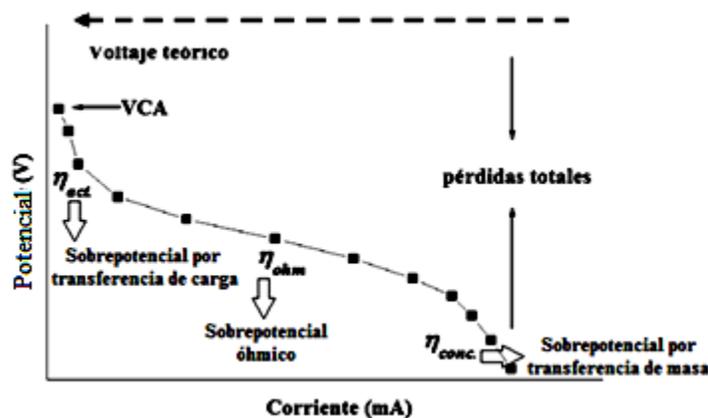


Figura 4. Curva de polarización ideal para una CCM.⁴⁴

El sobrepotencial óhmico se presenta típicamente en intervalos intermedios de corriente dentro de la curva de polarización, y es ocasionado por las resistencias iónicas en el electrolito, la membrana y la biopelícula, además de las resistencias eléctricas en los electrodos, colectores de corriente, interconexiones, y componentes electrónicos entre el instrumento de medición y la CCM.⁴⁴ Estas pérdidas también son denominadas pérdidas óhmicas, y pueden ser disminuidas por medio de la reducción en el espaciamiento entre los electrodos, empleando membrana o recubrimientos en los electrodos con bajas resistencias, asegurando buenos contactos entre el circuito eléctrico externo y los electrodos, e incrementando la conductividad y el efecto tampón de los electrolitos.²¹

La última zona, denominada zona de sobrepotencial de transferencia de masa, resulta de los cambios en las concentraciones de los reactantes o productos en la interface creada entre la superficie del electrodo y el electrolito. Este sobrepotencial se presenta a intervalos de densidades de corriente altas, cuando los reactantes no llegan a ser suministrados a las zonas reactivas del electrodo en la tasa requerida para sostener una

generación de corriente. La presencia de elevadas concentraciones de los productos, puede conllevar a una reducción en el transporte de los reactantes. La transferencia de masa derivada de los sobrepotenciales, se ve afectada por la estructura de los electrodos y la biopelícula, la naturaleza del electrolito, los metabolitos y los productos presentes.⁴⁴ A su vez las pérdidas por transferencia de masa, reduce la transferencia de protones al cátodo, lo cual disminuye la generación de potencia máxima y se ve reflejado en el aumento del pH en el cátodo.⁴⁹

Las curvas de polarización se han empleado en la determinación de corrientes de intercambio en el ánodo, al igual que en el análisis del comportamiento del ánodo y el cátodo a lo largo de varios intervalos de potenciales aplicados en el estudio de CCM. Reimers *et al.* (2006) emplearon las curvas de polarización, para determinar el voltaje en que algunos procesos anódicos se ven limitados y el potencial anódico en que se obtienen niveles altos de generación de potencia durante un mayor lapso de tiempo. Cuando la celda alcanzó voltajes mayores a 0.4 V a los 24 días de experimentación, algunos procesos en el ánodo se ven limitados, como se observa en la figura 5 A. Así mismo, encontraron que cuando se presenta una diferencia de potencial de 0.4 V, se obtuvo la generación máxima de potencia, en un lapso de 24 hrs durante la experimentación, con un promedio de 34 mW/m² (figura 5 B).

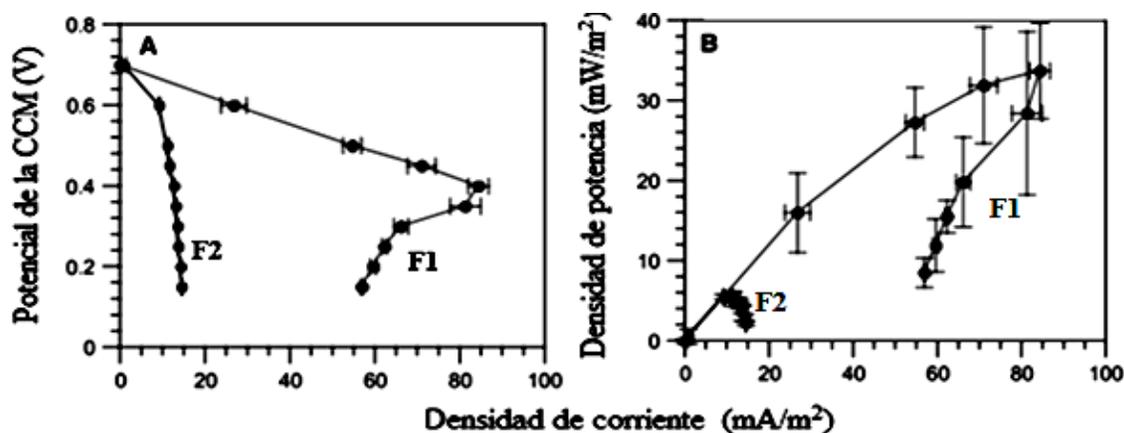


Figura 5. Efectos de polarización. (A) densidades de corriente generadas por el potencial de la celda. (B) densidades de potencia vs densidad de corriente. Los datos fueron tomados cada hora durante un intervalo de 12-24 hrs, de los días 20 al 30 de experimentación. F1: fase 1 (20-31 días), F2: fase 2 (103-114 días).⁵⁰

1.7.6 Espectroscopia de impedancia electroquímica.

Según Yuan *et al.* (2010) las reacciones electroquímicas consisten en la transferencia de electrones en la superficie de un electrodo. Estas reacciones involucran, principalmente, resistencia del electrolito, adsorción de especies electroactivas, transferencia de carga en la superficie del electrodo, y transferencia de masa de la solución a la superficie del electrodo. Cada proceso puede ser considerado como un componente eléctrico o un circuito eléctrico simple. El proceso completo de las reacciones anteriormente mencionadas, puede ser representado mediante un circuito eléctrico compuesto por resistencias, capacitores, o elementos de fase constante, combinados en paralelo o en serie. El circuito equivalente de Randles-Ershler es el comúnmente empleado para una reacción electroquímica simple, e incluye la resistencia generada por el electrolito, resistencia por procesos de transferencia de carga en la interfase del electrodo-electrolito, una capacitancia de doble capa, y una resistencia por transferencia de masa. La impedancia de corriente alterna, es una técnica efectiva para analizar cada uno de los componentes encontrados dentro de dichos circuitos equivalentes. La utilización de dicha técnica en sistemas electroquímicos, puede proveer información detallada sobre las reacciones electroquímicas presentes dentro del sistema. En esta, se aplica una perturbación de baja amplitud de corriente alterna (CA), agregada a una señal de corriente de constante directa (CD), mediante un cambio de frecuencia. Al escanear la frecuencia, el cambio en la impedancia puede ser registrado y se calcula cada uno de los componentes dentro del circuito eléctrico planteado. De igual forma, se puede llegar a calcular la resistencia interna de un sistema electroquímico, siendo esta por definición aquella que se compone por la resistencia de la constante eléctrica en todos los componentes de la celda de combustible, y la resistencia de la membrana en el caso de celdas de combustible tipo PEM.^{44,191}

Existen dos representaciones gráficas comúnmente empleadas por dicha técnica:

- Diagrama de Nyquist. Es la representación gráfica que emplea el espectro de impedancia de la parte real (Z_{re}) en el eje de las ordenadas, que corta con las ordenadas donde se encuentra la parte imaginaria (Z_{im}). Cada punto o dato, es la representación del vector de impedancia dentro de un plano complejo a una frecuencia en particular. Un

ejemplo de dicha representación de puede ver en la figura 6, obtenida de la experimentación realizada por Logan *et al.* (2007) con intervalo de frecuencia de 10^5 a 0.005 Hz, con una amplitud de 10 mV, para el análisis de espectroscopia de impedancia electroquímica para un electrodo de tela de carbón y un electrodo de fibra de grafito.⁴⁴

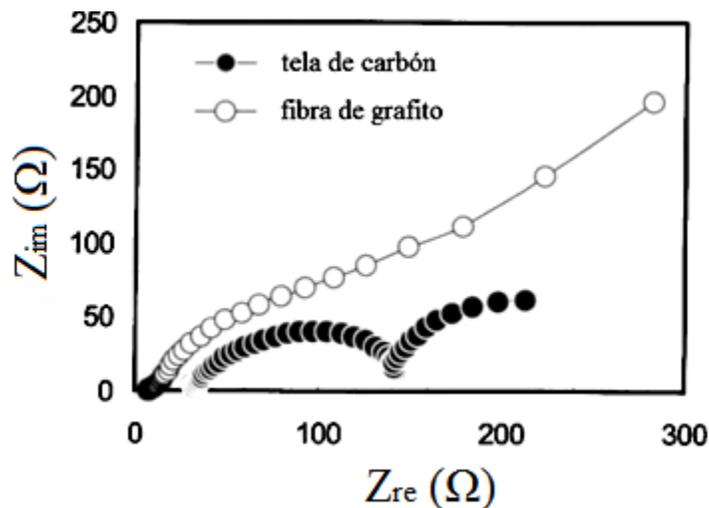


Figura 6. Representación de Nyquist obtenida de los espectros de impedancia de dos CCM con electrodos de tela de carbón y fibra de grafito.³³

- Diagrama de Bode. Este muestra la frecuencia como puntos en función de su magnitud y el ángulo de fase de la impedancia del vector vs la frecuencia, como se observa en la figura 8.⁴⁴

Usualmente se emplean señales de perturbación de corrientes alternas a bajas amplitudes (10 mV), estas pequeñas perturbaciones se aplican para asegurar la no intervención de efectos no-lineales sobre la adquisición de datos y prevenir el daño(deterioro) de la biopelícula adherida a la superficie del electrodo. Se puede obtener información detallada de las resistencias óhmicas, de carga y de transferencia de masa, a partir del análisis del espectro generado.⁴⁴

La técnica de impedancia puede calcular de manera precisa los valores de la resistencia interna dentro de la CCM, y la contribución de cada uno de sus componentes. Un ejemplo de su aplicación, se puede ver en los estudios realizados por Manohar *et al.* (2008)⁵¹, quienes calcularon la resistencia interna de una CCM bajo cuatro condiciones diferentes (figura 7), los resultados mostraron que la resistencia interna fue mucho mayor

en ausencia de bacterias, comparado con su presencia en el anolito. La adición de esferas de acero inoxidable en el compartimiento anódico, redujo la resistencia interna e incrementó el voltaje generado (figura 7), debido al aumento del área de superficie anódica. Bajo todas las condiciones la resistencia interna disminuyó junto con el voltaje de la celda, incrementando la corriente.

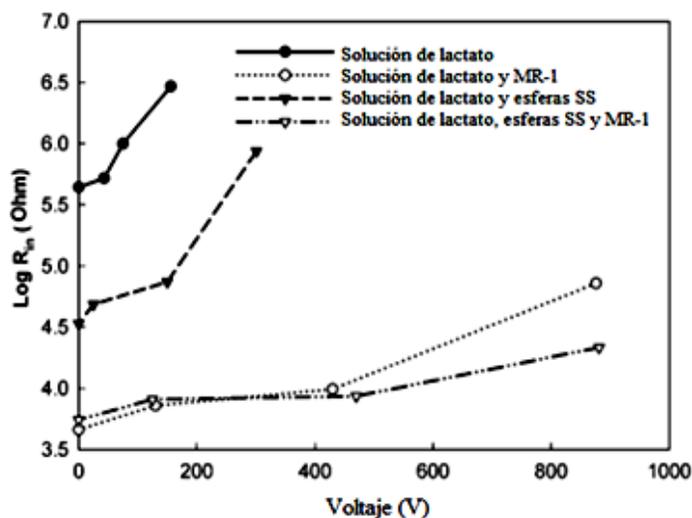


Figura 7. Dependencia de la R_{int} respecto al voltaje de la celda, bajo cuatro condiciones diferentes. MR-1: cepa modificada de *Shewanella oneidensis*; esferas SS: acero inoxidable.⁵¹

Los materiales del electrodo o las capas pulidas, pueden causar variaciones en la resistencia de polarización, la cual por definición según Yuan *et al.* (2010) es la combinación de la resistencia generada por los procesos de transferencia de carga y de difusión o transferencia de masa. La impedancia de diferentes materiales en los electrodos probados dentro de las CCMs, muestra que los electrodos de tela de carbón (en comparación con electrodos metálicos), presentan una resistencia de polarización mucho menor, y por ende presentan una mayor generación de potencia, reduciendo las pérdidas en la interface del electrodo y la solución.⁵² Sin embargo, se ha observado el incremento del desempeño de electrodos metálicos, por medio de recubrimientos abióticos (titanio, iridio, etc.).⁵³ Dicho efecto fue estudiado por Manohar *et al.* (2008), quienes utilizaron electrodos recubiertos de platino y por de *Shewanella oneidensis* MR-1, alimentada con lactato. En la 8 (a) la región de baja frecuencia del espectro, muestra que la resistencia de polarización del cátodo de fibra de carbón recubierto por platino, la cual es mucho menor que la del

ánodo a base de platino sin *Shewanella* como recubrimiento. Esto les indicó que la velocidad o tasa de reducción del oxígeno es mayor en el cátodo, que la tasa oxidativa del lactato en el ánodo. La resistencia de polarización en el ánodo decae de 7.79 M Ω a 10.2 K Ω y el ángulo de fase alcanzó valores cercanos a 0° en la frecuencia más baja, en el caso del ánodo recubierto con la biopelícula de *Shewanella oneidensis* (figura 8). Por esto concluyen que la biopelícula formada en la superficie anódica y la metabolización del lactato, reduce la resistencia de polarización anódica.

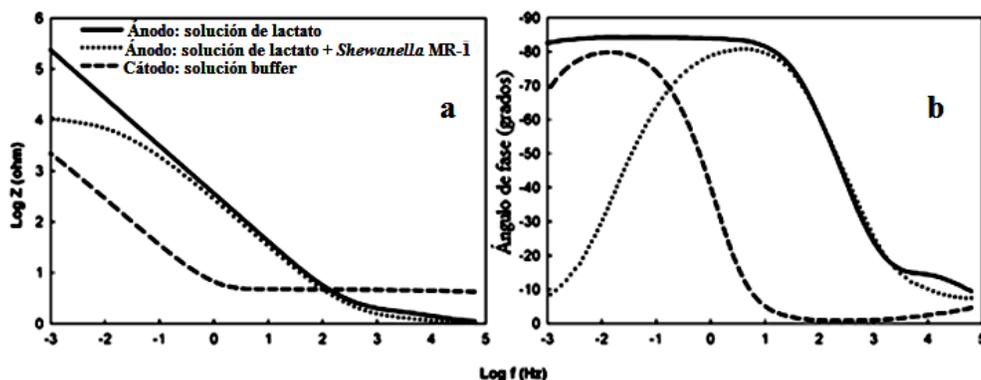


Figura 8. Impedancia del ánodo en ausencia o presencia de *S. oneidensis* MR-1, y del cátodo con platino: (a) módulo de impedancia (b) fase de ángulo.⁵⁴

He *et al.* (2008), emplearon dicha técnica para analizar la resistencia generada en los electrodos, a diferentes potenciales de hidrógeno en el electrolito, encontrando que el valor de pH del electrolito afecta tanto las reacciones catódicas como las anódicas. Al parecer, la resistencia de polarización anódica disminuye con el incremento del pH del electrolito de 5 a 10, como se aprecia en la figura 9. Finalmente concluyen que la actividad bacteriana anódica, fue óptima a un pH neutro y la reacción electroquímica en electrodo del cátodo, fue mejorada a pHs más altos.

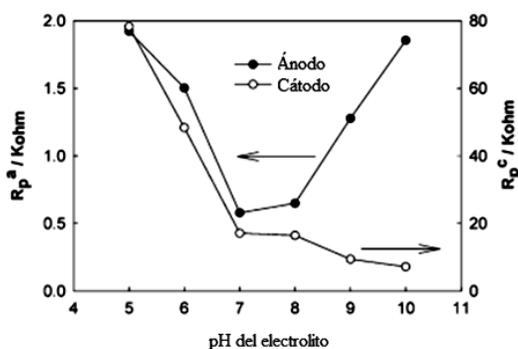


Figura 9. Resistencias de polarización del ánodo y cátodos, en función del pH del electrolito. R_p^a: resistencia de polarización den ánodo. R_p^c: resistencia de polarización del cátodo.⁵⁵

1.7.7 Voltamperometría cíclica (VC)

Según Compton y Banks (2011) esta es una técnica electroquímica que aplica diferentes potenciales a un electrodo de trabajo, dentro de un intervalo previamente establecido. A su vez se toman las respuestas de la corriente de respuesta generadas por la aplicación de dicho potencial, dentro de un diagrama conteniendo información referente a dicha corriente vs el potencial aplicado. Por lo general se recomienda aplicar el potencial de circuito abierto inicial del objeto de estudio, para que las especies químicas analizadas no se oxiden o reduzcan, inicialmente. Una vez terminado de aplicarse los potenciales de barrido establecidos dentro del rango seleccionado, se aplican nuevamente de manera inversa, es decir se repite dicho proceso aplicándose un potencial de barrido inverso respecto al potencial inicial, obteniendo así las corrientes generadas tanto en los procesos de oxidación como de reducción registrados a los diferentes potenciales aplicados.²¹⁶

Su utilidad se basa en la determinación de las reacciones de oxidación o reducción llevadas a cabo en los electrodos. Los estudios de CCM que emplean la VC, generalmente emplean velocidades de barrido de 1-100 mV/s.⁴⁴⁻⁴⁶ Esta técnica se ha empleado principalmente para:

- Investigación de mecanismos de reacción en los electrodos, que impliquen transferencia directa o indirecta de electrones entre la biopelícula y el electrodo.⁴⁴
- Determinación de potenciales redox de las especies químicas o biológicas, presentes en el ánodo o en el cátodo.⁴⁴
- Evaluación del desempeño de los catalizadores estudiados.⁴⁴
- Medición de la diferencia de potencial entre la interface y las reacciones redox de las especies presentes en el electrolito y ligadas a los microorganismos dentro del sistema.⁴⁴
- Evolución de la actividad bioelectroquímica de la biopelícula en el tiempo.⁴⁶

Algunos estudios han empleado la VC para la caracterización electroquímica directa de biopelículas en el ánodo de las CCM, determinando el comportamiento catalítico del sistema. Marsilii *et al.* (2008), aplicaron dicha técnica como un método para comprobar la presencia de mecanismos de transferencia de electrones entre la biopelícula y el electrodo

de carbón vítreo, con un intervalo de potencial de -0.55-0.24 V (vs SHE), con una velocidad de barrido de 1mV/s. En la figura 10, se puede observar como la tasa de transferencia de electrones se incrementó rápidamente a un potencial mayor a -0.3 V, alcanzando una corriente limitante por encima de un potencial de -0.1 V.

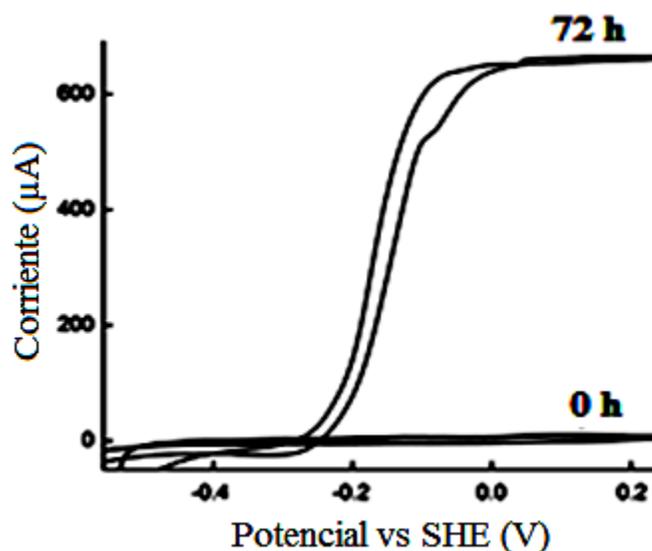


Figura 10. Voltametrías cíclica de la biopelícula formada por *G. sulfurreducens*, a las 0 hrs cuando se realizó la inoculación, y a las 72 h cuando se observó la máxima generación de corriente.⁴⁷

Marsilli *et al.* (2008) también analizaron el comportamiento de los voltamperogramas a diferentes concentraciones de sustrato. Para ello, el acetato fue removido del medio y los electrodos se incubaron a un potencial de 0.24 V por 36 hrs, donde no se presentó corriente residual anódica. En este punto, se determinó el efecto de la dilución de las concentraciones del sustrato, mediante una VC a 1mV/s. En la figura 11 se puede observar como el incremento de la concentración de acetato influyó en la corriente anódica limitante a -0.1 V; incrementando de manera lineal junto con la concentración del acetato en el medio, cuando la concentración del acetato fue <2000 µM, y sin mostrar cambio aparente a partir de una concentración de 3000 µM. El punto medio de las ondas catalíticas permaneció centrado a aproximadamente -0.15 V, para todas las concentraciones; esto sugiere que se presentaron mecanismos similares para la transferencia

de electrones, inclusive bajo la influencia de bajas densidades de corriente generada dentro de la CCM.

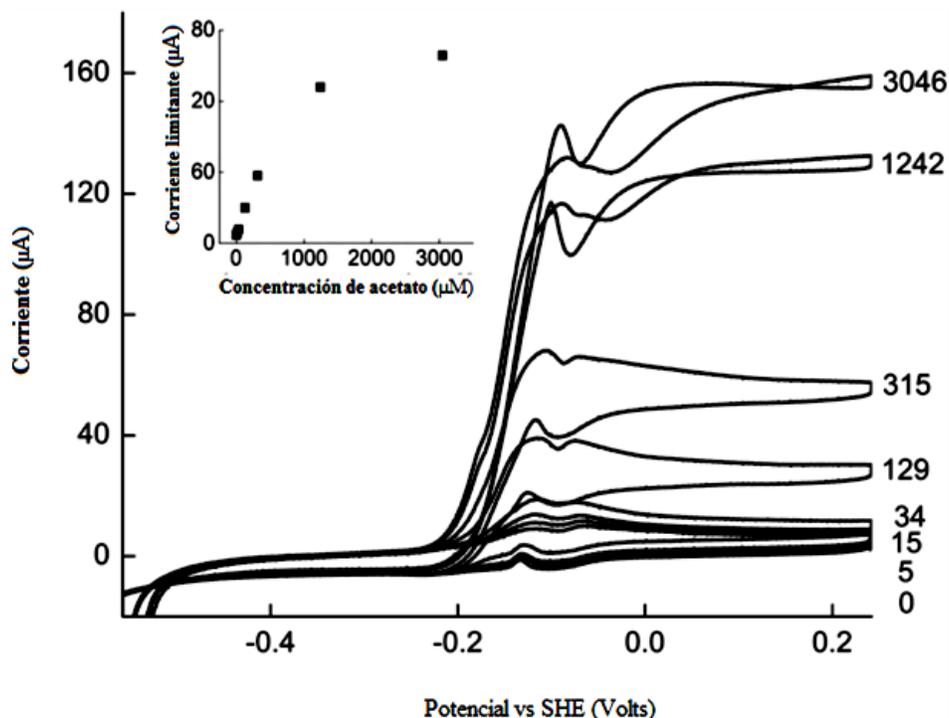


Figura 11. Voltametrías cíclicas a diferentes concentraciones de acetato en el sustrato (μM).⁴⁷

1.8 Mecanismos de transferencia de electrones

De acuerdo a Schröder (2007) se pueden distinguir dos mecanismos de transferencia empleadas por bacterias: la transferencia directa de electrones y la transferencia mediada de electrones.

1.8.1 Transferencia Directa de electrones (TDE): procede a través de proteínas redox de membrana (sin implicar especies disueltas)

El principal requisito para que un componente actúe como un transportador de electrones, es su accesibilidad estérica (contacto entre donador y aceptor de electrones). Además, el potencial del acarreador en relación con el ánodo determinará si éste fue realmente utilizado o no (un electrón no puede ser transferido hacia un electrodo más reducido).¹⁰⁰ Este mecanismo de transferencia de electrones, se lleva a cabo por medio del contacto físico de la membrana celular, citocromos o un organelo bacteriano con el ánodo de la celda, sin implicar especies redox disueltas.¹⁰¹ Durante la TDE, ocurre una reacción

oxidativa llevada a cabo por proteínas pertenecientes a la cadena respiratoria (ej. Citocromos). Algunas bacterias que emplean la TDE son: *Geobacter metallireducens*, *Aeromonas hydrophila*¹⁰¹ y *Rhodospirillum rubrum*,⁷⁸ *Geobacter sulfurreducens*⁸² y *Shewanella oneidensis*.¹⁰² En la figura 12 A, se puede observar una representación esquemática de este tipo de mecanismo.

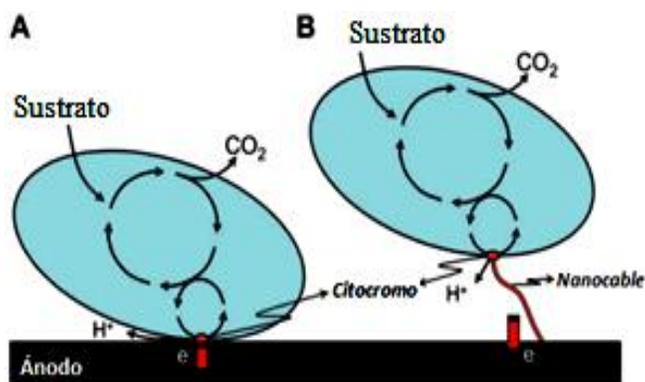


Figura 12. Ilustración de la TDE vía (A) citocromos de membrana, (B) nanocables electroconductores.³

Una de las enzimas que parece estar involucrada en la TDE, es la hidrogenasa. Muchos microorganismos fermentativos identificados en CCM poseen hidrogenasas, tales como *Clostridium butyricum*¹⁰³ y *Enterococcus faecium*.¹⁰ La TDE en presencia de dicho transportador redox, ha sido observada por McKinlay y Zeikus (2004) quienes demostraron que las hidrogenasas presentes en la superficie bacteriana, juegan un papel en la reducción del colorante rojo neutro (mediador en la transferencia de electrones).

Se ha observado además, la presencia de nanocables conductores (ver figuras 12 y 13) en algunas bacterias reductoras de metales tales como *Geobacter* y *Shewanella*. Esto representa implicaciones importantes para la reducción enzimática de la fase sólida del hierro y óxidos de manganeso, pudiendo facilitar la transferencia de electrones de la superficie bacteriana al electrodo.⁸³⁻⁸⁴ Además, su formación puede permitir el desarrollo de biopelículas electroactivas más delgadas y por ende aumentar el desempeño del ánodo. Ejemplo de ello, es lo publicado por Regeer *et al.*,⁸⁴ en presencia de la formación de nanocables de *Geobacter sulfurreducens*.

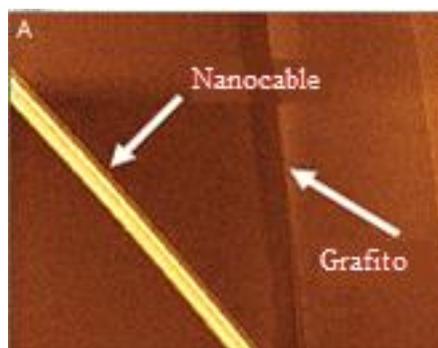


Figura 13. Microscopia de escaneo por tunelamiento, sobre nanocables aislados de una cepa silvestre MR-1, con un diámetro lateral de 100 nm. Las flechas indican la ubicación del nanocable y un desnivel en la superficie del ánodo de grafito.⁸³

Bond y Lovley (2003) empleando un potenciostato, midieron el potencial de circuito abierto de un electrodo colonizado por *Geobacter sulfurreducens* reemplazando el anolito por un medio nuevo con acetato, obteniendo un potencial redox de 0.17 V (vs SHE). Bond y Lovley (2003) atribuyen dicho potencial a la TDE, al no presentarse alteración significativa en la generación de la densidades de potencia generadas, por la sustitución de los microorganismos platónicos y las especies redox presentes en el anolito. Kim *et al.* (2002), Lee *et al.* (2003) y Park *et al.* (2001) han reportado valores sobre el potencial de cepas bacterianas (tabla 3) en función de los resultados obtenidos por voltametría cíclica.

Tabla 3. Potenciales medidos para la TDE en diferentes especies bacterianas.

Cepa bacteriana	E'/V ^a	Ref.
<i>Shewanella putrefaciens IR-1</i>	0.01	1
<i>Shewanella putrefaciens MR-1</i>	-0.02	1
<i>Shewanella putrefaciens SR-1</i>	-0.01	1
<i>Aeromonas hydrophila PA 3</i>	0	105
<i>Clostridium sp. EG 3</i>	0	103

^a Determinado como el medio pico de la voltametría cíclica, a un pH de 7.

Algunos autores atribuyen la TDE a la actividad redox de los citocromos, presentes en la membrana externa de los microorganismos.^{1,103,105} El alto grado de similaridad en los datos electroquímicos obtenidos por el grupo de Kim *et al.* (2002), Park *et al.* (2001) y

Pham *et al.* (2003), sobre diferentes cepas bacterianas demuestra que la transferencia de electrones a través de los citocromos en la membrana externa, no es específica para una bacteria en particular.³

Dado que en la TDE, los nanocables bacterianos (figura 12 B) establecen un enlace con los citocromos presentes en la membrana celular, se asume que los mismos potenciales redox estándar aplican tanto para el citocromo como para los nanocables, basándose en la transferencia de electrones. Por lo tanto, el potencial del citocromo se puede emplear para calcular la energía libre de la oxidación electroquímica (tabla 4).³

Tabla 4. Eficiencia energética teórica de la TDE.³

Especies de enlace	E'/V	$\Delta G'_{elec}$ ^b kJ/mol	$\frac{\Delta G'_{elec}}{\Delta G'_{total}}$ ^b (%)	n	$\Delta G'_{elec}$ kJ/mol	$\Delta G'_{elec}/\Delta G'_{total}$ (%)
Citocromo de membrana externa	0	-49.2	54.2	24 ^a	-1181.0 ^a	54.2

^a Aproximado máximo teórico de electrones derivables de la oxidación completa de glucosa. ^b cuando n=1. E': Potencial estándar. $\Delta G'_{elec}$: energía libre de Gibbs para un electron. $\Delta G'_{total}$: energía libre de gibbs total.

Para un electrón la energía libre ($\Delta G'_{elec}$) el valor es de $-49.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, que corresponde al 54% de la energía libre de Gibbs total ($\Delta G'_{total}$), con un valor de n= 1 para la oxidación de la glucosa.³ En algunos reportes asumen que la eficiencia coulombica de la TDE vía citocromos y nanocables puede alcanzar un 100%, es decir que todos los electrones liberados de la oxidación de un determinado sustrato, pueden ser transferidos al ánodo.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ En este caso el rendimiento total de energía eléctrica que se puede obtener de la oxidación completa de glucosa es igual al valor de un electrón, 54%.³

Son pocos los microorganismos capaces de realizar TDE y aprovechar sustratos como la glucosa, uno de ellos es *Rhodospirillum rubrum*.⁷⁸ Otros como los géneros *Geobacter* y *Shewanella* al no poder aprovechar dicho tipo de sustratos, dependen de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes, generados por bacterias fermentativas, lo cual puede llegar a afectar la eficiencia de conversión energética total.¹⁰⁷

1.8.2. Transferencia Mediada de electrones (TME)

Algunos investigadores consideran la TME como la primera y única opción, para una generación eficiente de corriente en las CCM.¹⁰⁶ Hasta ahora, el desempeño en términos de corriente y densidades de potencia de los sistemas basados únicamente en la TDE se encuentra a menudo por debajo de aquellos que involucran o se basan en la TME. Las bacterias pueden emplear componentes solubles y no solubles que transporten físicamente los electrones de un compuesto intracelular que se oxida hasta la superficie del electrodo.³

Se han probado en varios estudios el efecto de la adición de mediadores redox artificiales a las CCM tales como el rojo neutro², la tionina⁷⁵ o el metil viológeno¹⁰⁸; la cuál a menudo parece ser esencial.² No obstante los microorganismos pueden producir mediadores redox de manera natural, existiendo dos formas a saber: a través de la generación de metabolitos oxidables (metabolitos primarios) y a través de compuestos orgánicos reversiblemente reductibles (metabolitos secundarios).³

Los mecanismos de TME pueden representar un medio efectivo para conectar el metabolismo microbiano con el ánodo de la CCM. Enfoques muy diferentes se han propuesto para clasificarlos. Si consideramos la naturaleza de las especies redox mediadoras o de enlace, se pueden clasificar según Schröder (2007) como: mediadores artificiales, metabolitos primarios y secundarios.

i. Mediadores artificiales.

Se denominan mediadores artificiales a aquellos mediadores con actividad redox, adicionados a las CCM con la finalidad de incrementar las densidades de corriente y de potencia obtenidas, acelerando los procesos de transferencia de carga dentro de dichos sistemas bioelectroquímicos. Cohen (1931) encontró que, aunque algunos cultivos bacterianos anaeróbicos pueden presentar un potencial altamente negativo, la corriente que estos generan es generalmente pequeña, y es atribuida su limitada capacidad para la “oxido-reducción de los productos”. Como solución a este problema se propuso la introducción de sustancias orgánicas e inorgánicas como el ferricianuro de potasio y la benzoquinona, para

facilitar la transferencia de electrones de la biopelícula bacteriana al electrodo.¹⁰⁹ Un amplio número de componentes, en su mayoría fenoxazinas, fenazinas, fenotiazinas y quinonas, fueron investigados posteriormente por su funcionalidad y comportamiento como mediadores en las CCM (tabla 5).^{2,73,110-112}

Tabla 5. Mediadores redox exógenos empleados en CCM.³

Tipo de sustancia	Mediador redox	Potencial redox, E ⁰ /V
Fenazinas	Rojo neutro	-0.32
	Safranina	-0.29
	Etosulfato de fenazina	0.06
Fenotiazinas	Azul de metileno	-0.02
	Azul de toluidina O	0.03
	Tionina	0.06
	Fenotiazinona	0.13
Fenoxazinas	Resorurfinina	-0.05
	Galocianina	0.02
Quinonas	2.Hidroxi-1,4-naftoquinona	-0.14
	Anthraquinona-2.6-disulfonato	-0.18

La mayor desventaja en el empleo de mediadores redox exógenos, aparte de la generación de densidades de corriente bajas de 10 a 100 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, es la necesidad de su adición regular, lo cual es tecnológicamente inviable dado a sus costos y ambientalmente cuestionable por sus propiedades tóxicas.³

ii. Metabolitos primarios

La generación de metabolitos primarios reducidos, se encuentra asociada a la degradación oxidativa del sustrato. Dichos metabolitos son producto de los procesos de rutas metabólicas primarias vitales en la supervivencia de los microorganismos. Para poder ser empleado como reductor durante la oxidación anódica, el metabolito tiene que cumplir ciertos requerimientos: su potencial redox debe ser lo más negativo posible dentro del límite establecido por el potencial de oxidación del sustrato, y debe encontrarse accesible para la oxidación electroquímica bajo las condiciones de operación de la CCM.³

Este mecanismo ha sido observado por Rosenbaum *et al.* (2005), quienes emplearon *E. coli* K12 para la producción de gas hidrógeno, el cual fue re-oxidado por la catálisis realizada en un electrodo de polianilina y platino, obteniendo densidades de corriente por

arriba de los 1.5 mA/cm^2 . De forma similar Straub y Schink (2004), empleando *Sulfurospirillum deleyianum*, observaron la reducción de sulfuro, el cual fue subsecuentemente re-oxidado en intermediarios más oxidados, en presencia de hierro.¹¹⁹

Entre las especies bacterianas que emplean dicho mecanismo de transferencia de electrones se encuentran *Pseudomona aeruginosa* quién produce fenazinas⁷⁸ y *Shewanella* que genera riboflavinas como mediadores redox.⁴⁷

Las rutas metabólicas que determinan el flujo de electrones y protones, juegan un papel importante en la generación eléctrica bacteriana.³ Además de la influencia del tipo de sustrato,^{3, 10, 12} el potencial del ánodo también determinará el metabolismo microbiano.¹⁸ Son dos rutas metabólicas las cuales generan metabolitos primarios: respiración anaeróbica y fermentación.³

Respiración anaeróbica

Presente en bacterias anaerobias. En principio, cualquier aceptor terminal de electrones con un potencial redox negativo respecto al electrodo, puede ser empleado para establecer la transferencia anódica de electrones en la CCM (figura 14).³

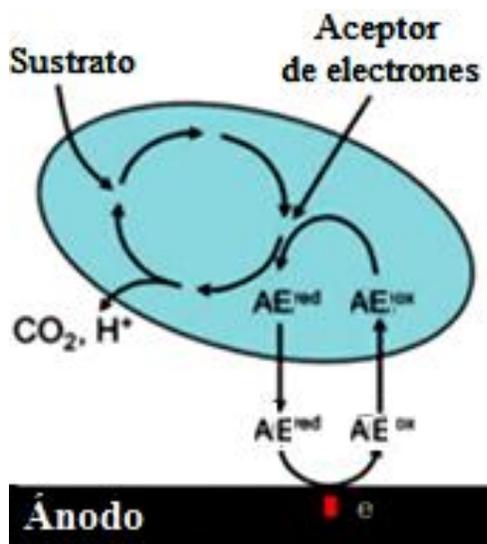


Figura 14. Representación esquemática de la TME vía metabolitos primarios por aceptores terminales de electrones reducidos (en el citoplasma) AE^{red} : Aceptor de electrones reducido. AE^{ox} : Aceptor de electrones oxidado.³

Se ha observado la predominancia de microorganismos exoelectrógenos anaerobios, a potenciales anódicos bajos de entre -0.15 V y + 0.02 V, donde las bacterias generan los electrones a través de la cadena respiratoria, mediante un metabolismo oxidativo.¹²⁰ Los electrones y protones pueden ser transportados por NADH deshidrogenasas, ubiquinona, coenzima Q o citocromos.¹²² El empleo de dicha ruta metabólica ha sido investigada por Kim *et al.* (2004), quienes observaron una reducción en la generación de corriente eléctrica cuando se adicionan varios tipos de inhibidores en la cadena respiratoria, como: óxido 2-n-heptil-4-hidroquinona (HQNO), NADH deshidrogenasa/coenzima Q, antimicina A, cianuro y azida.¹³ Este tipo de ruta ha sido observada regularmente en CCM con eficiencias energéticas por arriba del 65%.⁵⁹

Como se ve en la tabla 6, el potencial estándar del $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ es demasiado positivo para un mediador redox anódico. Sin embargo, el potencial redox de la pareja de $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ puede ser desplazado hacia valores negativos, a través de la formación de complejos de Fe^{+3} con respecto al Fe^{+2} con ácidos húmicos, lo cual puede permitir el empleo del sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ para la mediación de electrones dentro de la CCM.³

Tabla 6. Potenciales biológicos estándares de donadores y aceptores de electrones.³

Pareja redox	$E^{\theta'}/\text{V}^a$
$\text{CO}_2/\text{Glucosa}$	-0.43
$\text{CO}_2/\text{Formato}$	-0.43
$2 \text{H}^+/\text{H}_2$	-0.42
$\text{CO}_2/\text{Acetato}$	-0.28
CO_2/CH_4	-0.24
$\text{SO}_4^{-2}/\text{HS}^-$	-0.22
Piruvato/Lactato	-0.19
$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	+ 0.43
$\text{MnO}_2/\text{Mn}_2^+$	+ 0.66
$\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$	+ 0.77
$\frac{1}{2} \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+0.82
$\frac{1}{2} \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+ 0.51
Fumarato/Succinato	+0.33 ^b

^a Potencial estándar medido a pH 7. ^b Potencial efectivo (irreversible), determinado en experimentos en CCM.

La reducción del sulfato por bacterias sulfatoreductoras, es una de las rutas respiratorias más comunes entre las bacterias anaerobias, especialmente en aquellas presentes en CCM empleadas para tratamiento de aguas residuales, es por ello que la oxidación del sulfuro representa un mecanismo de transferencia de electrones importante. Un ejemplo del uso de una bacteria sulfato reductora empleada como biocatalizador es *Desulfovibrio desulfuricans*.³

Con un potencial biológico estándar de -0.22 V, la pareja redox sulfato/sulfuro es la más adecuada para la mediación de electrones dentro de la CCM desde un punto de vista termodinámico. La ecuación de la reacción es la siguiente:³



El potencial biológico estándar de -220 mV puede derivar una energía libre de -70.4 kJ, dicho valor pudiera ser prometedor para su aplicación en la CCM. Para un transferencia teórica de 24 electrones mediante la oxidación completa de glucosa, se obtendrían 1690 kJ con una eficiencia energética de 77.6%. Sin embargo, las bacterias sulfatoreductoras no pueden metabolizar carbohidratos. Estas dependen de la presencia de bacterias fermentativas que les proveen ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes, para llevar a cabo el proceso de oxidación de dichas moléculas y producir electrones dentro de la CCM.¹²² Adicionalmente, la re-oxidación electroquímica del sulfuro a sulfato es difícil, debido a que los electrodos se ven envenenados por la fuerte y generalmente irreversible, adsorción del sulfuro.³

Fermentación

Una gran variedad de procesos fermentativos y foto-heterotróficos, resultan en la generación de metabolitos primarios ricos en energía, tales como ácidos orgánicos sencillos (formato, butirato, acetato, etc) y/o alcoholes (etanol) (figura 15).³ Dichos productos fermentativos, pueden ser oxidados directamente por microorganismos exoelectrógenos para su aprovechamiento en la generación de energía dentro de la CCM,¹⁹⁴ un ejemplo de ello es *Geobacter* spp. quién es capaz de extraer electrones del acetato, para la generación de corriente.¹⁸ Karube *et al.* (1977) realizaron las primeras observaciones del empleo de

productos fermentativos para la generación de electricidad. Utilizaron cultivos inmovilizados, generadores de hidrógeno, como biocatalizadores y platino como electrocatalizador para la oxidación del hidrógeno. Dado la susceptibilidad de los electrodos al envenenamiento y desactivación, las densidades de potencia reportadas fueron bajas. Sin embargo, se han logrado grandes progresos contra las reacciones de envenenamiento de los electrodos de platino mediante el empleo de un recubrimiento de polímeros electroconductores como la polianilina y sus formas fluoradas.^{3,126}

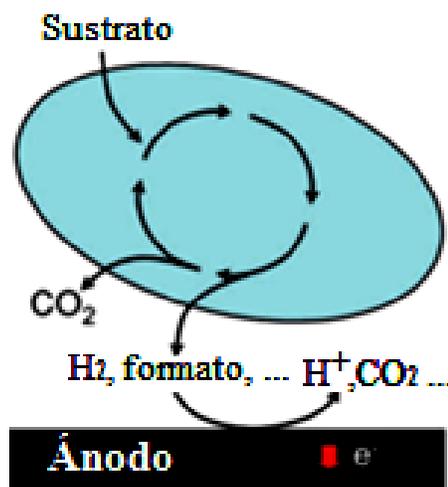


Figura 15. Representación esquemática de la TME vía metabolitos primarios por la oxidación de productos reducidos de la fermentación. AE^{red}: Aceptor de electrones reducido. AE^{ox}: Aceptor de electrones oxidado.³

Se ha observado la disminución de microorganismos exoelectrógenos a potenciales anódicos de más de + 0.37 V, promoviendo una mayor diversidad bacteriana la biopelícula y la presencia de microorganismos fermentadores, lo cual se traduce en una disminución en la densidad de corriente.¹²⁰ Este tipo de metabolismo se presenta en consorcios productores de metano, generalmente provenientes de lodos anaeróbicos.¹²

Durante la fermentación de glucosa, las posibles reacciones serían:⁸⁶

Homoláctica:



Alcohólica:



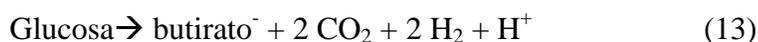
Acetogénica:



Ácida mixta:



Butírica:



En la tabla 7 se presenta un resumen general de algunas especies bacterianas y sus rutas de transporte de electrones tentativas.¹⁸

Tabla 7. Especies bacterianas identificada en CCM y su posible metabolismo y vía de transferencia de electrones.¹⁸

Metabolismo	Tipo de transferencia	Ejemplos de microorganismos	Transportador final de electrones	Mediador redox adicionado
Oxidativo	Membrana	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	Desconocido	No
		<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Citocromo tipo-C 89kDa ^{al}	No
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	Citocromo tipo-c ^a	No
Oxidativo	Mediadores	<i>Escherichia coli</i>	Hidrogenasa	Si ^b
		<i>Shewanella putrefaciens</i>	Quinonas ^a	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ficocianina, feasina y carboxamida	
		<i>Erwinia disolvens</i>	Desconocido	Si ^c
		<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	S ²⁻	
Fermentativo	Membrana	<i>Clostridium butyricum</i>	Citocromos ^a	No
	Mediadores	<i>Enterococcus faecium</i>	Desconocido	Si ^d

^a Tentativamente, ^b Rojo neutro, ^c Fe(III)CyDTA(quelador de hierro), ^d Ficocianina

iii. Metabolitos secundarios

Si los microorganismos no se encuentran en contacto directo con el aceptor de electrones sólido, estos pueden emplear compuestos transportadores de electrones fuera de la célula bacteriana (ej. ácidos húmicos o metales quelados), o inclusive producir metabolitos secundarios.¹¹³⁻¹¹⁵ Ejemplos de dichos metabolitos secundarios, son las fenazinas bacterianas como la ficocianina y las 2-amino-3-carboxil-1,4-naftoquinonas (ACNQ).¹¹³

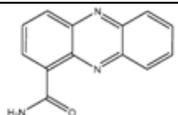
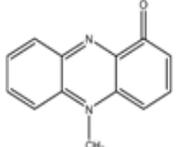
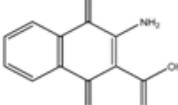
Un ejemplo de la participación de metabolitos secundarios, es el estudio realizado por Newman y Kolter (2000) quienes plantan la acción de los transportadores redox del tipo quinona, como los percursores en la transferencia de electrones de las especies bacterianas *Shewanella spp.* y *Shewanella oneidensis*¹¹⁵ a electrodos, o bien a aceptores solubles de electrones como el óxido de hierro. Sin embargo, respecto a *Shewanella oneidensis*, también se ha planteado la superposición¹¹⁶ de mecanismos de transferencia que involucran TDE vía citocromos C⁴¹ y nanocables,⁸³ además de los metabolitos secundarios.

El efecto en el incremento de la transferencia de electrones en una CCM, por la presencia de fenazina ha sido comprobado.¹⁸ Se ha logrado probar la acción de la ficocianina y feazina-1-carboxamida producida por *Pseudomonas aeruginosa* en la transferencia de electrones al ánodo de la CCM.³⁴ Otros microorganismos, que presentan este mecanismo de transferencia de electrones son *Shewanella putrefaciens*^{113,117-118} y *Pseudomonas aeruginosa*.¹¹² Hernández *et al.*(2004) demostraron la influencia de estos metabolitos secundarios microbianos por medio de la interferencia en la transferencia extracelular de electrones, inactivando los genes responsables de la producción de dichos mediadores en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual se vio traducido en la disminución de la generación de corriente en la CCM.

Debido a que el potencial redox es más negativo para las especies bacterianas hasta ahora estudiadas, que el de los citocromos de membrana externa (tabla 8), la cantidad de energía eléctrica extraíble es mayor para la TME en comparación con la TDE. Se ha argumentado que el alto rendimiento puede estar limitado, a los sistemas confinados en batch, mientras que aquellos en continuo puede ocurrir una pérdida constante de

mediadores, lo cual conlleva a un decremento en el número de electrones (n) transferidos, y por ende también en la eficiencia coulombica y energética.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ No obstante, algunos estudios sugieren que dichas pérdidas son debidas al confinamiento de los transportadores redox en la biopelícula por la acción de fuerzas electrostáticas.³

Tabla 8. Mediadores redox bacterianos.³

Nombre	Estructura	Potencial redox, E^{θ} /V
Fenazina-1- carboxamida		-0.115
Ficocianina (fenazina)		-0.03
2-Amino-3-carboxil-1,4-naftoquinona (ACNQ)		-0.071

El mediador sirve como un aceptor terminal reversible, transfiriendo los electrones de la célula bacteriana de manera indirecta, ya sea a un oxidante sólido (el ánodo de la CCM) o dentro de las capas anaeróbicas de la biopelícula, donde se re-oxida y nuevamente se encuentra disponible para otro proceso redox. Por lo tanto, teóricamente un metabolito secundario puede reutilizarse en miles de ciclos redox (figura 16).³

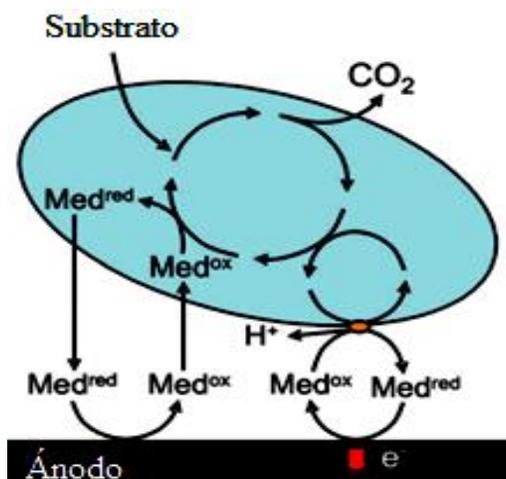


Figura 16. TME a través de metabolitos secundarios Med^{ox} : mediador oxidado. Med^{red} : mediador reducido.³

1.9 Técnicas de identificación.

La genómica provee la base para la secuenciación de todo el DNA en un organismo, y el genoma completo revela todas las posibles reacciones biológicas que un microorganismo puede llevar a cabo. En el pasado, genomas completos eran sólo obtenidos únicamente de aquellos microorganismos que podían ser aislados en medios de cultivos; actualmente es posible secuenciar genomas de microorganismos no cultivables empleando la metagenómica.²³

Las técnicas post-genómicas se refieren a las herramientas que exploran los genomas completos que han sido secuenciados, esta incluye la bioinformática y el campo emergente de la proteómica. Esta puede unir el genotipo y el fenotipo. Sus herramientas incluyen el análisis masivo de la transcripción a mRNAs, traducción de los mRNAs a proteínas y modificaciones en las proteínas.²³

Sin el empleo de dichas herramientas moleculares, el entendimiento de las comunidades metagenómicas sería lento, lo cual permitiría únicamente avances con el transcurrir de varias décadas. La información Pre- y Post-genómica sobre los microorganismos que se encuentran involucrados en la producción de bioenergía, facilitará enormemente los avances científicos y tecnológicos.²³

Las técnicas pre-genómicas más comunes son el escaneo o rastreo de la subunidad pequeña del gen 16S, que codifica para el rRNA. Estas técnicas incluyen la generación de bibliotecas de clonas, análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), la detección de polimorfismo en la longitud de fragmentos marcados en un extremo (T-RFLP), hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) y análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA). Muchas de estas técnicas han sido empleadas para la investigación de la composición relativa en las comunidades bacterianas que se encuentran involucradas en la generación de hidrógeno, metano y bioelectricidad. Sin embargo, no se han realizado estudios suficientes que permitan conocer, por completo, las comunidades bacterianas implicadas en la generación de bioelectricidad. Dichas técnicas

tienen la ventaja de llevar a cabo la identificación sin necesidad de cultivar los microorganismos, las interacciones sintróficas pueden ser mejor entendidas y los microorganismos que se encuentran involucrados en la operación exitosa del sistema, pueden ser monitoreados para la evaluación de procesos continuos.²³

No existe un estándar o una regla específica sobre cuál es la técnica más adecuada para identificación de los microorganismos, sin embargo cada una de ellas presenta cierto tipo de ventajas y desventajas por las cuales podemos tomar la decisión de elegir de acuerdo a la que se adecue más a las necesidades del estudio. Como se puede ver en la tabla 9, existen diversas técnicas a emplear para la identificación de microorganismos, cada una de ellas posee tanto ventajas como desventajas, por lo cual la elección de la técnica a emplear dependerá del tipo de estudio que se quiera llevar a cabo. Respecto al análisis de las comunidades establecidas en las CCM, se puede decir que las técnicas de estudio más empleadas son la elaboración de bibliotecas de clonas 16 rDNA, MPN-PCR, DGGE y qRT-PCR.^{4,5,10-11,15-17,71,130} Generalmente se emplean la elaboración de bibliotecas de clonas 16 rDNA para estudios más detallados de la comunidad bacteriana en la CCM, ya que esta nos permite tras la secuenciación de clonas seleccionadas, la identificación de géneros e inclusive especies bacterianas.¹⁵⁻¹⁶ De manera menos específica se han podido realizar estudios de diversidad microbiológica en las CCM, empleando la técnica de DGGE la cual ha sido la más empleada actualmente dado a su relativa rapidez para identificar los filotipos mayoritarios de la comunidad analizada.^{4,11,82,130-133} Este tipo de identificación ha permitido analizar la evolución de la diversidad bacteriana, tomando en cuenta la composición del inóculo inicial y las muestras tomadas en diferentes puntos de la experimentación,⁸² además de identificar las diferencias entre la composición microbiana del electrodo y las bacterias suspendidas en el electrolito.^{61,134-136} En la tabla 9 se presenta un resumen sobre las ventajas y desventajas de algunas técnicas más comunes para la identificación de microorganismos.

Tabla 9. Técnicas moleculares para identificación de microorganismos en CCM.²³

Método	Descripción	Ventajas	Limitaciones
PCR	Emplea cebadores o primers de alta especificidad, amplifica secuencias de nucleótidos para el análisis de PCR.	Detecta la presencia o ausencia de genes específicos de una especie o género.	Se debe saber cuál es el microorganismo o gen de estudio en específico; y los resultados no son necesariamente cuantitativos
Librería de clonas	Técnica post-PCR, en la cual genes amplificados por PCR son clonados y secuenciados	Permite una alta resolución de análisis sobre comunidades microbianas complejas; provee información sobre los miembros más abundantes de la comunidad.	El número de clonas que puede ser secuenciado, por lo general, es limitado.; y los resultados no siempre reflejan la verdadera diversidad de la muestra y no son cuantitativos.
DGGE	Técnica post-PCR, donde los genes amplificados son separados en un gel desnaturalizante; la separación de secuencias en bandas se basa en el principio de fusión química, dependiendo del contenido de Guanina y Citocina.	Es rápido; se pueden analizar múltiples muestras; visualización de los organismos abundantes; se pueden analizar la dinámica poblacional; y puede identificar microorganismos no reconocidos mediante la secuenciación de las bandas extraídas.	Resultados pobres cuando hay una alta diversidad; una banda puede corresponder a varios microorganismos; un microorganismo puede generar múltiples bandas; emplea secuencias cortas que obstaculizan la identificación.
T-RFLP	Técnica Post-PCR. Analiza fragmentos marcados con fluorescencia (fluorocromos) que también han sido amplificados por medio de PCR. Estos productos marcados en su parte terminal. Los genes amplificados son digeridos con enzimas de restricción y separados en un gel de electroforesis, luego visualizados por medio de la excitación del compuesto fluorescente identificando picos de fluorescencia y correlacionándolo con la abundancia de la especie.	Es rápido, se pueden analizar múltiples muestras; provee información relativa a los miembros de la comunidad más abundantes; y es útil para estudios de la dinámica poblacional. Esta técnica hace posible determinar cualitativamente la diversidad de especies presentes	T-RFLP

Tabla 9 (continuación)²³

Método	Descripción	Ventajas	Limitaciones
PCR tiempo real	Colorantes fluorescentes y sondas son combinadas con los primers del PCR y una señal fluorescente es obtenida en cada ciclo de amplificación, que, utilizando una curva de calibración, se puede emplear para determinar el número de copias del gen de la muestra original.	Es cuantitativo; altamente sensitivo; y permite un análisis de alta calidad.	PCR tiempo real
FISH	Una sonda de oligonucleótidos fluorescentes se hibridiza directamente con el ARN o ADN dentro de las células.	Permite la observación espacial de las interacciones entre los microorganismos.; y puede ser cuantitativa.	La permeabilidad de la célula, la accesibilidad y especificidad del sitio de enlace no siempre es precisa.
Hibridización dot-blot	El RNA es extraído de una muestra y es inmovilizado en una membrana hibridizado con sondas fluorescentes o radioactivas, para revelar la presencia y la cantidad de los microorganismos identificados.	Resultados semi-cuantitativos, se encuentra bien desarrollada.	La especificidad puede estar limitada, demanda mucho tiempo, y es de bajo rendimiento.
Análisis de microarreglos	Un microarreglo consiste en el ordenamiento de los fragmentos de ADN de genes específicos; productos marcados de ARN, mARN, cADN, ADN o PCR son hibridados con un chip de microarreglo, el cual provee de una señal cuando el ácido nucleico que se está rastreando se encuentra presente.	Permite un análisis de alta definición y es útil para el estudio de expresión de genes.	Los resultados son únicamente semi-cuantitativos, la elaboración de los microarreglos es complicada, y se requiere de un equipo muy costoso.

La tabla 10 presenta algunas de las técnicas pre-genómicas aplicadas sobre CCM y los resultados obtenidos en otros estudios, cuya finalidad fue la identificación de los miembros predominantes en la biopelícula establecida en sus sistemas.

Tabla 10. Técnicas pre-genómicas para identificación de electrogénicos en CCM.

Técnica	Descubrimientos	Referencia
Biblioteca de clonas 16 rDNA y MPN-PCR	Los principales miembros en la comunidad de la CCM que empleo un inóculo de sedimentos marinos fueron Proteobacterias, y específicamente, un alto porcentaje de <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> .	15 16
Biblioteca de clonas 16 rDNA y MPN-PCR	La composición de la biopelícula cambió dependiendo del origen del inóculo; sin embargo, <i>Geobacteraceae</i> siempre se encontró presente.	17
Biblioteca de clonas 16 rDNA	Los principales miembros de la comunidad en una CCM alimentada a base de etanol fueron Proteobacterias, <i>Azoarcus spp.</i> y <i>Desulfuromonas spp.</i>	5
DGGE	Los principales miembros en la comunidad fueron <i>Geobacter sulfurreducens</i> (>99% de similitud) y una clona no cultivable del filum Bacteroidetes; se favoreció la proliferación de Firmicutes cuando la CCM fue alimentada con glucosa.	4
Biblioteca de clonas 16 rDNA	Los miembros mayoritarios de la comunidad bacteriana presente en una CCM alimentada con glucosa, pertenecían a los filotipos de γ - y β -Proteobacteria, o Firmicutes.	71
Biblioteca de clonas 16 rDNA y DGGE	Emplearon agua de río o agua residual sintética como combustible, observaron un desarrollo de las comunidades microbianas muy diferente para cada uno de estos. En la CCM alimentada por agua de río predominaron γ -Proteobacterias y β -Proteobacterias, mientras que en la alimentada por agua residual sintética las α -Proteobacterias fueron las que dominaron.	11
DGGE	Los principales miembros de la comunidad bacteriana fueron de Firmicutes (<i>especies: Clostridium, Eubacterium, Enterococcus y Lactobacillus</i>), γ -Proteobacterias (<i>Pseudomonas spp.</i>) y B-proteobacterias (<i>Alcaligenes spp.</i>)	130
Biblioteca de clonas 16 rDNA y qRT-PCR	<i>Geobacter spp.</i> fueron dominantes en la comunidad. Al reducir el potencial anódico se observó un incremento en el porcentaje de <i>Geobacter spp.</i>	10

1.10 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Otro aspecto de gran importancia en la realización de estudios de caracterización sobre las comunidades microbianas en las CCM, es la determinación morfológica de las mismas. Para tal fin, la microscopía electrónica de barrido (MEB) se presenta como una herramienta útil. El MEB es uno de los dos modos de microscopía electrónica (ME), capaz de proporcionar visualizaciones de bacterias de manera detallada. El segundo método de utilidad es la denominada microscopía electrónica de transmisión (MET).¹³⁷

La MEB es relativamente sencilla y los resultados son fáciles de interpretar, dado a que los microorganismos son visualizados como objetos tridimensionales (3-D) (Figura 16).¹³⁵

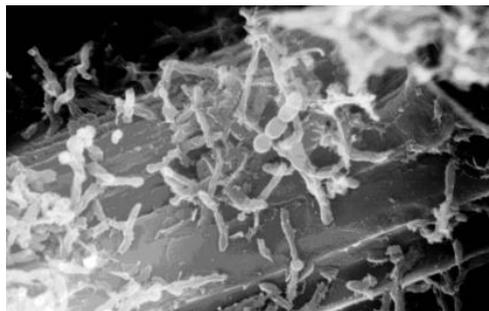


Figura 17. MEB de la biopelícula establecida a los 36 días en una CCM (tipo PEM) alimentada con hidrolizado de trigo y ARS. Aumento 6000 X, a 40KV. Escala 1 μ m.¹³⁵

Se pueden visualizar muestras por MEB convencional de dos maneras: muestras de bacterias previamente fijadas, deshidratadas y desecadas; o bien muestras crio-fijadas a bajas temperaturas, por debajo de los -120 °C, por medio de crio-MEB. Ambas técnicas son llevadas a cabo mediante el depósito de las muestras en una cámara de vacío.¹³⁷

La preparación de una muestra para su observación por el método de deshidratación y desecación, consiste en la extracción del o los microorganismos para su fijación, posteriormente se lleva a cabo una deshidratación con etanol hasta llegar a su punto crítico, y se pasan a una cámara de vacío donde se lleva a cabo un bombardeo con partículas de oro para poder finalmente realizar la MEB y tomar fotomicrografías de los microorganismos a un voltaje de aceleración apropiado. Algunos de los anteriores pasos mencionados, pueden afectar la visualización de ciertas estructuras de los microorganismos, tales como flagelos

bacterianos o bien la distorsión de la membrana celular. El baño de oro (deposito de una capa de 20 nm de espesor), puede oscurecer estructuras finas tales como: pili y fimbrias. Sin embargo, en caso de presentarse dichos contratiempos, existe la posibilidad de emplear MET por medio de una tinción negativa o sombreado con platino.¹³⁷

Por lo general, se estipula la obtención de muestras con un espesor no mayor a 2 mm y con dimensiones de 10 mm. x 10 mm.,¹³⁷ no obstante dicha recomendación no es del todo estricta ya que en la mayoría de las muestras analizadas de CCM se emplean cortes sin importar el espesor de la muestra,¹³⁵ obteniendo buenas imágenes de microscopía a pesar de exceder dicho espesor. Otra forma de llevar a cabo la observación de los microorganismos en el electrodo es tomando una muestra de la biopelícula y depositarla en filtros de microporo de 0.2 μm , como en el caso de Park *et al.*(2001) quienes fijaron las células con glutaraldehído al 2 % en un buffer 100 mM HEPES, a un pH de 6.8 y con MgCl_2 2 mM, durante 1 hr.. Posteriormente se fijan durante 2 hrs en OsO_4 al 1 %.

Para muestras de microorganismos sobre materiales sólidos, se recomienda realizar una fijación en amortiguadores a una concentración de 0.1 M y un pH de 6.5-7.0, tales como el glutaraldehído del 2 al 3%, en períodos de 5 min. a 24 hrs.¹³⁸ Si los constituyentes de la muestra no se encuentran conformados por proteínas, y consisten en lípidos o polisacáridos, se recomienda realizar una posterior fijación con tetróxido de osmio (OsO_4) o rojo de rutenio. Aunque los dobles enlaces ($-\text{C}=\text{C}-$) en ácidos grasos insaturados reaccionan con el tetróxido de osmio, el osmio puede ser fácilmente removido mediante una hidrólisis espontánea subsecuente. Esta resulta en la formación de un diol y la liberación de trióxido de osmio (OsO_3).¹³⁹

JUSTIFICACIÓN

Son pocos los estudios realizados respecto al análisis de la sucesión de los consorcios bacterianos mixtos, la relación entre su composición y el desempeño de las CCMs. El análisis de los microorganismos mayoritarios presentes durante los períodos de mayor generación de potencia en la CCM, contribuye al área de conocimiento que promueva la proliferación de las comunidades bacterianas de interés, para un mejor desempeño en este tipo de sistemas bioelectroquímicos.

La importancia de este estudio reside en la aportación de conocimiento referente al análisis de la sucesión de la comunidad bacteriana mayoritaria en una CCM y la evaluación simultánea sobre el desempeño de la misma.

HIPÓTESIS

Se espera un cambio en la composición de la biopelícula en las cuatro fases de estudio planteadas, con una tendencia hacia el enriquecimiento de alguna de las bandas identificadas mediante el análisis de DGGE, esperando encontrar una correlación entre dicho enriquecimiento y los puntos de mayor generación de densidades de corriente y potencia, los tipos de mecanismos de transferencia de electrones observados y la disminución de pérdidas dentro de la CCM.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Diseño de la CCM.

La CCM fue elaborada con piezas de acrílico de 6 mm de espesor. Las piezas fueron fijadas mediante cemento de acrílico. Las cámaras anódica y catódica tuvieron forma semicircular, con una capacidad de 125 ml (volumen útil: 110 ml) (figura 18 y 20). El área efectiva de la membrana (Nafión® 117), previamente activada^{10, 70}, fue de 18.9 cm². El soporte de la membrana (figura 19) constó de dos piezas de acrílico perforadas, con un empaque de poliuretano para fijar la membrana y evitar fugas. Se emplearon tornillos tipo allen y tuercas de acero inoxidable, al igual que empaques circulares de respaldo para la unión de las piezas desarmables de la CCM. Para asegurar el correcto sellado de las tapas en las cámaras y las condiciones de anaerobiosis de la CCM, se colocaron empaques de poliuretano y fueron atornilladas en la parte superior de las mismas (figura 18).

Las tapas de las celdas tuvieron puertos para los electrodos de trabajo, referencia, contraelectrodo, la alimentación y obtención de muestras de análisis, así como para el difusor de oxígeno en el cátodo. Los orificios diferentes a los electrodos de los ánodos y cátodos fueron sellados temporalmente con septums de polianilina, recubiertos de silicón. El cable de unión de los electrodos se recubrió con Termofit®, y se fijaron a la tapa con resina epóxica, a 1.6 cm de distancia respecto a la membrana y con una separación de 3.2 cm entre sí. Las conexiones externas fueron hechas de malla de acero inoxidable (entramado de 400 · 400) con hilo de nylon, y recubiertas nuevamente con Termofit® (figura 18). El electrodo del ánodo se elaboró con tela de carbón (1.5·6 cm; 9 cm²), en el caso del cátodo se usó carbón activado (30 gr, sin catalizador) empleando como colector malla de acero inoxidable (entramado de 400·400)

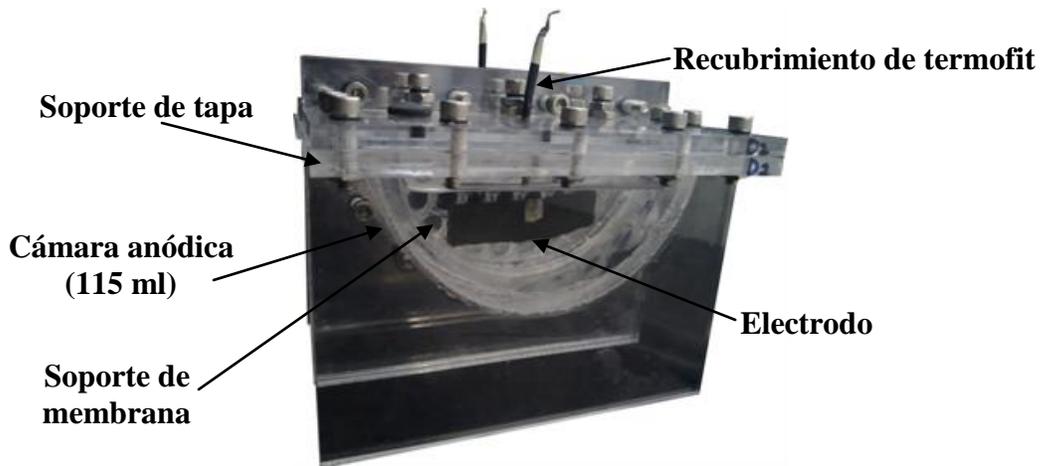


Figura 18. Celda ensamblada

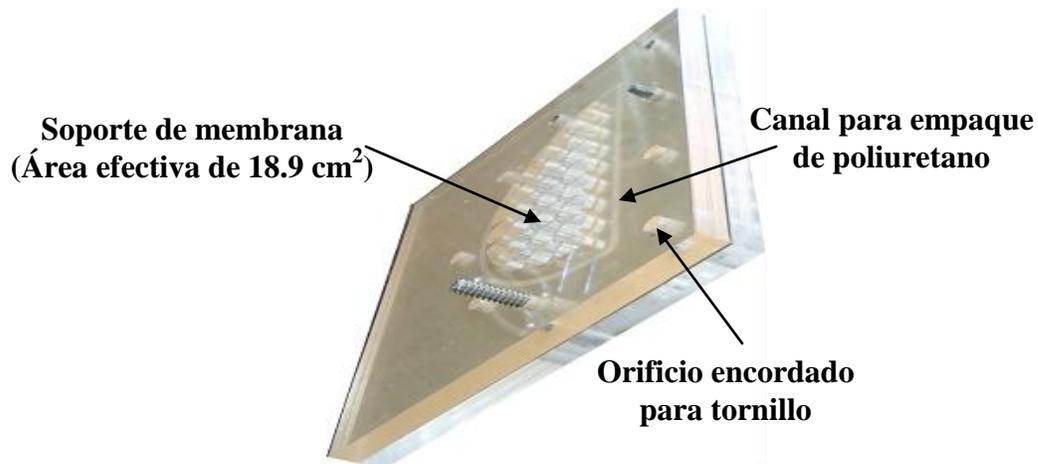


Figura 19. Soporte de la membrana.

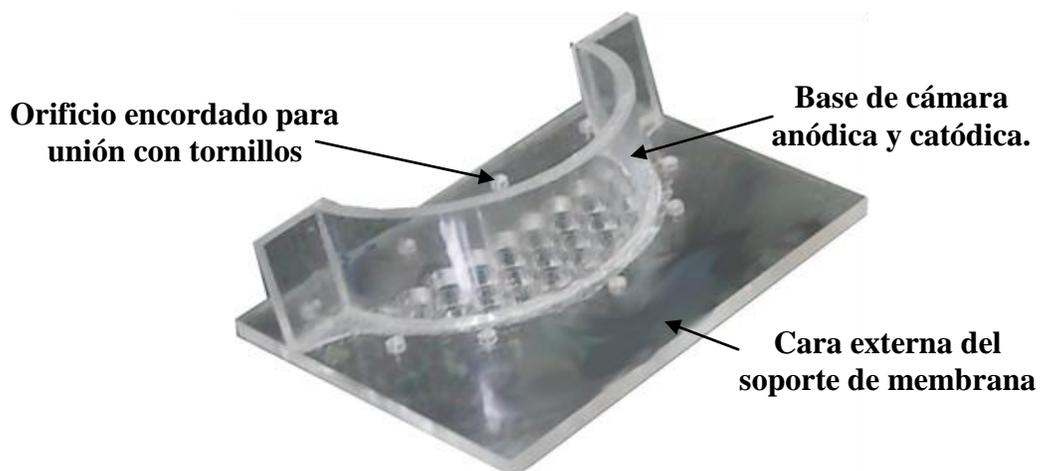


Figura 20. Configuración de cámara anódica y catódica.

2.2 Pruebas de estanqueidad, inicio de las CCMs y determinación de las fases de estudio.

Previo a la experimentación, se realizaron pruebas de estanqueidad con la finalidad de identificar y reparar presencia de fugas en la CCM. Inicialmente, se empleó un molde de acetato para simular la membrana colocada en el soporte de ensamble. Las CCM fueron llenadas con agua, adicionándoles naranja de metilo y azul de metileno como colorantes, para determinar si existían fugas dentro (entre cámaras) y fuera de ellas, con mayor facilidad (figura 21). Para evaluar fugas en las tapas se procedió a colocar la CCM de forma invertida (figura 22).

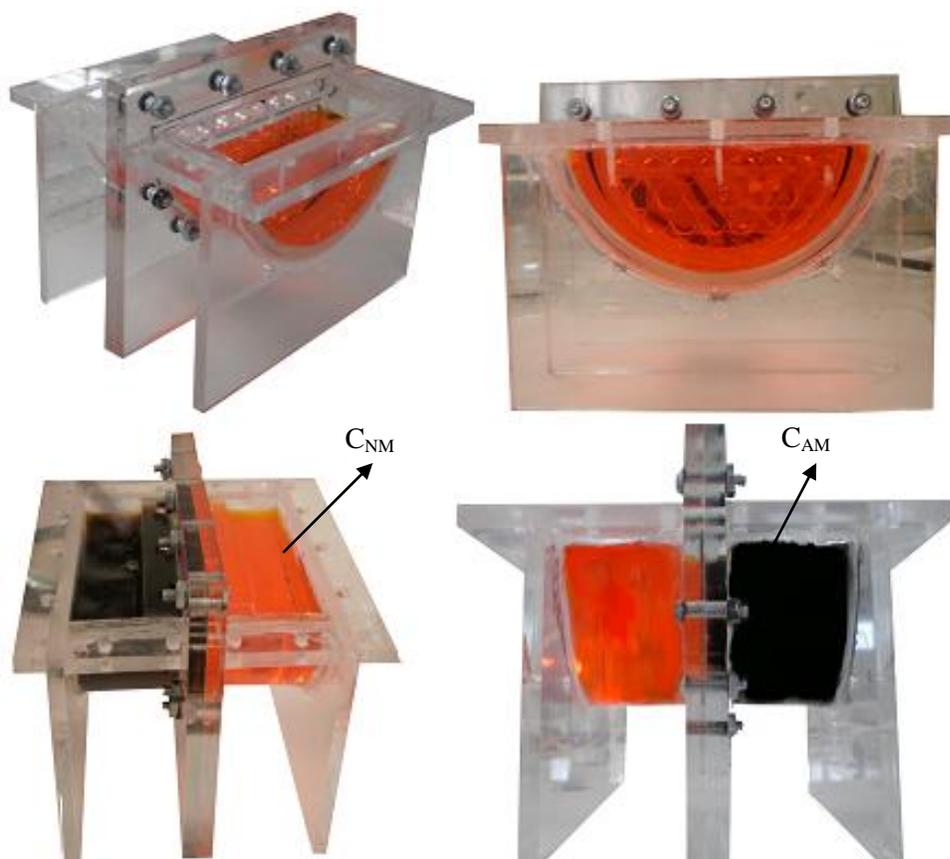


Figura 21. Pruebas de estanqueidad de las cámaras de la CCM. C_{NM} : Colorante naranja de metilo. C_{AM} : colorante azul de metileno.

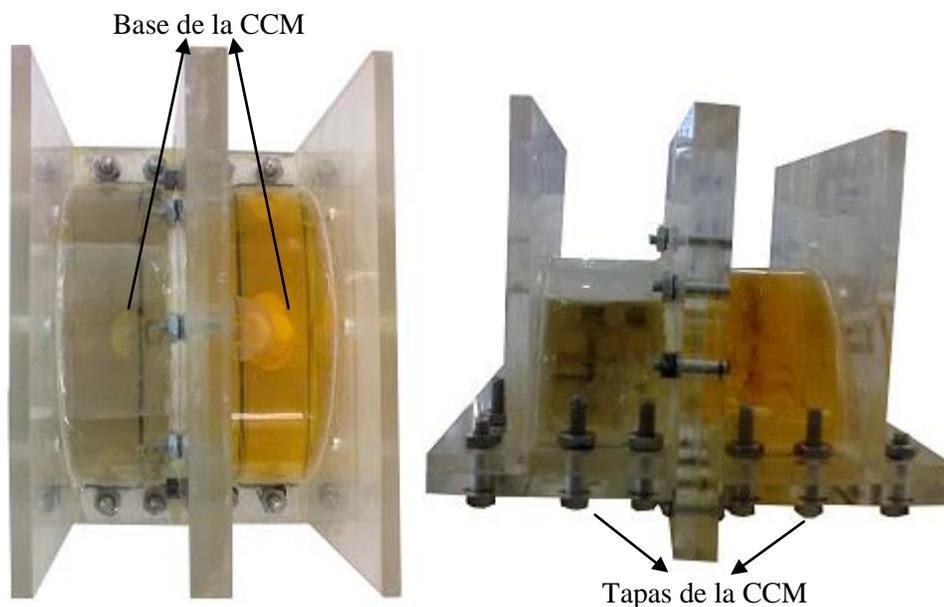


Figura 22. Pruebas de fugas en las tapas de la CCM.

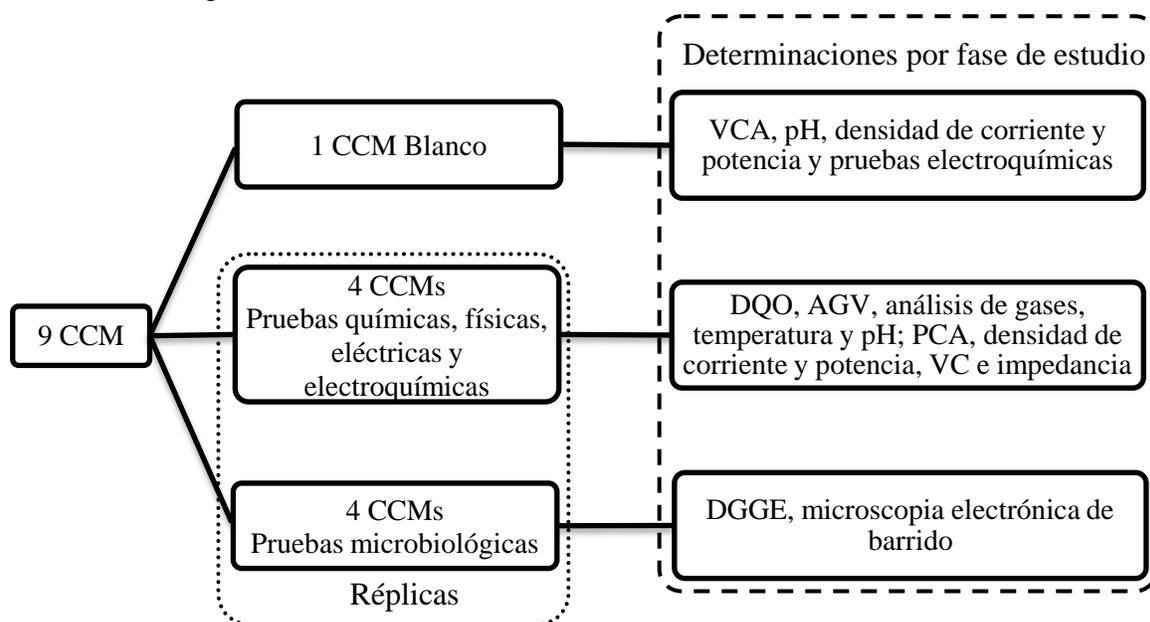
Posterior a las pruebas de estanqueidad, se procedió al inicio de la experimentación de las 9 CCM, inoculando 8 con 88 ml de inóculo mixto, 20 ml de buffer de fosfatos de sodio (Na_2HPO_4 , 4.09 g/L y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.93g/L)³³ y 2 ml de ARS con acetato (6g/L).^{136,143} Una CCM fue empleada (paralelo a la experimentación) sin inóculo y alimentación, bajo las mismas condiciones como blanco. Se realizaron curvas de polarización semanalmente para determinar las fases de estudio cuando se presentara algún incremento o decrementos significativo en cuanto a la densidad de corriente y de potencia generadas. Dicho incremento o decrementos significativo se determinó estadísticamente mediante un análisis de estadístico de ANOVA (software: Statistica® versión 8), con un nivel de confianza del 95%; resultando así 4 fases de estudio en total a lo largo de la experimentación (140 días) como se observa en la tabla 11.

Para el desarrollo del presente estudio, se realizó una modificación de la metodología propuesta por Ishii *et al.* (2008). La adquisición de datos del desempeño de la CCM, en función de pruebas químicas, electroquímicas microbiológicas (DGGE y SEM) de las cuatro fases de estudio, se llevó a cabo como se plantea en la tabla 11.

Tabla 11. Pruebas realizadas con relación a las fases de análisis planteadas para el presente estudio

Parámetros de evaluación / Fases de estudio	Días	Pruebas químicas y electroquímicas	Pruebas microbiológicas
Inóculo	0	No	Sí
1	0-63	Sí	Sí
2	64-77	Sí	Sí
3	78-105	Sí	Sí
4	106-140	Sí	Sí

Se construyeron 9 CCM: 4 para la identificación bacteriana, 4 para pruebas químicas y electroquímicas, y 1 blanco experimental, para las 4 fases de estudio como se observa en la figura 23.

**Figura 23.** Diagrama general del diseño experimental.

Todas las CCM, fueron iniciadas y operadas de igual forma. La toma de muestras se realizó al finalizar cada una de las cuatro fases de estudio. Se utilizaron 4 CCM para la evaluación del desempeño, con la finalidad de no alterar la biopelícula en cada una de las cuatro fases de estudio, por la aplicación de técnicas electroquímicas.

2.3 Inóculo y fuente de carbono.

En el presente estudio se empleó un inóculo mixto nativo anaerobio, de acuerdo a la experimentación previa realizada por Alzate *et al.* (2008). Se alimentó la CCM con agua residual sintética (Na_2HPO_4 , 4.09 g/L y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.93g/L)³³, empleando acetato (6 g/L)^{136,143} como fuente de carbono.

2.4 Modo de operación de la CCM.

Se empleó un anolito acuoso con la siguiente composición: Na_2HPO_4 , 4.09 g/L y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.93g/L.³³ El compartimiento del ánodo fue burbujeado con gas nitrógeno para desplazar el oxígeno presente previo al cierre del ánodo y cada vez que se tomaron las muestras. El pH fue cercano a neutro, ajustándose con un buffer de KHCO_3 y K_2CO_3 (0.2 M) según Fan *et al.* (2007) y Puig *et al.* (2010).

En el compartimiento del cátodo se empleó un buffer de fosfato de potasio (50 mM) como católito de acuerdo a Zang *et al.* (2010) y Erable *et al.* (2009), manteniendo un pH de 4 a 5 mediante buffers de KHCO_3 y K_2CO_3 0.2 M¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Para su aireación se utilizó una bomba de aire marca RESUN®, modelo AC-9602, de 3.5 L/min.^{64,146}

Se alimentó cada 24 hrs con ARS con acetato (6 g/L) como fuente de carbono.^{136,143} La temperatura de trabajo fue de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.5 Evaluación del desempeño de la CCM.

Las mediciones de los parámetros se llevaron a cabo de la siguiente manera:

2.5.1 Pruebas químicas y físicas

- Demanda química de oxígeno

Las muestras se obtuvieron del anolito retirado previo a la alimentación de las CCM. El análisis de las muestras se realizó al finalizar cada una de las fases de estudio, empleando la técnica de oxidación de dicromato de potasio de solución digestiva (reactivo de DQO de alto rango de 0 a 15,000 ppm). Se empleó un reactor digital DRB 200 marca Hach, y un colorímetro Thermo Electron Corporation ORION AQUAfast II™.¹⁴⁸

- Ácidos grasos volátiles

Las muestras se obtuvieron del anolito retirado previo a la alimentación de las CCM, analizándose aquellas correspondientes a cada una de las fases de estudio. Se filtró una muestra obtenida del anolito en papel microporo, posteriormente se realizó el análisis de la muestra con un detector FID en un cromatógrafo de gases Pekín Elmer Clarus 500 (columna EC-1000, Altech).¹⁴⁸

- Análisis de gases (presencia de hidrógeno y metano)

Por cada una de las fases de estudio, se tomaron muestras de gas (1 ml) del espacio libre entre el anolito y la tapa de la cámara anódica, con una jeringa para gases (Sigma Aldrich, capacidad de 5ml). Posteriormente, se inyectó la muestra al cromatógrafo de gases (Perkín Elmer Clarus 500), empleándose una columna molsieve5A para el TCD (Thermal Conductivity Detector) de acuerdo a los procedimientos establecidos por la APHA (2005).

- Temperatura y pH

Las muestras se obtuvieron del anolito retirado previo a la alimentación de las CCM. Se empleó un equipo multiparamétrico Thermo Scientific Orion® (PerpHect LogRmeter, modelo 350), dichos parámetros fueron determinados, de forma diaria, de acuerdo a APHA (2005).

2.5.2 Pruebas eléctricas y electroquímicas

En el caso de las mediciones eléctricas de voltaje para el cálculo de la corriente, densidad de potencia y corriente, se empleó un multímetro Fluke® (Modelo 117). Mientras que para las pruebas electroquímicas de voltametría cíclica y la espectroscopia de impedancia electroquímica se empleó un potencióstato BioLogic, modelo VSP (Science Instruments) y el software EC-Lab® (versión 10.18) para el análisis de los datos.

- Potencial a circuito abierto (PCA)

Para la medición diaria del PCA, se empleó un multímetro Fluke® (Modelo 117). Dicha medición se llevó a cabo de manera previa a la alimentación de la CCM, cada 12 hrs. Este lapso de tiempo para la medición del PCA, fue establecido tomando en cuenta la

lectura del PCA máximo obtenido a lo largo de las 24 hrs del ciclo semi-bach, monitoreado mediante el multímetro Fluke® (Modelo 117), conectado mediante USB a una PC para la adquisición de datos mediante el software MUL-600 (versión 2.0)..

- Cálculo de corriente

El cálculo de la corriente se realizó semanalmente, empleando resistencias externas de 2180, 1790, 1493, 1204, 995 y 382 Ω . La corriente generada en la CCM se calculó por medio de la caída del voltaje a través de la resistencia (ley de ohm), como:

$$I = E_{CCM}/R_{ext} \quad (14)$$

Donde; I es la corriente generada por la CCM (A), E_{CCM} el voltaje medido a circuito abierto (V), R_{ext} la resistencia externa empleada (Ω).²¹

Nota: Dichas resistencias fueron seleccionadas con base a análisis previos a la experimentación en una CCM prueba operada e inoculada bajo las mismas condiciones experimentales, durante 9 meses, a la cual se realizó una curva de polarización empleando resistencias externas de 2.5 Ω , 10.7 Ω , 68 Ω , 100 Ω , 276.8 Ω , 382 Ω , 995 Ω , 1182 Ω , 1204 Ω , 1493 Ω , 1790 Ω , 2180 Ω , 3280 Ω , 4670 Ω , 6800 Ω y 10 k Ω , Las resistencias que no provocaron la desestabilización de la CCM por la pérdida total o variación constante de la corriente generada, fueron las seleccionadas para el cálculo de la corriente, densidad de corriente y de potencia.

- Densidad de corriente

Se calculó semanalmente, en función al área del ánodo, por medio de la siguiente ecuación:

$$I_{An} = \frac{I}{A_{An}} \quad (15)$$

Donde; I_{An} es la densidad de corriente anódica (mA/m²), I es la corriente (mA) y A_{An} el área del ánodo.²¹

- Densidad de potencia

La densidad de potencia se cálculo semanalmente, empleando la siguiente ecuación:

$$P_{An} = \frac{E_{CCM}^2}{A_{An} \cdot R_{ext}} \quad (16)$$

Donde P_{An} es la densidad de potencia anódica (W/m^2), E_{CCM} es el potencial a circuito abierto de la CCM (V), A_{An} es el área del ánodo (m^2) y R_{ext} es la resistencia externa empleada (Ω).²¹

- Eficiencia de coulombica (EC)

Se obtuvo el porcentaje de eficiencia coulombica, al finalizar cada fase de estudio, con base en la siguiente ecuación:

$$\%EC = \frac{MI_t A}{FbV_{AN}\Delta DQO} \times 100 \quad (17)$$

Donde; M es el peso molecular del sustrato (acetato, g/Mol), I es la densidad de corriente máxima (A/m^2), t_b tiempo del ciclo batch (24 h), A es el área del ánodo (m^2), F es la constante de Faraday (98 485C/Mol de electrones), b es el número de moles de electrones producidos por mol de sustrato (8 Mol de electrones por Mol de acetato), V_{AN} es el volumen de operación del ánodo (L) y ΔDQO es la diferencia en DQO del afluente con respecto al efluente.¹⁴⁹

- Voltametría cíclica (VC)

Se realizó al finalizar cada fase de estudio, a media celda (ánodo), biopelícula y anolito, empleando un potenciostato BioLogic, modelo VSP (Science Instruments). El barrido de potenciales se realizó de -0.7 V a 0.7 V (vs Calomel saturado).¹⁴⁰ Con una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .⁴⁷ Para el análisis de datos se utilizó el software EC-Lab® (Versión 10.18), realizándose en el mismo la conversión pertinente para la presentación de los resultados reportados respecto al electrodo estándar de hidrógeno.

De acuerdo a la metodología propuesta por Zhao *et al.* (2008) para la identificación de la presencia de mecanismos directos de transferencia de electrones, se realizó una VC a la biopelícula, retirándose el electrodo dentro de una cámara de anaerobiosis y colocándolo

en una CCM réplica reemplazando el anolito con un buffer de fosfato de sodio (Na_2HPO_4 , 4.09 g/L y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.93g/L).³³ Para la identificación de la presencia de mecanismos indirectos de transferencia de electrones, se realizó una VC al anolito, retirándolo con una jeringa de 50 ml, hasta vaciar el volumen efectivo de 110 ml inyectándolo en una CCM réplica con un electrodo estéril, dentro de una cámara de anaerobiosis.⁴⁴

La configuración de los electrodos empleada para cada estudio se puede ver en la tabla 12.

Tabla 12. Arreglo de electrodos para los estudios realizados

Estudio	Electrodo de trabajo	Electrodo de referencia (Calomel saturado)	Contraelectrodo (Alambre de platino)
Cámara anódica	Ánodo	Cámara anódica	Cámara anódica
Biopelícula	Ánodo	Cámara anódica	Cámara anódica
Anolito	Ánodo (electrodo sin biopelícula)	Cámara anódica	Cámara anódica

- Espectroscopia de impedancia electroquímica

De acuerdo a la metodología modificada de Ramasamy *et al.* (2009), se llevaron a cabo pruebas de impedancia en la cámara catódica (anolito y biopelícula), el anolito en ausencia de la biopelícula (electrodo estéril) y la biopelícula en ausencia del anolito con las probables especies redox y microorganismos suspendidos, empleando el mismo procedimiento realizado en los estudios de voltamperometría cíclica, con el propósito de observar las pérdidas ocasionadas por el anolito y la biopelícula, y su interacción en el caso de la cámara anódica. Se utilizó un arreglo de tres electrodos (tabla 12). La frecuencia fue variada de 10 kHz a 10 mHz, con una amplitud de ± 10 mV.¹⁵¹ Este intervalo de frecuencia, ha sido propuesto por Barsoukov y McDonald (2005), con el propósito de identificar procesos de transferencia de carga presentes en este tipo de sistemas biológicos. Se propuso un circuito equivalente de acuerdo a los elementos encontrados mediante el análisis de los

diagramas de Nyquist, identificando cada uno de acuerdo a lo establecido por Yuan *et al.* (2010), Orazem y Tribollet (2008) y Ramasamy *et al.* (2008). Para el análisis de datos se utilizó el software EC-Lab® (Versión 10.18).

2.6 Identificación microbiana

- Toma de muestra de la CCM

De acuerdo a la metodología de Reimers *et al.* (2007), se empleó material esterilizado, y se procedió a remover el ánodo de tela de carbón, mediante el uso de pinzas de disección. Dos secciones de 1cm^2 fueron cortadas empleando tijeras de cerámica, para las tomas de microscopia electrónica de barrido. Para los análisis de extracción de ADN se realizaron raspados del ánodo removido, empleando hojas de afeitar en el caso de las muestras tomadas del electrodo. Las muestras fueron preservadas a $-50\text{ }^\circ\text{C}$ dentro de viales, con una solución 1:1 de etanol y un buffer salino de fosfato iso-osmótico. Se tomo una muestra de 10 ml del anolito, preservadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ dentro de viales, con una solución 1:1 de etanol.³⁵

- Procesamiento de las muestras del electrodo y anolito.

Se centrifugaron alícuotas de 2 ml a 4,000 g. Se descartaron los sobrenadantes y cada pastilla se resuspendió con 5ml de agua residual sintética. Se dispensaron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.¹⁴⁷

- Extracción de ADN

De acuerdo a Alzate *et al.* (2010), el método empleado fue el siguiente:

Las paredes bacterianas se rompieron mediante choque térmico congelando y descongelando repetidas veces, al menos 3 veces por 3 min cada vez. Inmediatamente se adicionó un amortiguador Tris-HCL (pH 7.0), conteniendo EDTA (1 mM) y 2-mercaptoetanol (0.5%). Se procedió a aplicar otro choque térmico, adicionándole un amortiguador de extracción a pH 7.0.

Posteriormente el ADN fue lavado con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Posteriormente se

precipitó el ADN de dicha fase por medio de la aplicación de 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico, durante 30 min. La pastilla obtenida fue lavada con etanol al 70%, y se dejó secar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente fue resuspendida con 20 μ l de agua estéril. Se tomó una alícuota de 5 μ l y se adicionó 0.5 μ l de ARNasa libre de ADNsa (“stock” 20mg/ml) para eliminar ARN, dejándose incubar a 37°C durante 1 h. La muestra incubada se empleó para las reacciones de amplificación por PCR.

- Amplificación de fragmentos de ADNr 16S

A partir de los ADN genómicos (ADNg) obtenidos en las muestras de estudio, se amplificaron fragmentos de los genes que codifican el ARN ribosomal 16S de las regiones V1 a V5. Para ello se emplearon los cebadores V1F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y V5R (5'CCGTC AATTCCTTTGAGTTT),¹⁹⁵ los cuales amplificaron un producto de aproximadamente 880 pb. Para facilitar el manejo interno de los cebadores, los nombres fueron cambiados de los que se emplean en la literatura (27F: V1F; 907R: V5R).

La reacción se realizó en un volumen de 25 μ l: 2.5 μ l de buffer amortiguador (10x invitrogen), 0.75 μ l de MgCl₂ (1.5mM), 0.5 μ l de dNTP's (0.2mM), 1 μ l de cada cebador, 0.14 μ l de Taq polimerasa, 0.2 μ l de ADNg y agua ultra pura hasta ajustar el volumen. El programa para la reacción del PCR fue: 94 °C (5min), seguido por 30 ciclos de 94°C (40seg), 50 a 53 °C (1 min) y 72 °C (1 min), y una extensión de 10 min a 72°C. Al final, las reacciones de PCR se enfriaron a 10°C. El resultado de la amplificación fue analizada en gel de agarosa al 1% conteniendo 0.03% de bromuro de etidio. Después de la electroforesis, el gel fue visualizado y documentado en un GelDoc (Biorad).

- Reamplificación para el análisis por DGGE

Se amplificó la región hipervariable V3-V5 [aprox 600pb (586pb en E. coli)] de los ADNr 16S. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1 μ l del producto de la reacción obtenida con los cebadores V1F y V5R. Se adicionó 0.5 μ l de dNTP's (0.2 mM), 1 μ l de cada cebador, 3 μ l de MgCl₂, 2.5 μ l de amortiguador (10x invitrogen), 0.2 μ l de Taq polimerasa y agua hasta ajustar el volumen.

Las parejas de cebadores que se emplearon fueron V1F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3¹⁹⁵ y V5R 5'-CCG TCAATT CCT TTG AGT TT-3',¹⁹⁶ V3F 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCTGCTGCCTCCCG TAGG-3'¹⁹⁷ y V5R 5'-CCG TCAATT CCT TTG AGT TT-3'.¹⁹⁶

El programa para la reacción de PCR “touchdown” fue: 94°C durante 5 minutos (desnaturalización), seguido por 10 ciclos de 94°C (1 minuto), con “touchdown” disminuyendo 1°C cada ciclo, de 65°C a 55°C (1 minuto cada vez) y extensión de 72°C durante 1 minuto, seguido por 20 ciclos de 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto) 72°C (1 minuto), y al final 10 minutos de extensión a 72°C, y posteriormente enfriado a 10°C.¹⁵²

El resultado de la amplificación fue analizada en gel de agarosa al 1% conteniendo 0.03% de bromuro de etidio. Después de la electroforesis, el gel fue visualizado y documentado en un GelDoc (Biorad).

- DGGE: Análisis de los fragmentos del ADNr 16s.

Se empleó un gel de 6% de poliacrilamida, para los amplicones V3F y V5R, con un gradiente de desnaturalización del 30 al 70%. La resolución de los amplicones se realizó a 60°C y a 6V durante 16-18h. Se empleó un amortiguador TAE 1X. Al final el gel fue teñido durante 30 min en una solución 0.1% de SyBRGreen. El resultado fue visualizado y documentado en GelDoc (Biorad).¹⁵²

Las bandas más abundantes fueron cortadas del gel, eluidas y reamplificadas empleando los cebadores respectivos usados para la reamplificación por nested. Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

- Análisis bioinformático

Las secuencias fueron analizadas por medio de BLASTx y tBLASTx¹⁹⁷ en la base de datos del banco de genes (“GenBank”) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); también se analizaron empleando la herramienta de clasificación del “Ribosomal DataBase Project, RDP”.¹⁵³ Las secuencias con mayor homología fueron obtenidas de la base de datos del RDP^{154,155} y/o del “GenBank”.

2.7 Análisis de microscopía

Se tomó una muestra por medio de la disección de 1cm^2 del ánodo, como se mencionó anteriormente. Las muestras se fijaron en una solución de 2.5% de glutaraldehído de 24 a 48 hrs.⁸³ De acuerdo a Bretschger (2008), se llevó a cabo una deshidratación por medio de la aplicación de etanol a diferentes concentraciones, de la siguiente manera:

10% EtOH (durante 30 min)

25% EtOH (durante 30 min)

50% EtOH (durante 30 min)

75% EtOH (durante 30 min)

95% EtOH (durante 30 min)

100% EtOH (2 veces por 30 min)

Posteriormente las muestras fueron tratadas con un baño controlado de oro, para hacerlas conductivas y después se procedió a llevarlas al microscopio electrónico para su análisis. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de presión variable marca Jeol, modelo JSM-6360 LV.¹⁴⁰

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Densidades de corriente y de potencia, potencial a circuito abierto y pH

Como se observa en la figura 24, se presentó una diferencia en cuanto a la densidad de corriente y potencia obtenida a las 9 semanas, alcanzando una máxima de 210.88 mA/m^2 y 15.32 W/m^2 respectivamente; posteriormente a las 11 semanas se observó un incremento en la densidad de potencia por 22.58 W/m^2 , y un decremento de 7.27 mA/m^2 en la densidad de corriente; este periodo es el que se definió como la segunda fase de análisis. A las quince semanas se observó un incremento en la densidad de potencia de 2.90 W/m^2 y un decremento significativo en la densidad de corriente de 12.10 mA/m^2 ; se seleccionó esta etapa como la tercera fase de estudio. A las 20 semanas se presentó un incremento significativo en la densidad de corriente por 155.49 mA/m^2 , y 27.48 W/m^2 en la densidad de potencia; este correspondió a la cuarta y última fase de análisis del presente estudio. La disminución de la densidad de corriente en las fases II y III, pueden atribuirse a la disminución del potencial a circuito abierto (PCA), con respecto a las fases I y IV (figura 24). Este tipo de tendencia se observó también en los estudios realizados por Mohan *et al.* (2009) quienes observaron un incremento en la densidad de corriente hasta alcanzar un máximo de 1220.7 mA/m^2 , paralelamente al incremento del PCA de 260 a 578 mV.

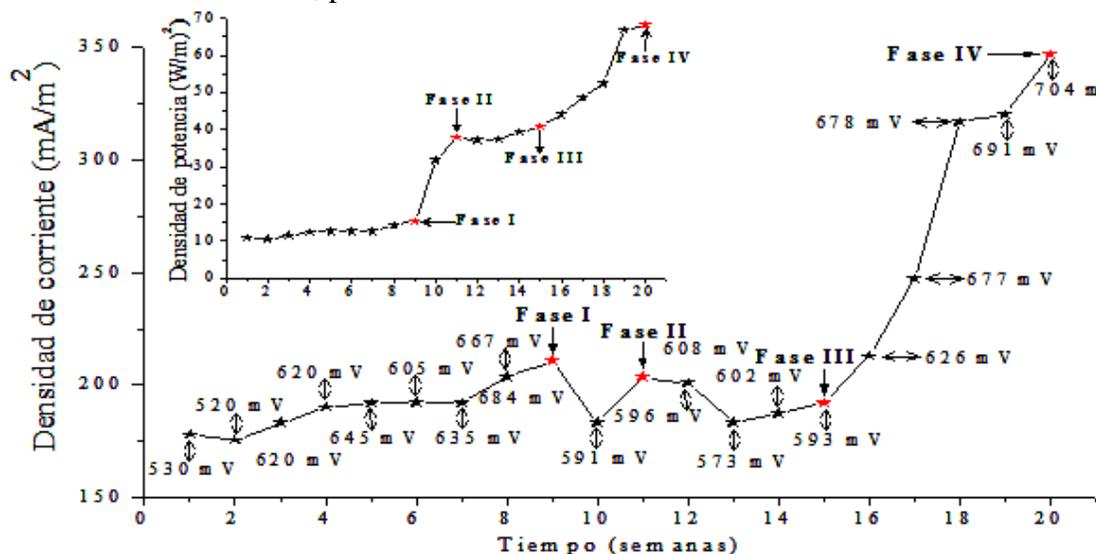


Figura 24. Densidades de corriente y de potencia máximas, y potenciales de circuito abierto (\leftrightarrow) obtenidos semanalmente.

La tendencia hacia el aumento en las densidades de potencia en función con el aumento del PCA (figura 24), se ha observado con anterioridad en estudios realizados por Zhang *et al.* (2011), quienes observaron un incremento en las densidades de potencia (0.95–0.12 W/m² y 0.18–0.24 W/m²) cuando los PCAs incrementaron (232-284 mV y 311-339 mV).

La densidad máxima de potencia alcanzada en el presente estudio (68.28 W/m², con una R_{ext} de 1204 Ω) supera los valores reportados en la literatura que se encuentran en un intervalo de 0.11 a 1.33 W/m², en los casos de CCMs sin catalizador en el cátodo,¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ mientras que las densidades de corrientes alcanzadas (figura 24) se encuentran dentro de las reportadas dentro del intervalo de 0.55 mA/m² -538 mA/m² para CCMs sin catalizador en el cátodo.^{45, 167-170} La máxima densidad de corriente obtenidas en las cuatro fases de estudio, se obtuvieron con una R_{ext} de 382 Ω, dicho comportamiento se observado con anterioridad en los experimentos realizados por Jung y Reagan (2011) quienes atribuyen la generación de una máxima densidad de corriente (2484.5 mA/m²) al implemento de una R_{ext} baja (150 Ω) la cual permite un flujo mayor de corriente, en comparación con la implementación de una R_{ext} alta (9,800 Ω), la cual presentó una densidad de corriente menor por 244 mA/m².

Los potenciales medidos a circuito abierto en la CCM (figura 24) completa alcanzaron valores promedio de 615.08 mV en la fase I, 604.75 mV en la fase II, 616.82 mV en la fase III y 654.03 mV en la fase IV. Los valores promedio de pH anódico fueron de 6.93 en la fase I, 6.97 en la fase II, 6.97 en la fase II y 7.16 en la Fase IV, manteniéndose un pH cercano a neutro a lo largo de la experimentación. En el caso del cátodo los pHs medidos fueron de 5.52, 5.78, 5.65 y 6.21 en las fases I, II, III y IV respectivamente, manteniéndose un pH relativamente alcalino a lo largo de las fases de estudio. Respecto a CCM tipo PEM sin catalizador en el cátodo, los PCA obtenidos en el presente estudio se encuentran por arriba de lo reportado por Mohan *et al.* (2008), quienes observaron un PCA máximo de 297 mV en CCM con manteniendo un pH anódico y catódico de 6, y un PCA máximo de 226 mV a un pH anódico y catódico de 7 (empleando un inóculo misto y acetato como fuente de carbono) También supera los PCA presentados en los experimentos de Biffinger *et al.* (2008), quienes empleando *Shewanella oneidensis*

MR-1 y acetato como fuente donadora de carbono obtuvieron PCAs máximos de 530 mV a un pH de 6, 470 mV a un pH de 7 y 450 mV a un pH de 5. El presente estudio presentó un PCA máximo (704 mV) cercano a los resultados reportados por Liu *et al.* (2011), quienes presentan un PCA de 695 mV a un pH de 6.9, con una CCM tipo PEM y un cátodo con Pt (0.5 mg/cm^2) como catalizador.

3.2 Demanda química de oxígeno

La DQO removida en las diferentes fases fueron: fase I-93%; fase II-90%; fase III-84.6% y fase IV-86.5%. Estos superan la máxima DQO reportada (62.86%) en el caso de Mohan *et al.* (2010), quienes emplearon una CCM tipo PEM con cátodo aireado sin catalizador y residuos vegetales como fuente de carbono. También se encuentran por arriba del 84% reportado por Bakhshian *et al.* (2011) quienes emplearon lacasa como catalizador en el cátodo y molasas como fuente de carbono. La DQO máxima alcanzada en el presente estudio (93%) se encuentra cercana a la máxima (98.1%) reportada por Martin *et al.* (2010), quienes utilizaron una CCM de una sola cama y cátodo aireado con 0.5 mg/cm^2 de Pt como catalizador, y acetato como fuente de carbono. El decremento de la DQO en las fases III y IV, puede ser debido a que el desarrollo de la biopelícula en el electrodo sumado al incremento de los microorganismos suspendidos (en el anolito), como se ha observado en los estudios realizados por Biffinger *et al.* (2009), promueva el incremento de la carga orgánica y disminuya la DQO en el tiempo.

3.3 Eficiencia coulombica, AGVs y porcentaje de CH_4 e H_2

Se encontraron concentraciones de 0.01 mM para el ácido butírico y 0.003 mM para el ácido propiónico en las fases I, II, III y IV (figura 25), en el caso del ácido acético fue de 0.0012 mM en la fase I, 0.0002 mM en la fase II, 0.0056 mM en la fase III y 0.0009 mM en la fase IV (figura 24). Dichos valores son despreciables si se considera la concentración de acetato inicial empleada en el presente estudio (73.14 mM), por lo cual se descartó la influencia de pérdidas en la EC por generación de productos metanogénicos.¹⁶⁵ La variación del ácido acético en las cuatro fases, puede ser debido a la facilidad con la que este es aprovechado por los microorganismos exoelectrogénicos, tal y como se observa en los estudios realizados por Ok *et al.* (2010) quienes obtuvieron concentraciones menores a

0.2 mg/L de ácido acético, en presencia de hasta 0.8 mg/L de ácido butírico y mayor a 0.8 mg/L de ácido propiónico. Así mismo, las cantidades de H₂ y CH₄ de las muestras analizadas para cada una de las 4 fases, fueron despreciables (valores menores a 0.01 %, en todas las fases de estudio). Dichos resultados son menores a los reportados por Jung y Reagan (2011), en una CCM tipo PEM con catalizador de Pt en el cátodo (0.35 mg/cm²) y acetato como fuente de carbono, quienes encontraron un 6% de H₂ y CH₄ a una eficiencia coulombica 6.4% mayor respecto a la máxima obtenida en el presente estudio (60.6%).

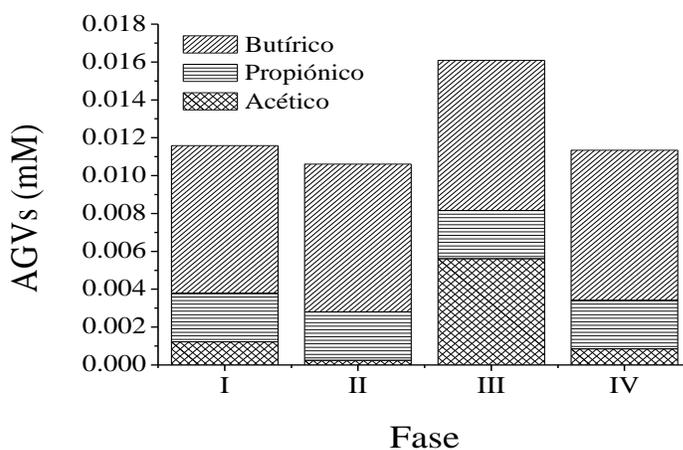


Figura 25. Concentración de ácidos grasos volátiles (butírico, propiónico y acético) presentes en cada una de las cuatro fases de análisis.

3.4 Voltametría cíclica

Blanco

Los voltamperogramas obtenidos del blanco presentaron 2 picos de reducción como se muestra en la figura 26, estos no se encontraron en las pruebas realizadas a la cámara anódica (anolito y biopelícula), anolito o biopelícula durante las cuatro fases de estudio, con ello se descartan posibles interferencias en los resultados por reacciones de oxidación o reducción de algún material componente de la CCM al entrar en contacto con los amortiguadores empleados dentro de la misma.¹⁸⁹

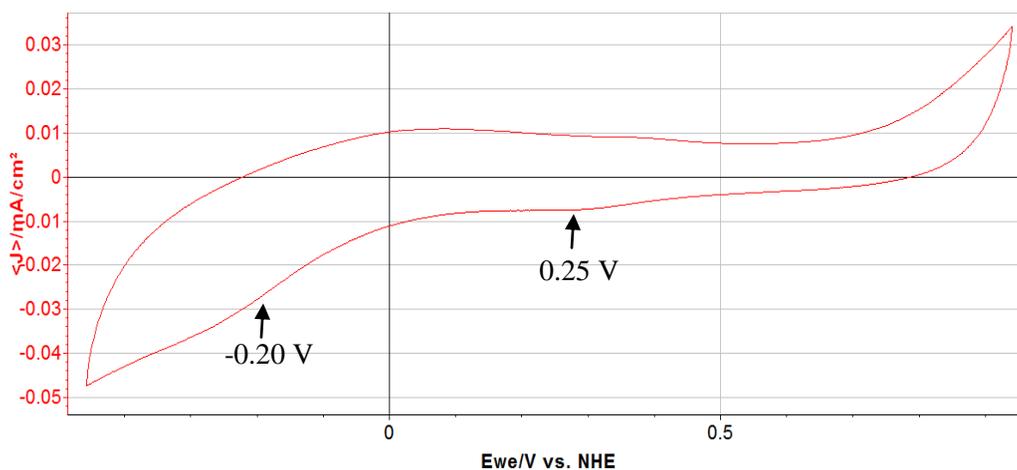


Figura 26. Voltamperograma del blanco CCM. J: densidad de corriente, Ewe: potencial en volts. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

Las posibles reacciones identificadas en cada una de las pruebas que se presentan a continuación, se explican mediante una revisión bibliográfica de picos de reacción obtenidos a potenciales similares vs NHE y a un pH de 7. Debido a que la finalidad de la aplicación de la VC en este estudio no fue la identificación del proceso de oxidación del acetato, si no identificar la presencia de mecanismos de transferencia de electrones y las probables reacciones involucradas, las pruebas se realizaron en cada una de las cuatro fases cada 24 h, antes de su alimentación tipo batch para eliminar la influencia de dicho factor en las pruebas. Este tipo de pruebas ya se han realizado con anterioridad en los estudios realizados por Marsili *et al.* (2008).

Cámara anódica (anolito y biopelícula)

En las figuras 27 y 28 se puede observar la evolución de los voltamperogramas a lo largo de las fases de análisis. El pico de oxidación en la fase I, ha sido previamente observado por Tsujimura *et al.* (2002) realizando un análisis de los mecanismos de transferencia directa de electrones empleados por *Myrothecium verrucaria*, inmovilizando la enzima diaforasa, uno de los sitios asociados a dicha enzima (T1) reportó un pico de oxidación a 0.42 V, al igual que el observado en el presente estudio. El pico presentado en la fase II a 0.42 V, ha sido previamente reportado por Madigan y Martinko (2006) en el caso de la actividad de citocromos aa₃ en *Paracoccus denitrificans*.¹⁸³ Esto puede ser un indicio de la posible aparición de dicho género microbiano a lo largo de las fases de

estudio, expresando una actividad electroquímica por citocromos aa₃. El pico a 0.12 V en la fase IV ha sido previamente reportado por Bernhardt e Inestrosa (2008) en el caso de los citocromos b² Fe³⁺/Fe²⁺.

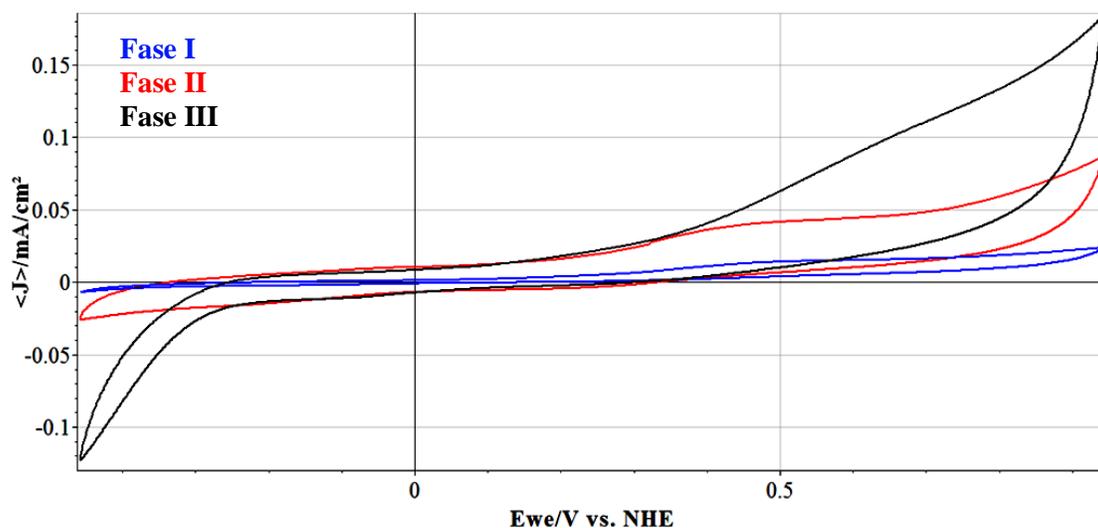


Figura 27. Voltamperograma cámara anódica: Fase I, II y III. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

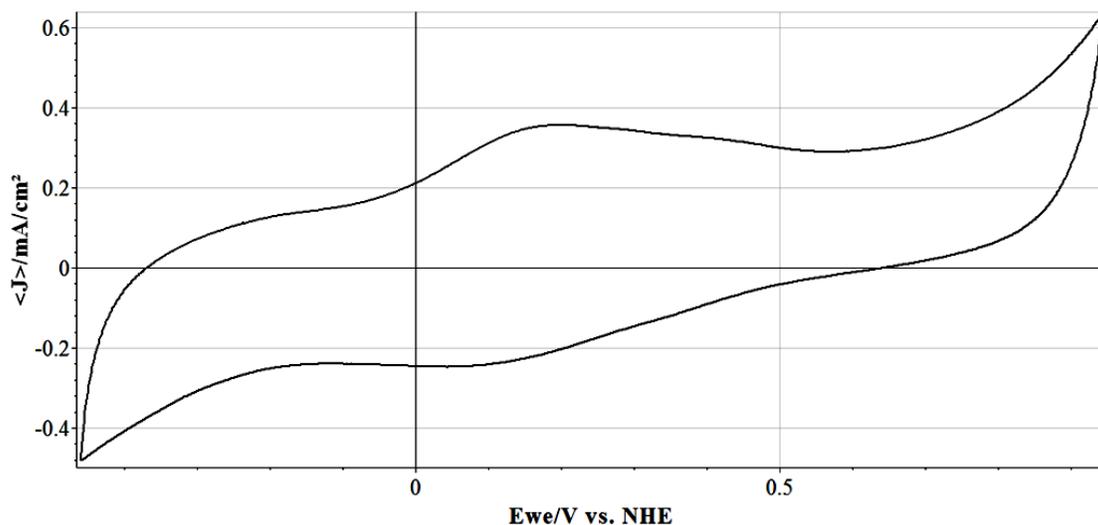


Figura 28. Voltamperograma cámara anódica: Fase IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

Biopelícula

La fase I no presenta actividad alguna dentro de la biopelícula en ausencia de las especies redox identificadas en el anolito. Sin embargo, se empieza a presentar actividad a partir de la fase II y III con la presencia de pequeños picos de oxidación (figura 29).

Nuevamente se muestra una mayor actividad en la fase IV (figura 30) donde se pueden observar claramente tanto un pico de oxidación como un pico de reducción a diferentes potenciales. En la fase II y IV se presenta un pico de oxidación (0.23 V) el cual probablemente se deba a la acción de ferrocitocromo c (Fe^{2+}), el cual ha sido reportado por Garret y Griaaham (2010) a un potencial de 0.23 V. El pico de reducción a -0.14 V (figura 30) ha sido reportado por la actividad de Plastoquinona en los estudios realizados por Shibamoto *et al.* (2009), quienes analizaron el transporte de electrones hacia los citocromos b en *Thermosynechococcus*, mediante este pigmento en los procesos de fotosíntesis anaeróbica. En la fase III nuevamente se presentó el mismo pico de oxidación (0.12 V) que en la fase IV en la VC de la media celda. Como se discutió con anterioridad dicha actividad electroquímica ha sido reportada por Bernhardt e Inestrosa (2008) en el caso de los citocromos $\text{b}^2 \text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$.

Se observaron picos de reducción similares en las fases III y IV (0.001 V y 0.006 V respectivamente), los cuales se encuentran dentro del intervalo de 0.001 a 0.09 V, señalado por Garrett y Grisham (2010) en el caso del [FAD] que participa en la transferencia de electrones como mediador redox soluble.

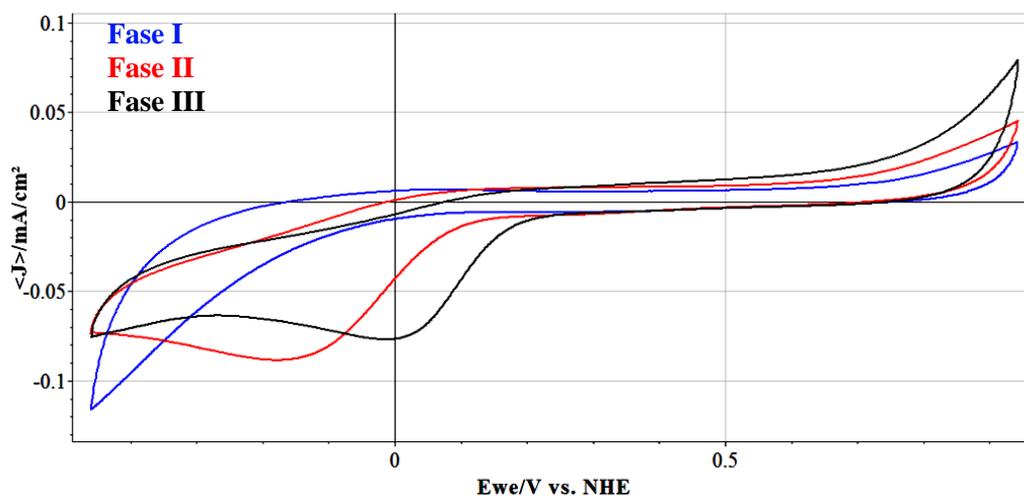


Figura 29. Voltamperograma biopelícula: Fase I, II, III y IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

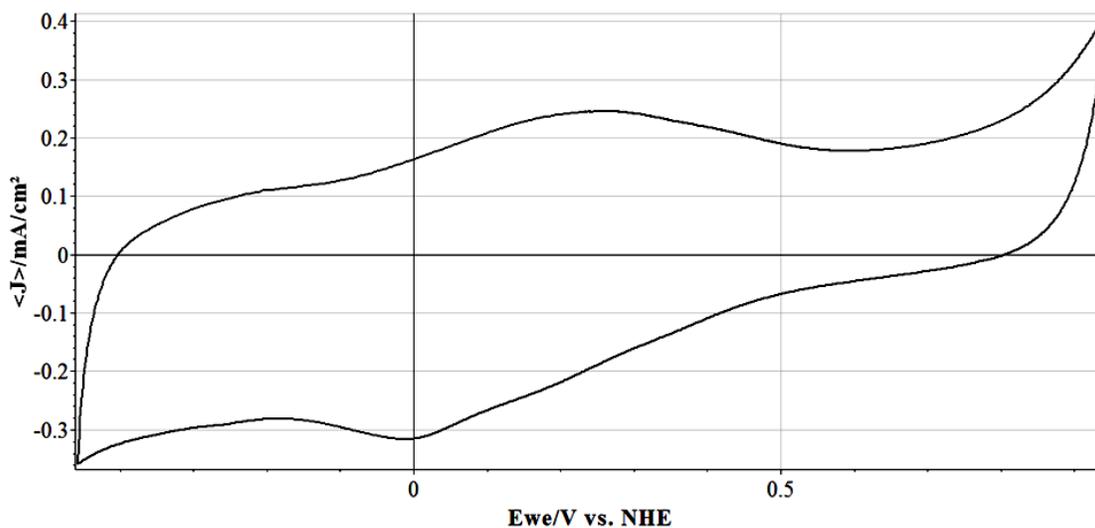


Figura 30. Voltamperograma biopelícula: Fase IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

Anolito

La actividad electroquímica de oxidación, presentada en el anolito en la fase I y fase II puede estar asociada con la presencia de Ferrocitocromo f (Fe^{2+}), el cual ha sido reportado por Garret y Griaaham (2010) a un potencial de 0.36 V. El pico de reducción a -0.22 V observado en la fase I (figura 31) se encuentra reportado en la literatura debido a tres especies redox diferentes. Garret y Grisham (2010) atribuyen dicho potencial al FAD como coenzima libre, esta puede actuar como mecanismo de transferencia indirecta de electrones del anolito al electrodo. Rodríguez-Manzaneque (2002) plantea dicho potencial el caso de glutaredoxinas, observándolas en *Saccharomyces cerevisiae* bajo estrés en presencia de etanol; dichas enzimas intervienen en reacciones redox con la finalidad de proteger las células contra estrés oxidativo, manteniendo el estado redox del grupo sulfidrilo de las proteínas celulares.¹⁷⁷ Richter *et al.* (2009) también a encontrado este potencial por la actividad de nanocables, en los estudios realizados sobre los mecanismos de transferencia extracelular de electrones en una cepa de *Geobacter sulfurreducens*.

En la fase II se encontró un pico de reducción a 0.26 V, dicho potencial ha sido observado en los estudios realizados por Widdowson y Anthony (1975), por la actividad de citocromos c, mediante un estudio realizado sobre la cadena transportadora de electrones en

Pseudomonas AM1. Se observó actividad electroquímica en el anolito de la fase III y IV (figura 31) presento picos de oxidación similares (0.52 y 0.50 respectivamente), dicha actividad no ha sido reportada en la literatura.

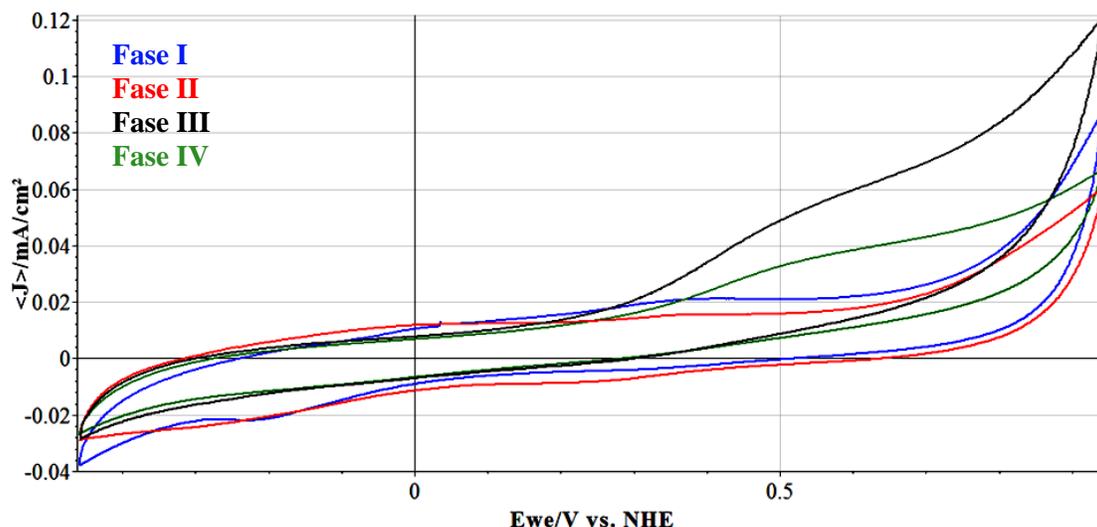


Figura 31. Voltamperograma anolito: Fase I, II, III y IV. A 10 mV/s, con intervalo de potencial de -0.5 a 0.9 V vs NHE.

En el anexo 1 se puede ver un resumen (tabla 17) de los picos de reacción observados en el presente estudio y sus probables reacciones.

3.5 Impedancia

Se obtuvo la resistencia óhmica (R_{Ω}), la resistencia por transferencia de carga (R_{TC}) y la resistencia por difusión (R_D) por medio del procesamiento de los resultados experimentales obtenidos mediante el software EC-Lab®, empleando el siguiente circuito equivalente.

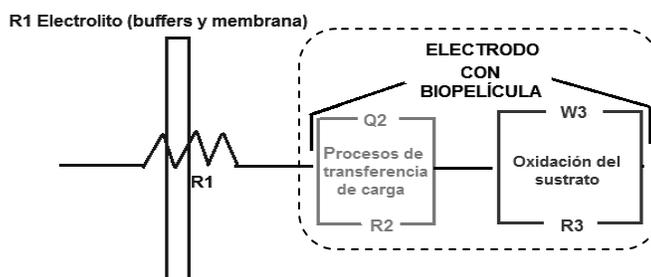


Figura 32. Circuito equivalente propuesto para el análisis de impedancia en las pruebas experimentales de cámara anódica, biopelícula y anolito. R1: resistencia óhmica. R2: resistencia por transferencia de carga. R3: resistencia por procesos de difusión. Q2: elemento de fase constante. W3: elemento de warburg.

3.5.1 Selección de elementos del circuito equivalente.

Para la selección de los elementos del circuito equivalente, se emplearon los diagramas de Nyquist (figuras 35, 37 y 39) obtenidos en cada una de las pruebas realizadas a la cámara anódica (anolito y biopelícula), anolito y biopelícula dentro de las cuatro fases de estudio. El primer elemento del circuito equivalente propuesto es una resistencia (R1), a la cual se le atribuyen las pérdidas ocasionadas por el electrolito, y se localiza en el primer punto experimental obtenido en los diagramas de Nyquist (figuras 35, 37 y 39) a una frecuencia de 100,000 Hz. Dicha resistencia también ha sido planteada por Yuan *et al.* (2010) al inicio de los diagramas de Nyquist y se le atribuyen las pérdidas ocasionadas por el electrolito y la membrana, en el caso de las celdas de combustible tipo PEM. En CCM dicha resistencia se ha utilizado como parte de los circuitos equivalentes en los estudios realizados por He *et al.* (2008), Manohar *et al.* (2008)²⁰⁹ y Ramasamy *et al.* (2008 y 2009)

Los diagramas experimentales de Nyquist (figuras 35, 37 y 39) muestran una depresión en el semicírculo generado de frecuencias altas a medias (100,000 -100 Hz)¹⁸⁹. Este “achataamiento” del semicírculo se ha observado en otros estudios de impedancia realizados por Ouitrakul *et al.* (2007), He *et al.* (2006) y Ramasamy *et al.* (2008 y 2009); quienes lo han asociado a la presencia de un elemento de fase constante (CPE, por sus siglas en inglés). Yuan *et al.* (2010), atribuye la presencia de un CPE, debido a la porosidad o rugosidad de los electrodos. De acuerdo a Yuan *et al.* (2010), se corroboró la presencia de dicho CPE de acuerdo al valor de α , calculada por el software EC-Lab® (Versión 10.18). Si el CPE es capacitivo, entonces $\alpha > 0.5$, o por el contrario si este es resistivo, entonces $\alpha < 0.5$. En el caso de presentarse un α igual a -1 o 1, se descarta la presencia de un CPE y se plantea la presencia de un capacitor.¹⁹¹ En el presente estudio, en todos los casos el alfa calculada fue de 0.8 a 0.9. Al no encontrarse una α igual a 1 o -1, se corroboró la presencia de un CPE y se descartó la posibilidad de la presencia de un capacitor puro en el presente estudio. En paralelo a este elemento se planteó una resistencia (R2) correspondiente a las pérdidas ocasionadas por procesos de transferencia de carga en el electrodo. Esta resistencia ha sido anteriormente planteada en paralelo al CPE por Ramasamy *et al.* (2008),

quien presenta diagramas de Nyquist similares a los observados en el presente estudio (figuras 35, 37 y 39).

Asimismo, se planteó la presencia de un elemento de warburg a bajas frecuencias (1-0.01 Hz), debido a problemas de difusión.¹⁵¹ En el presente estudio, dicho elemento se observa (figuras 35, 37 y 39) a partir de la frecuencia de 1 Hz hasta las más bajas analizadas en el presente estudio (de 0.1 a 0.01 Hz), de manera similar estudios realizados por Ramasamy *et al.* (2008) presentan este elemento. Yuan *et al.* (2010) y Orazem y Tribollet (2008), plantean la presencia de dicho elemento de forma gráfica en el diagrama de Nyquist, como una “línea” con una inclinación que llega a formar un ángulo de 45° respecto al eje de la parte real de la impedancia (Z_{real}), lo cual puede observarse en las figuras 34, 36 y 38 de los diagramas de Nyquist correspondientes a los estudios realizados a la cámara anódica, biopelícula y anolito. Paralelo a este elemento se plantea una tercera resistencia (R_3) correspondiente a las pérdidas ocasionadas por procesos de difusión del sustrato en la CCM, esta se encuentra dentro de las mismas bajas frecuencias que el elemento de warburg y se plantea a frecuencias similares (1- 0.01 Hz) a las observadas por Ramasamy *et al.* (2009) quienes plantean dicha resistencia a frecuencias de 1 a 0.01 Hz, y le atribuyen a la misma las pérdidas ocasionadas por procesos de difusión debidos a la oxidación lenta del sustrato, este tipo de resistencia también ha sido observada previamente por He *et al.* (2008) y Manohar *et al.* (2008).²⁰⁹

3.5.2 Representaciones gráficas (Nyquist y Bode) y ajuste de datos al circuito equivalente

Las pérdidas del sistema anteriormente detalladas, pueden ser vistas de forma gráfica en los siguientes diagramas de Nyquist y Bode, agrupando las fases de estudio con base en los datos obtenidos para el análisis de cámara anódica, biopelícula y anolito. Se marcan tres frecuencias características (como se mencionaron con anterioridad) a partir de las cuales se pueden observar las pérdidas de R_{Ω} (100000 Hz), R_{TC} (100000-100 Hz) y R_D (100 a 10 ó 1 Hz).¹⁸⁸ Representándose, en cada caso, con “●” los datos experimentales y con “x” los datos obtenidos por el ajuste de los mismos de acuerdo al circuito equivalente

anteriormente planteado. A continuación se presentan los resultados obtenidos del blanco, media celda, biopelícula y anolito.

- Blanco

De acuerdo a Ramasamy *et al.* (2009), se tomó como resultados del blanco a la impedancia realizada a la media celda de la CCM sin microorganismos, con la finalidad de comparar y observar la magnitud de las pérdidas ocasionadas en la cámara anódica inoculada, la biopelícula y el anolito.

De manera gráfica podemos observar en la figura 33 que los componentes de la CCM (membrana, cámaras de acrílico, electrodo, etc) y su interacción con los buffers de fosfato de sodio, presentan pérdidas óhmicas (frecuencia de 100000 Hz), de transferencia de carga (100 Hz) y de difusión (1 Hz).

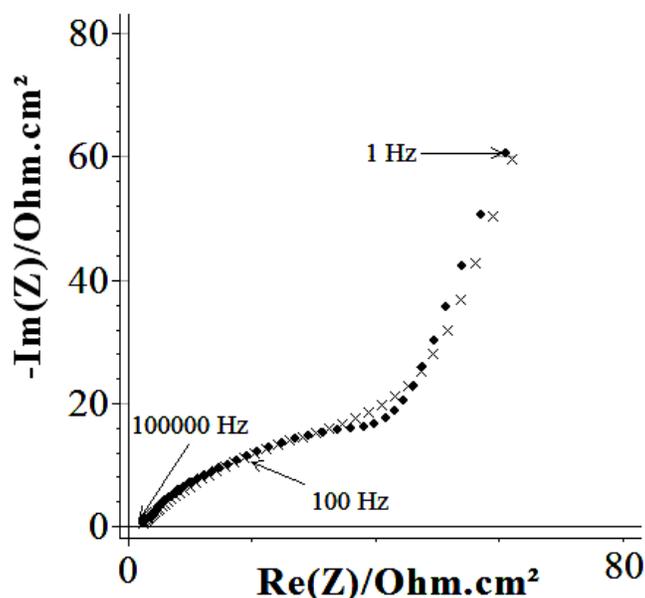


Figura 33. Diagrama de Nyquist del blanco, media celda. $-Im(Z)$: impedancia parte imaginaria. $Re(Z)$: impedancia parte real.

En cuanto a los diagramas de bode, las pruebas realizadas al blanco presentaron un ángulo de fase, de acuerdo al ajuste, máximo de 56° (figura 34), mientras que las pruebas realizadas en cada uno de los estudios elaborados para las cuatro fases de análisis, reportaron un ángulo de fase máximo de 70° (figuras: 35, 37 y 39), siendo el blanco quien presentó un comportamiento más resistivo respecto a las CCM de prueba. Dichos

resultados resultan similares a lo reportado por Ramasamy *et al.* (2009) quienes presentan un ángulo de fase máximo de 20° en el caso del blanco, y un máximo de 40° respecto a los resultados de la cámara anódica; presentando de igual forma el blanco un comportamiento más resistivo en comparación con los datos experimentales obtenidos de la cámara anódica inoculada.¹⁸⁷

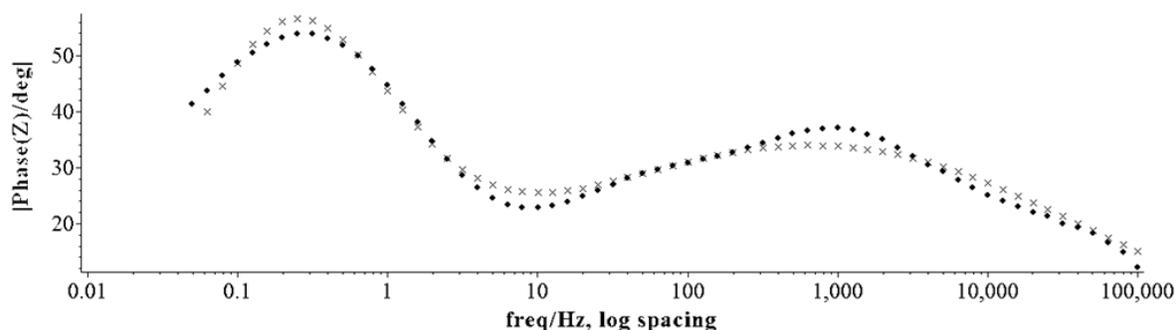


Figura 34. Diagrama de Bode: blanco. Phase (Z) deg: Ángulo de fase en $^\circ$. Freq/Hz, log spacing: Logaritmo de la frecuencia en Hz.

- Cámara anódica

Hubo un incremento de la R_Ω en la fase IV ($4.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (figura 35 D), siendo la fase III la que menor R_Ω presentó ($2.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (figura 35 C). Las pérdidas debido a procesos de en la transferencia de carga y de difusión, disminuyen a lo largo de las cuatro fases de estudio, esto nos permite ver más de cerca el semicírculo y el inicio del elemento de warburg (figura 35). Dicha tendencia probablemente se deba al incremento de mediadores redox a lo largo de las fases de estudio, acelerado los procesos de transferencia de carga y de oxidación del sustrato. No se ha reportado dicha tendencia en la literatura debido a que los estudios de impedancia realizados a la cámara anódica, no se han llevado a cabo para la realización del análisis de las pérdidas en el tiempo, realizando pruebas únicamente en un punto a lo largo de la experimentación cuando se obtenían densidades de corriente o potencia máximas. Al respecto este tipo de estudios con las R_Ω más bajas reportadas en el caso de CCM tipo PEM, Borole *et al.* (2010) reportaron una R_Ω de 3Ω a los 3 meses de operación en una CCM tipo PEM (Nafión 117 ®) con cátodo aireado, mientras que Ramasamy *et al.* (2009) obtuvieron una R_Ω de 2Ω a las 500 h de operación en una CCM

tipo PEM (filtro de policarbonato Millipore®). En comparativa el presente estudio mostró resultados comparables en cuanto a las R_{Ω} obtenidas respecto a las R_{Ω} más bajas reportadas en CCM tipo PEM.

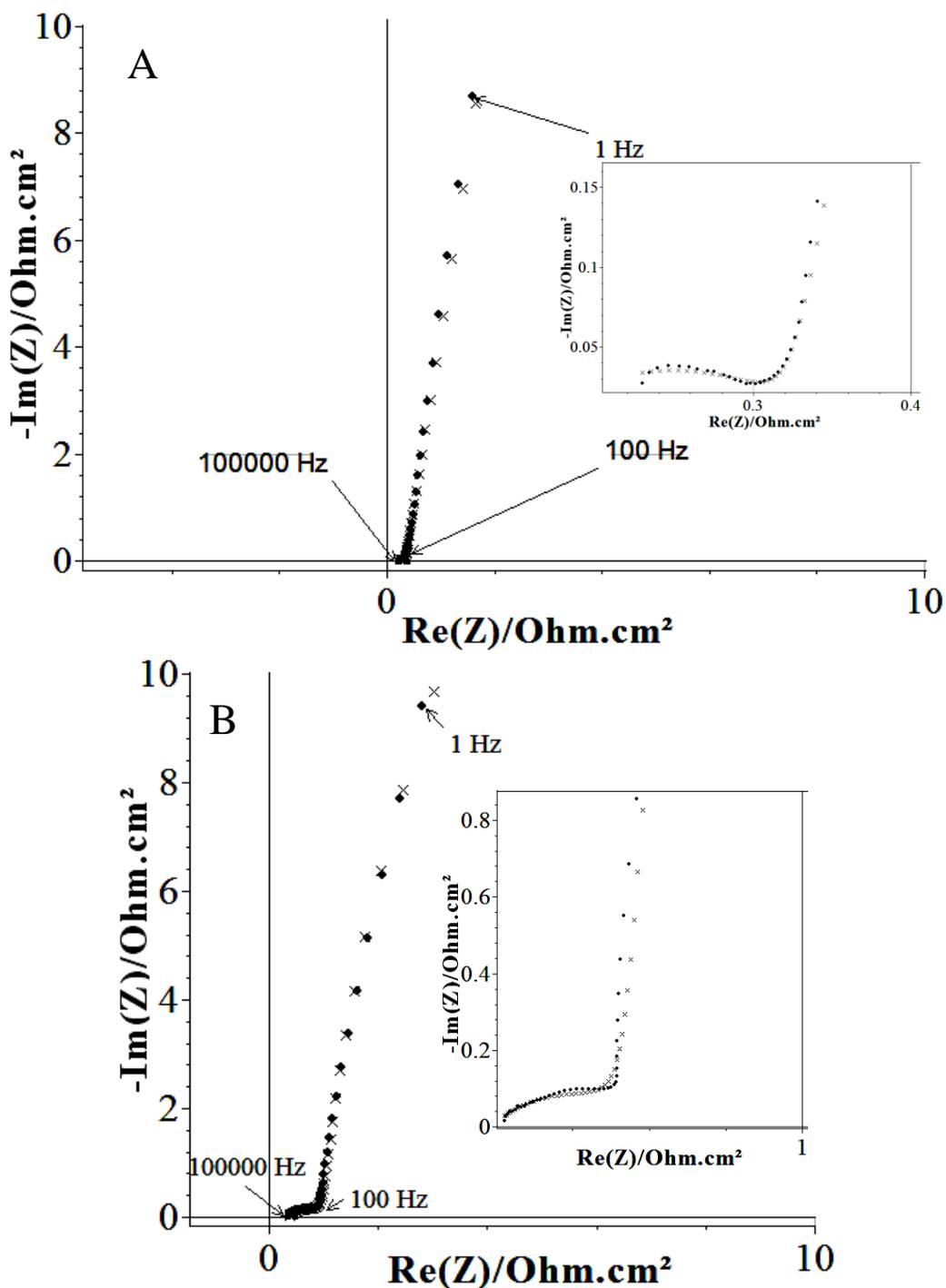
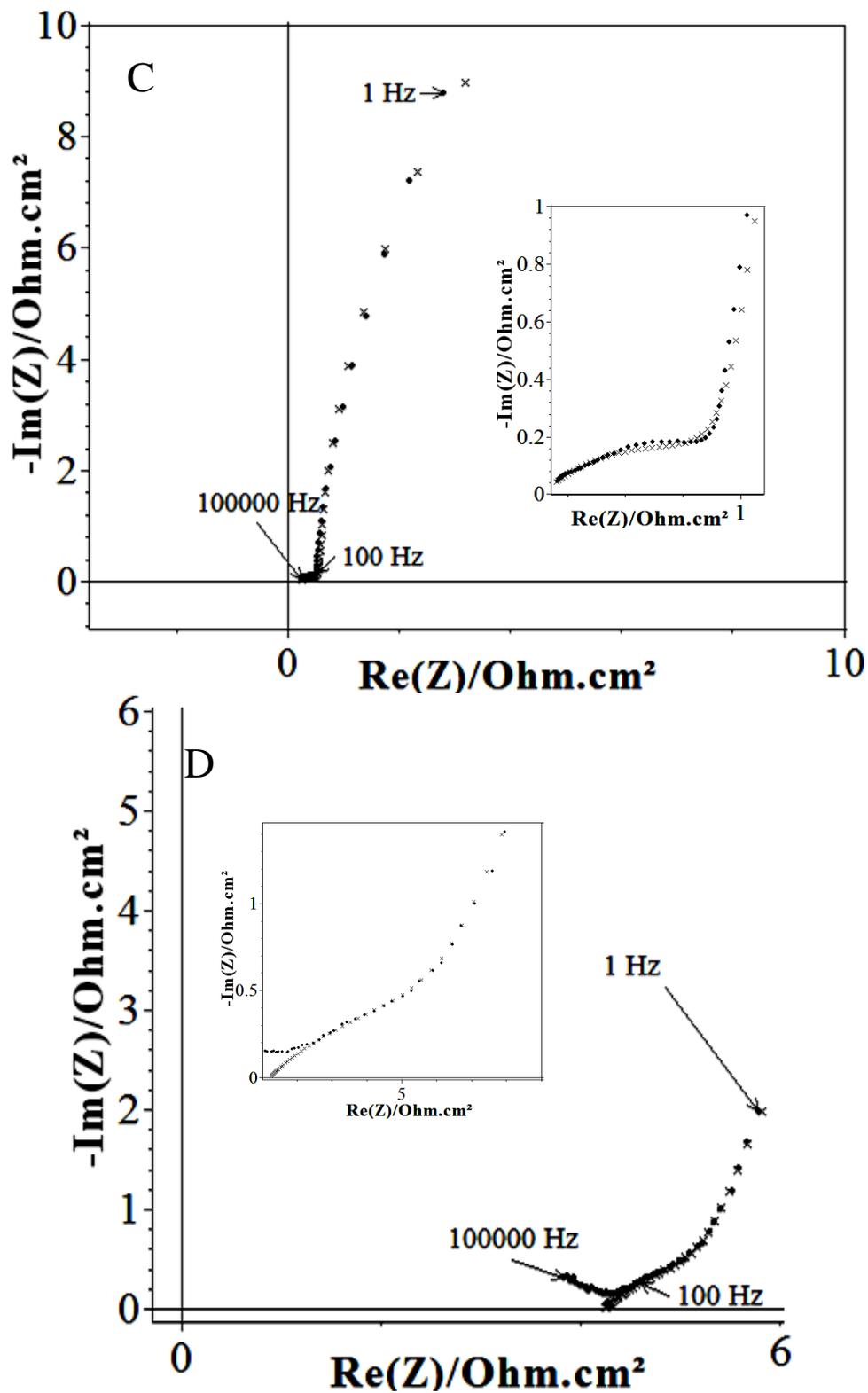


Figura 35. Diagrama de Nyquist cámara anódica (A: fase I y B: fase II).



Continuación figura 35. Diagrama de Nyquist cámara anódica (C: fase III y D: fase IV).

En cuanto a los diagramas de bode, las pruebas realizadas en media celda presentaron un ángulo de fase máximo de 76° (figura 36 A) similar a los casos de las fases II y III (figura 36 B y C), mostrando un comportamiento menos resistivo en comparación con la última fase de estudio que presentó un ángulo de fase de 57° (figura 36 D). Dicho comportamiento resistivo resulta similar en los casos de los estudios realizados por Ramasamy *et al.* (2009), quienes obtuvieron un ángulo de fase máximo aproximado de 38° , a diferencia de otros estudios con CCM tipo PEM que reportaron elementos capacitivos al observarse a un ángulo de fase de 90° , como en el caso de Manohar *et al.* (2008).

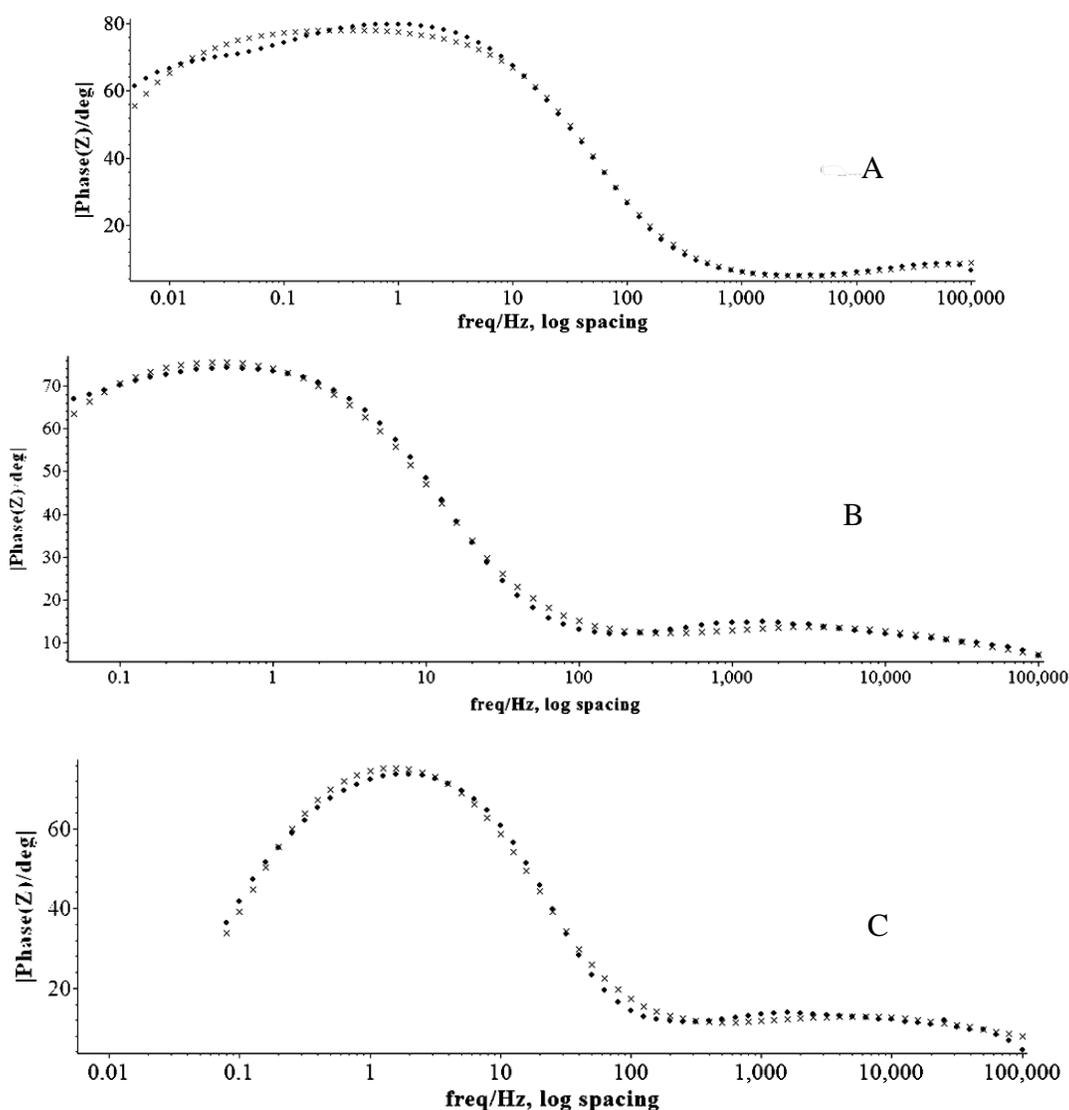
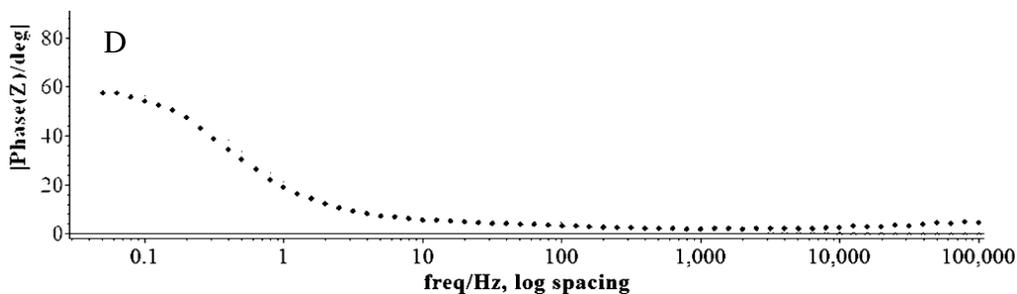


Figura 36. Diagrama de Bode media celda (A: fase I, B: fase II y C: fase III).



Continuación figura 36. Diagrama de Bode media celda (D: fase IV).

- Biopelícula

Los resultados obtenidos del análisis de la biopelícula con el remplazo del anolito por ARS, ocasionaron una variación en cuanto a las R_{Ω} reportadas, presentándose un incremento de $0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Con ello se puede decir que la variación de la R_{Ω} en media celda se encuentra directamente relacionada con el incremento en el tiempo de microorganismos en el electrodo.

Se presentó una disminución aparente, ya que a pesar de que en la fase I se reporta una R_{TC} de $2739 \Omega \cdot \text{cm}^2$, y esta disminuye a $143.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en la fase II, a partir de la fase III hay un aumento de $259.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$, esto puede observarse de manera gráfica en los diagramas de Nyquist (figura 37) donde se aprecia el incremento o disminución la resistencia en la parte real, dentro del marco de las 3 frecuencias características de 100,000, 100 y 1-10 Hz. Las variaciones en cuanto a las RD reportadas con anterioridad, se pueden observar en la figura 37, donde se hace evidente la predominancia de las pérdidas ocasionadas mayormente por procesos de difusión en el caso de las fases I y III. No se encuentran resultados similares o comparables en la literatura, dado a que este tipo de análisis de la biopelícula, al igual que en el caso del anolito, no se han llevado a cabo.

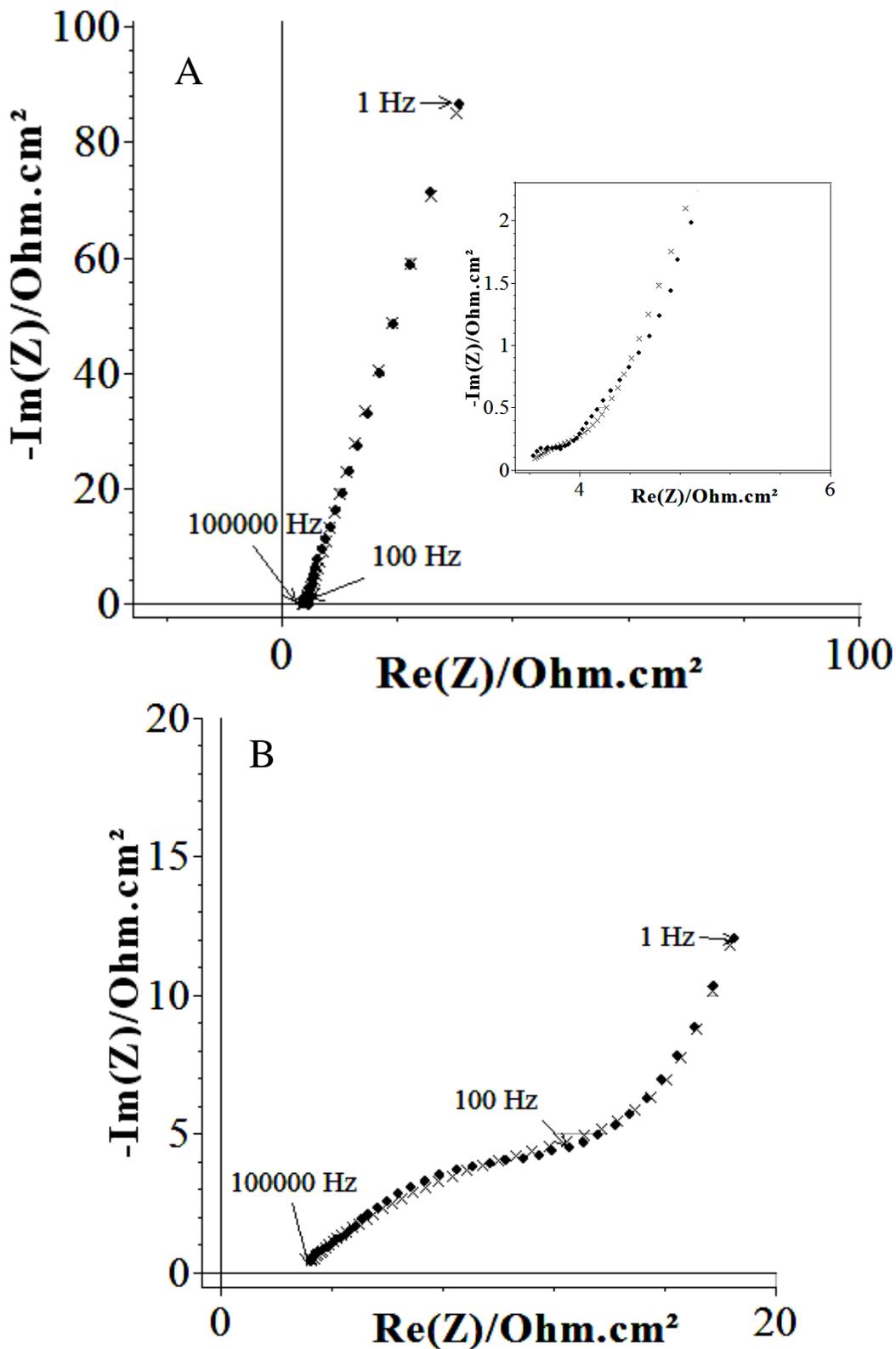
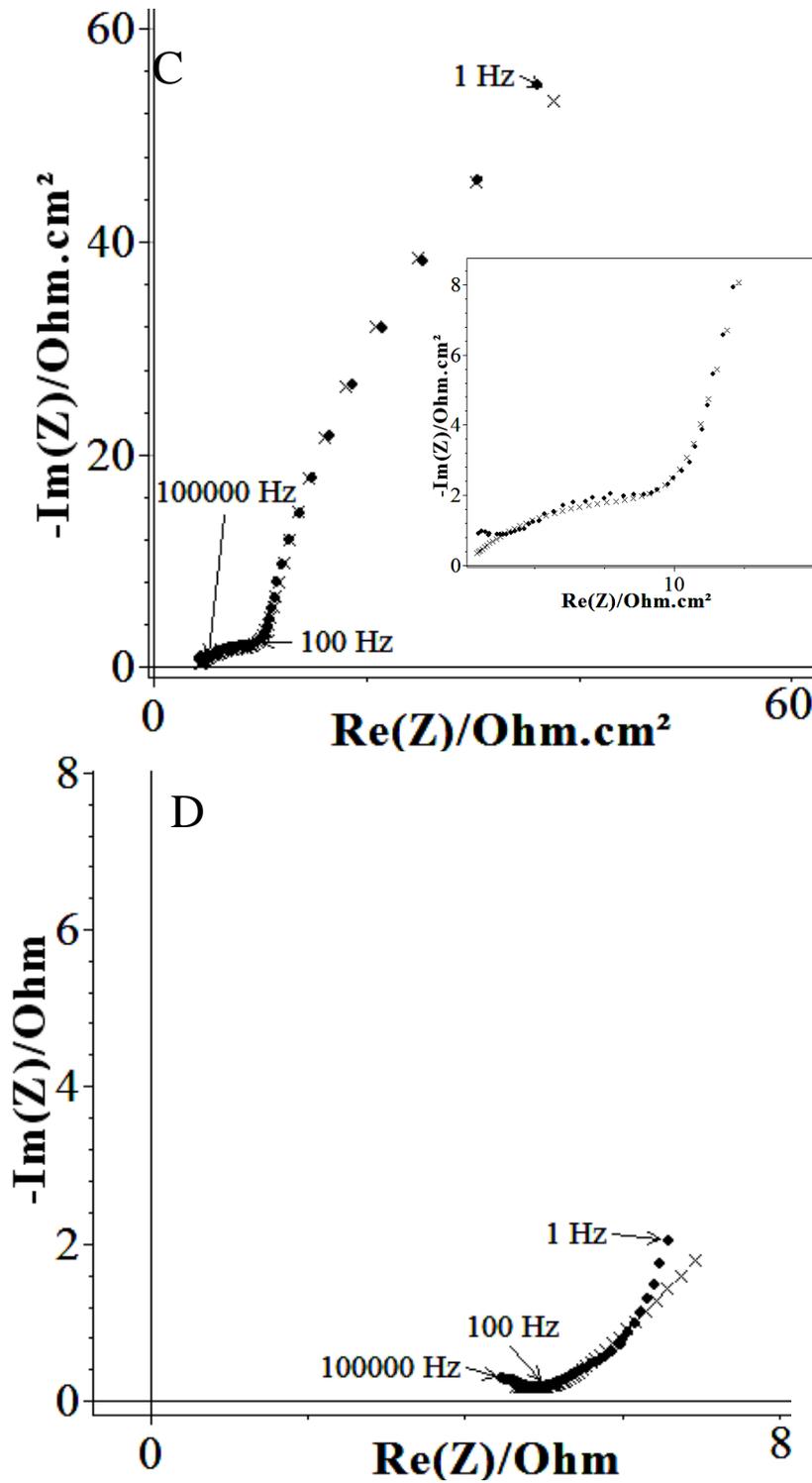


Figura 37. Diagrama de Nyquist biopelícula (A: fase I y B: fase II)



Continuación de figura 37. Diagrama de Nyquist biopelícula (C: fase III y D: fase IV)

En el caso de la biopelícula los diagramas de Bode presentaron un ángulo de fase máximo de 78° (figura 38 D) y un mínimo de 58° (figura 38 C). Siendo la fase III quien mostró un comportamiento más resistivo respecto a las demás.

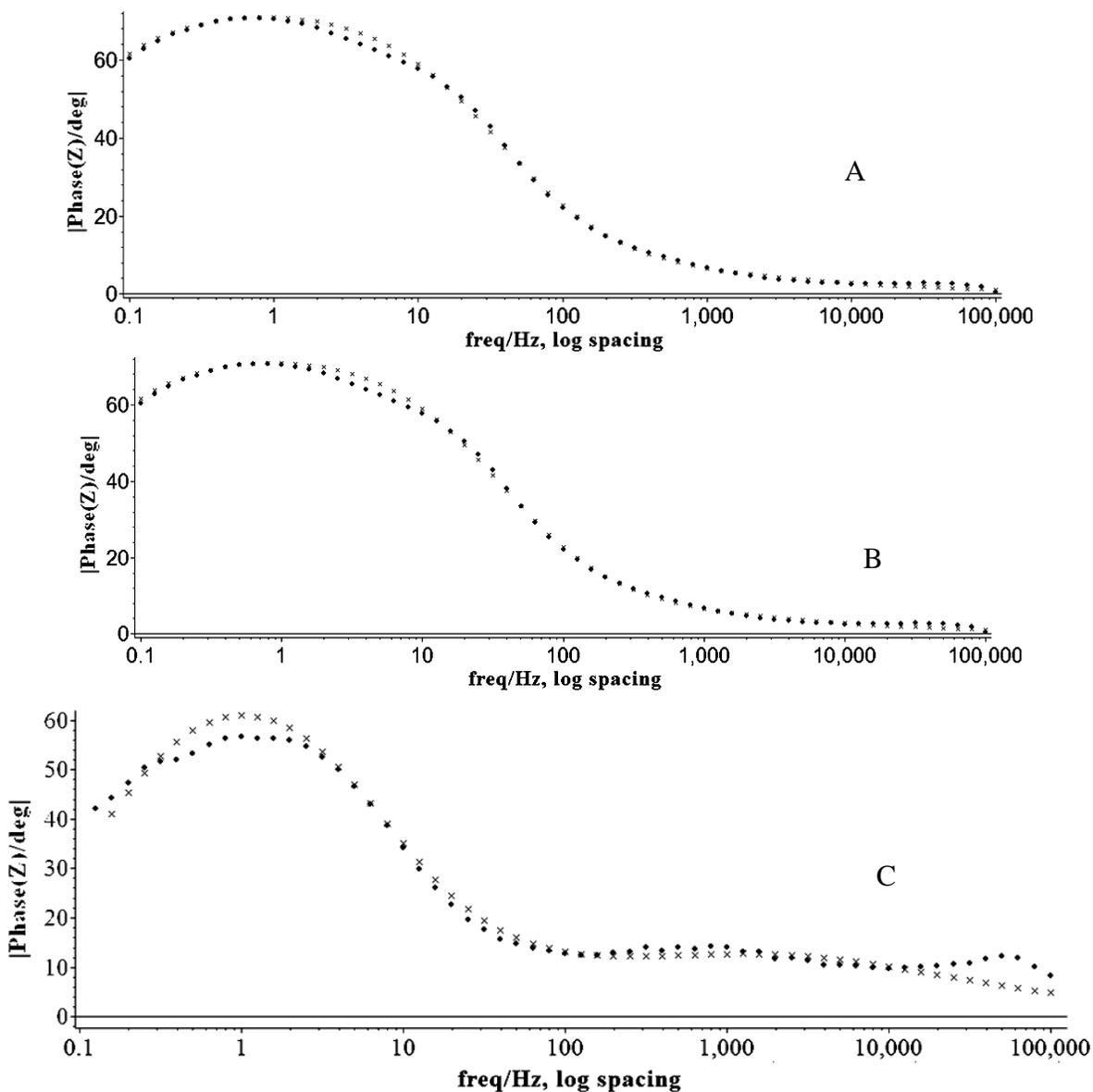
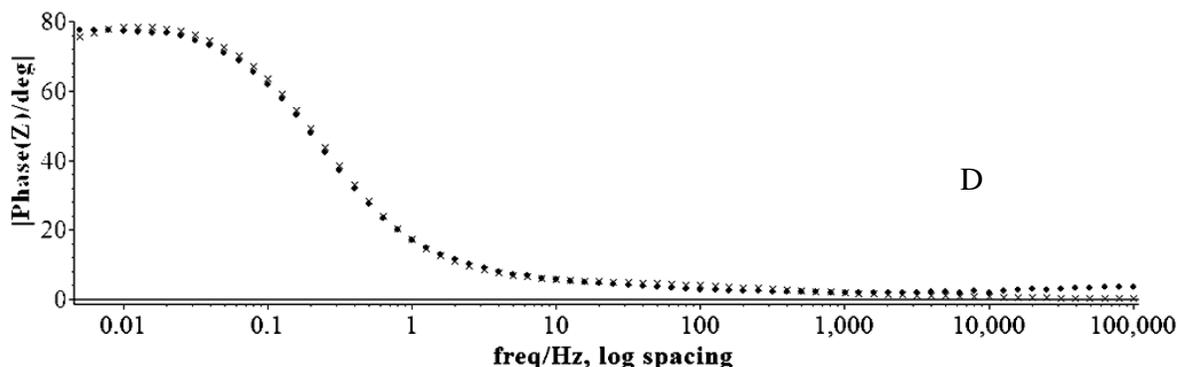


Figura 38. Diagrama de Bode biopelícula (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV)



Continuación figura 38. Diagrama de Bode biopelícula (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV).

- Anolito

Se presentó una tendencia marcada hacia el incremento de la R_{Ω} , presentándose una diferencia de $2.37 \Omega \cdot \text{cm}^2$ entre fase I y IV. Como se observa en los diagramas de Nyquist (figura 39) la fase II es quien reportó la menor R_{TC} , contando con una escala menor (hasta $40 \Omega \cdot \text{cm}^2$) respecto a las demás fases, dentro del marco de las frecuencias características señaladas. En este caso no se observan diferencias significativas en cuanto a las R_{Ω} reportadas (figura 39). El incremento en la R_{TC} , puede atribuirse a la ausencia de la biopelícula que favorece los procesos de transferencia de electrones del anolito hacia el electrodo como. De igual forma, en la fase II donde la resistencia generada por procesos de difusión parece no ser predominante en comparación con las demás fases de análisis.

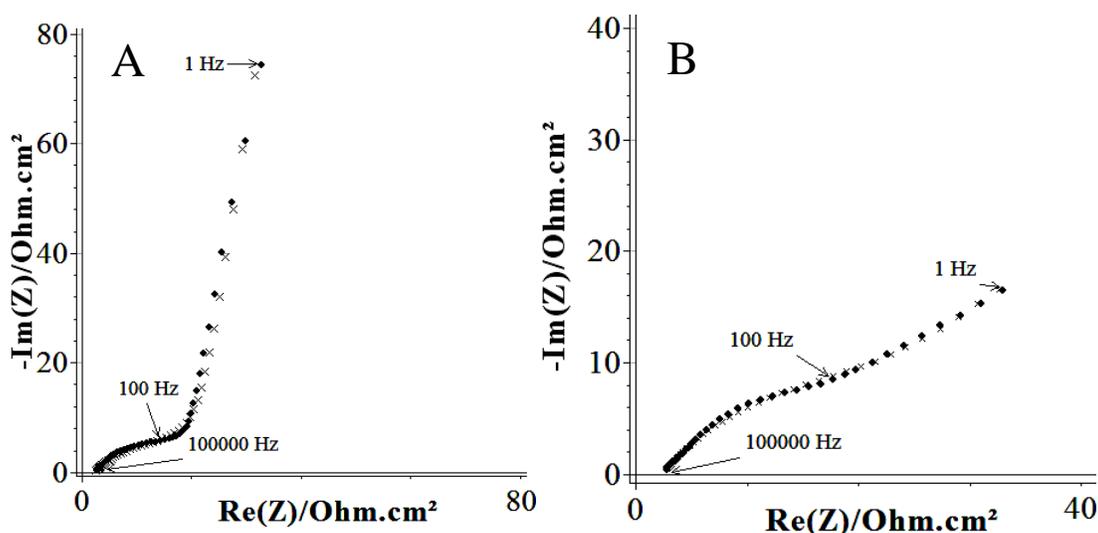
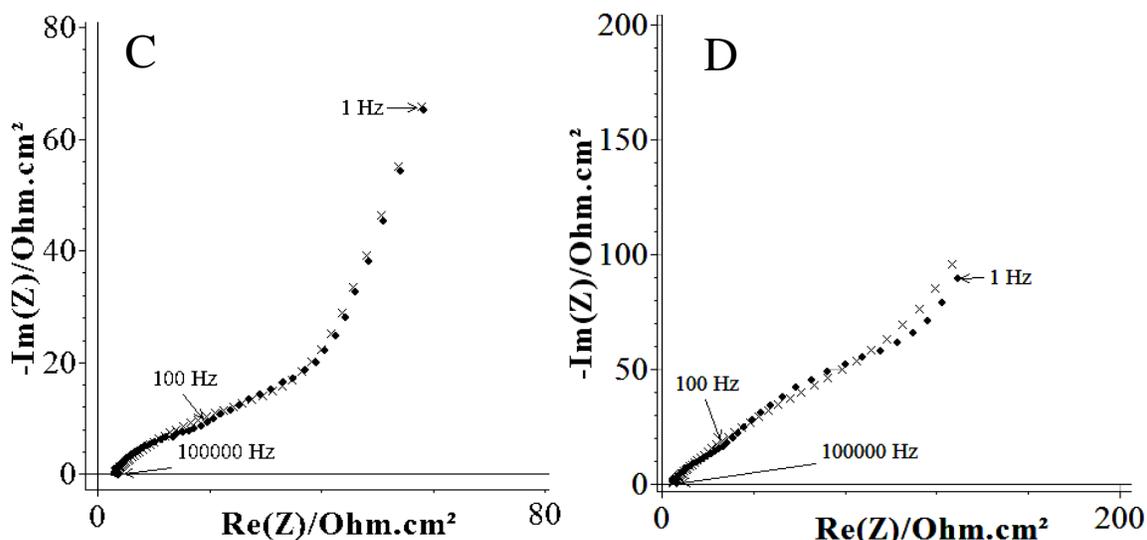


Figura 39. Diagrama de Nyquist anolito (A: fase I y B: fase II).



Continuación de figura 39. Diagrama de Nyquist anolito (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV).

En los diagramas de bode obtenidos del análisis del anolito, se presentó un ángulo de fase máximo de 72° (figura 40 A) y un mínimo de 32° (figura 40 B), siendo la fase II quien presentó un comportamiento más resistivo con respecto a las demás, dicho comportamiento explica la causa de la disminución de la R_{TC} en el anolito en el caso de dicha fase de estudio.

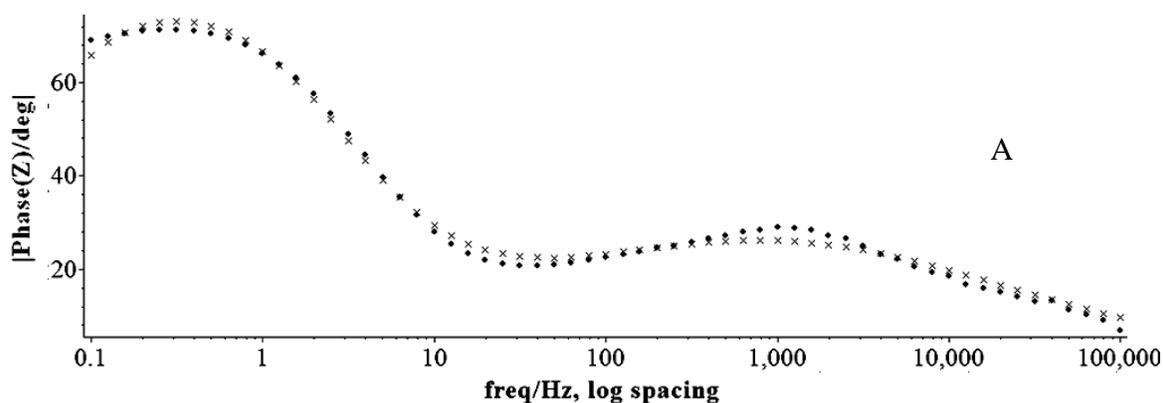
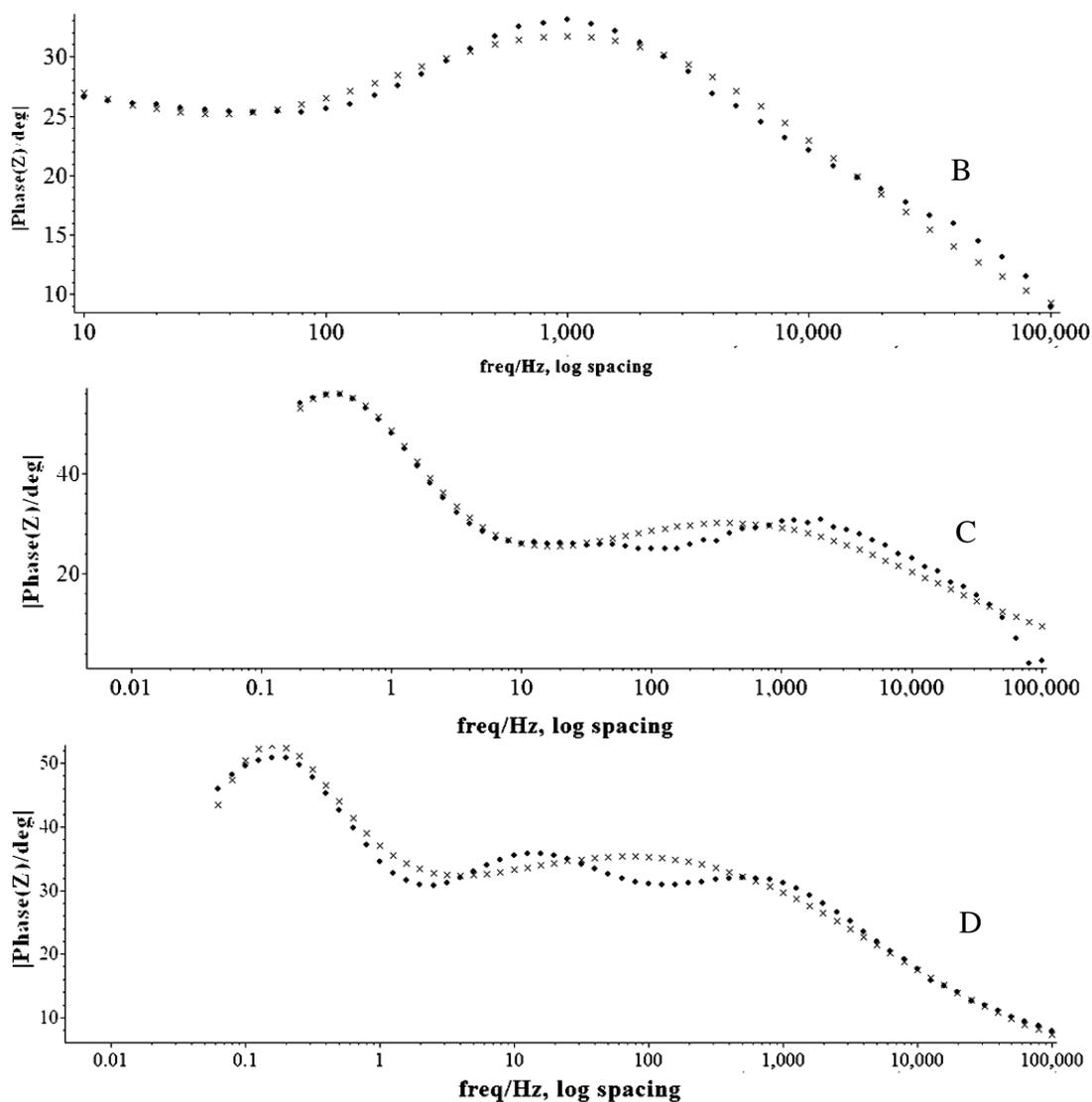


Figura 40. Diagrama de Bode, anolito (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV).



Continuación figura 40. Diagrama de Bode, anolito (A: fase I, B: fase II, C: fase III y D: fase IV)

3.5.3 Resistencia interna y resultados del ajuste del circuito equivalente (R_{Ω} , R_{TC} y R_D)

Los valores de la R_{int} se obtuvieron por medio del análisis de los diagramas de Nyquist con el software Ec-Lab ® (versión 10.8). Con base en el ajuste de los datos experimentales, en función del circuito equivalente anteriormente expuesto, se obtuvieron los valores de la R_{Ω} , R_{TC} y R_D .

- *Resistencia interna*

Como puede verse en la tabla 13 la R_{int} del blanco en la CCM fue mayor respecto a casi todas las fases de estudio en los tres análisis realizados (cámara anódica, biopelícula y anolito), siendo únicamente en el caso del anolito en la fase IV donde se presentó una R_{int} mayor ($433.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$). La diferencia de $355.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ de la fase IV, en el caso del anolito, respecto al blanco probablemente se deba al incremento de microorganismos suspendidos presentes en el anolito en el tiempo (como se mencionó con anterioridad en el caso del decremento de la DQO en la fase IV), como se ha mencionado con anterioridad en los estudios realizados por Biffinger *et al.* (2009).

En el caso de la cámara anódica, se puede observar una relación entre la interacción de los microorganismos suspendidos y el electrodo, con la disminución de la R_{int} (tabla 13), en comparación con las R_{int} obtenidas de la biopelícula y el anolito, por separado (tabla 13). Los resultados obtenidos son menores a lo reportado en la literatura en el caso de la cámara anódica, como es el caso de Hutchinson *et al.* (2011), quienes con una CCM (PEM, cátodo aireado con Pt como catalizador) con 21 días en operación obtuvieron una R_{int} mínima de 100Ω .

De manera individual el anolito presentan R_{int} mayores a las calculadas para la cámara anódica, mientras que la biopelícula mantiene valores similares. La disminución de la R_{int} de la cámara anódica, en comparación con lo obtenido por el anolito, puede ser atribuida a la interacción de los microorganismos exoelectrógenos y de las especies redox presentes en la CCM, como lo han mencionado con anterioridad Srikanth *et al.* (2009) y Ouitrakul *et al.* (2007).

Tabla 13. Comparativa de las R_{int} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.

Prueba	Fase de estudio	$R_{int}(\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Blanco		84.90 ± 1.02
Cámara anódica	I	1.20 ± 0.01
	II	10.40 ± 0.02
	III	$5.50 \pm 2.30 \text{ E }^{-3}$
	IV	4.50 ± 0.02
Biopelícula	I	$0.30 \pm 5.58 \text{ E }^{-3}$
	II	19.30 ± 0.06
	III	7.80 ± 0.23
	IV	0.20 ± 0.03
Anolito	I	30.60 ± 0.27
	II	33.20 ± 0.10
	III	31.70 ± 0.24
	IV	433.70 ± 1.01

- Resistencia óhmica (R_{Ω})

La R_{Ω} para cada una de las cuatro fases no presentó variaciones significativas en los valores obtenidos respecto a la biopelícula. Sin embargo, existen pequeñas variaciones respecto a las R_{Ω} obtenidas en el caso del anolito y la cámara anódica, observándose un incremento en ambos casos (tabla 14). Dicha variación puede atribuirse al incremento de microorganismos suspendidos y de materia orgánica suspendida. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de lo reportado en la literatura (como se menciono con anterioridad), tomando en cuenta los resultados de Borole *et al.* (2010) (R_{Ω} de 3 Ω), Ramasamy *et al.* (2009) (R_{Ω} de 2 Ω) o Hutchinsen *et al.* (2011) con una R_{Ω} de 25 Ω (CCM tipo PEM de cátodo aireado con Pt como catalizador)

La nula variación de la R_{Ω} en el caso de la biopelícula, puede ser debida al incremento de microorganismos exoelectrógenos en la colonización del electrodo y a la falta de los microorganismos suspendidos y residuos orgánicos presentes en el anolito causantes de un incremento en la R_{Ω} . No se encuentran estudios similares en la literatura, con los cuales se pueda hacer comparativa alguna.

Tabla 14. Comparativa de las R_{Ω} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.

Prueba	Fase de estudio	$R_{\Omega}(\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Blanco		84.90 ± 0.45
Cámara anódica	I	3.50 ± 0.18
	II	3.40 ± 0.52
	III	2.10 ± 0.35
	IV	4.50 ± 0.29
Biopelícula	I	3.90 ± 0.45
	II	3.10 ± 1.00
	III	4.30 ± 0.17
	IV	4.70 ± 0.13
Anolito	I	2.40 ± 0.32
	II	2.70 ± 0.76
	III	2.90 ± 0.16
	IV	4.70 ± 0.24

- Resistencia de transferencia de carga (R_{TC})

En la tabla 15 se puede observar una tendencia hacia la disminución de la R_{TC} a lo largo de las fases de estudio en la cámara anódica, esto puede ser debido al incremento e interacción de microorganismos exoelectrógenos presentes en el electrodo con las especies redox presentes en el anolito, permitiendo la aceleración de procesos de transferencia de carga en la CCM como se observa a partir de la fase III. De manera similar se reporta este tipo de observación en los estudios realizados por Ren *et al.* (2011) quienes observan una disminución de la R_{TC} (de $3.55 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ a $0.72 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) con el aumento del espesor de la biopelícula por el incremento de la colonización de microorganismos exoelectrógenos en la cámara anódica.

No se observó diferencia marcada entre el incremento de la R_{TC} en función de la ausencia de biopelícula (estudios realizados al anolito) o del anolito (estudios de la biopelícula) (tabla 15). No obstante la interacción de la biopelícula el anolito, se ve reflejada en la disminución valores de la R_{TC} obtenida en el estudio de cámara anódica, como se comentó con anterioridad. Los resultados obtenidos de la biopelícula y el anolito,

no son comparables con la literatura, puesto que no se encuentran reportadas pruebas de impedancia similares realizadas únicamente a la biopelícula o el anolito.

Tabla 15. Comparativa de las R_{TC} obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.

Prueba	Fase de estudio	$R_{TC}(\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Blanco		860.50 ± 1.10
Cámara anódica	I	2200.00 ± 5.15
	II	4681.00 ± 5.00
	III	797.80 ± 5.02
	IV	91.60 ± 20.5
Biopelícula	I	2739.00 ± 88.82
	II	$143.80 \pm 2.02\text{E-}3$
	III	403.50 ± 8.42
	IV	$1\ 852.00 \pm 1.00$
Anolito	I	2200.00 ± 111.50
	II	17.70 ± 3.00
	III	741.80 ± 1.00
	IV	1292.00 ± 29.08

- Resistencia por difusión (R_D)

En las fases I, III y IV el anolito fue quien presentó una mayor R_D (tabla 16), probablemente debido a la ausencia de la acción catalítica de la biopelícula. Dicha resistencia se vio compensada por la interacción de las especies redox en el anolito con la biopelícula, traduciéndose en la disminución de la misma en el caso de la cámara anódica (tabla 16). La disminución de la R_D ha sido reportada de manera similar en el caso de la cámara anódica, en los estudios realizados por Sun *et al.* (2001), donde comprueban la disminución de la R_D , por la adicción y acción redox del colorante Congo red. En la fase III la biopelícula por sí sola no pudo compensar las pérdidas por los procesos de difusión, debido a que probablemente en esta fase los mediadores redox suspendidos en el anolito eran los principales contribuyentes en la agilización de la oxidación del sustrato, a diferencia de las demás fases de estudio.

Tabla 16. Comparativa de las R_D obtenidas del blanco, cámara anódica, biopelícula y anolito para cada una de las cuatro fases del estudio.

Prueba	Fase de estudio	$R_D(\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Blanco		484.00 ± 7.27
Cámara anódica	I	8.70 ± 0.63
	II	477.70 ± 66.89
	III	334.80 ± 93.05
	IV	20.20 ± 6.30
Biopelícula	I	65.02 ± 20.00
	II	394.30 ± 0.03
	III	362.00 ± 1.00
	IV	16.40 ± 1.00
Anolito	I	409.40 ± 40.84
	II	138.70 ± 30.00
	III	483.40 ± 1.00
	IV	564.90 ± 9.35

3.6 Análisis del anolito y electrodo mediante DGGE

Se obtuvieron los productos de la primera PCR de las regiones hipervariables V1-V5 (figura 41), las cuales se emplearon como templado para la PCR “touchdown” de las regiones hipervariables V3-V5 (figura 42), empleadas para la identificación y aislamiento de bandas en DGGE.

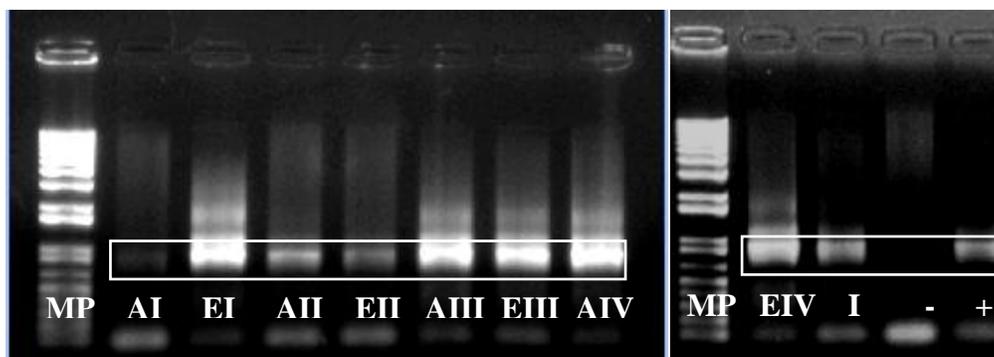


Figura 41. Amplificación por PCR de fragmentos del ADN_r 16S empleando los primers V1-V5. MP: marcador de peso molecular, 1Kb. AI, AII...: anolito fase I, anolito fase II...; EI, EII...: electrodo fase I, electrodo fase II...; I: inóculo; -: control negativo; +: control positivo

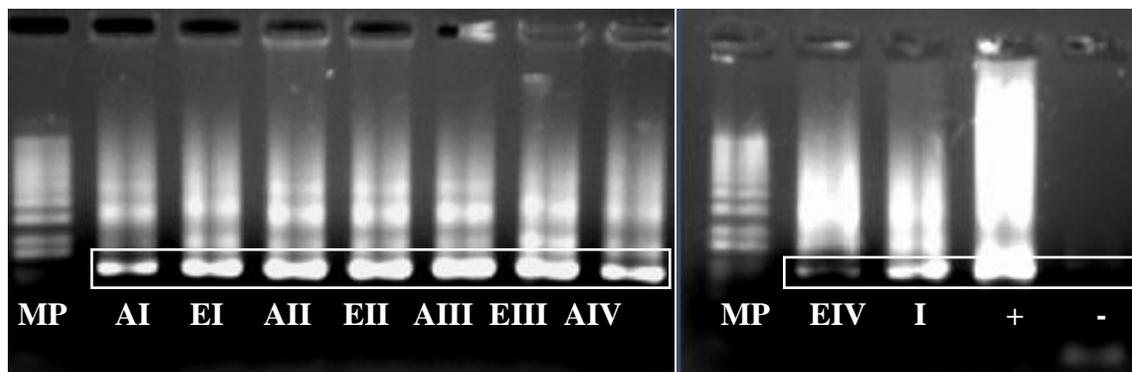


Figura 42. Amplificación por PCR de fragmentos del ADNr 16S empleando los primers V3-V5.

Se llevó a cabo la técnica de electroforesis y el corte de bandas para su reamplificación y secuenciación. Se tuvo problemas en la reamplificación de las bandas, fallando en algunos casos la amplificación. Como evaluación preliminar se analizan las bandas observadas en el DGGE, para explorar la variación en la composición bacteriana en el electrodo y los microorganismos suspendidos en el anolito.

Aunque no hay una relación estricta de una banda-un microorganismo, la DGGE es una prueba que permite tener una idea de que tan diversa es una muestra, en función del número de bandas diferentes observadas. La visualización de una sola banda en el inóculo, indica la predominancia de un único microorganismo en el mismo, mientras que la aparición de nuevas bandas en las siguientes fases en las que se analizó la CCM, permite sentir que hay un aumento de poblaciones de microorganismos que no fueron detectados al principio por encontrarse en proporciones mínimas. Las condiciones de operación de la CCM establecen un ambiente de selección artificial que favorece la proliferación de ciertos microorganismos (figura 43).

Como se observa en la figura 43, la banda 6 fue la única observable desde el inóculo hasta la fase IV tanto en el anolito, como en el electrodo. Esa banda es la más intensa en cada caso. Son de particular interés para nuestras interpretaciones los microorganismos correspondientes a las bandas 1, 2, 3, 13 y 14, ya que se favorecieron por la presión selectiva en la CCM desde la fase I hasta la fase IV, apareciendo tanto en el anolito como en la biopelícula. Con base a que sus bandas no aumentaron de intensidad conforme progresaron las fases, puede suponerse que sus proporciones fueron constantes. La

probable competencia entre microorganismos por el sustrato o la sucesión de microorganismos en la microcomunidad se hace evidente por la aparición y desaparición de bandas, como es el caso de la banda 16 que aparece en el anolito en la fase I, pero aparentemente es remplazada en la fase II; por el contrario, el microorganismo correspondiente a la banda 5 aparece en el electrodo en la fase II. Similarmente, el microorganismo correspondiente a la banda 12 en el electrodo aparece en la fase III y desaparece después; en el anolito el microorganismo correspondiente a la banda 4 aparece en la fase IV. De igual forma, la banda 17 aparece en el electrodo en la fase II, disminuye en la fase III y finalmente es desplazado por completo, desapareciendo en la fase IV. Otro microorganismo que tiende a favorecerse y posteriormente a disminuir es el correspondiente a la banda 15, ya que se incrementa en el electrodo en la fase II, posteriormente en la fase III permanece en el electrodo y se incrementa en el anolito, y finalmente disminuye, desapareciendo por completo en la fase IV. El microorganismo perteneciente a la banda 8 se ve favorecido incrementando su concentración en la fase III, en el electrodo y anolito, y es desplazado por otros microorganismos en la fase IV. El microorganismo correspondiente a la banda 9 aparece a partir de la fase I tanto en el electrodo como en el anolito, y posteriormente disminuye, desapareciendo en el anolito en la fase III y del electrodo durante la fase IV. Son de interés los microorganismos correspondientes a las bandas 1-3, 6, 13 y 14, ya que estos prevalecieron desde la fase I hasta la fase IV tanto en el electrodo como en el anolito, pero son de mayor interés los microorganismos correspondientes a las bandas 4, 10 y 11, ya que por su baja concentración no se observan en las fases I-III (figura 43<), pero se enriquecen y observan en la última fase de análisis, la cual es donde se observaron los mejores resultados de densidad de corriente y generación de potencia entre las 4 fases analizadas en la CCM.

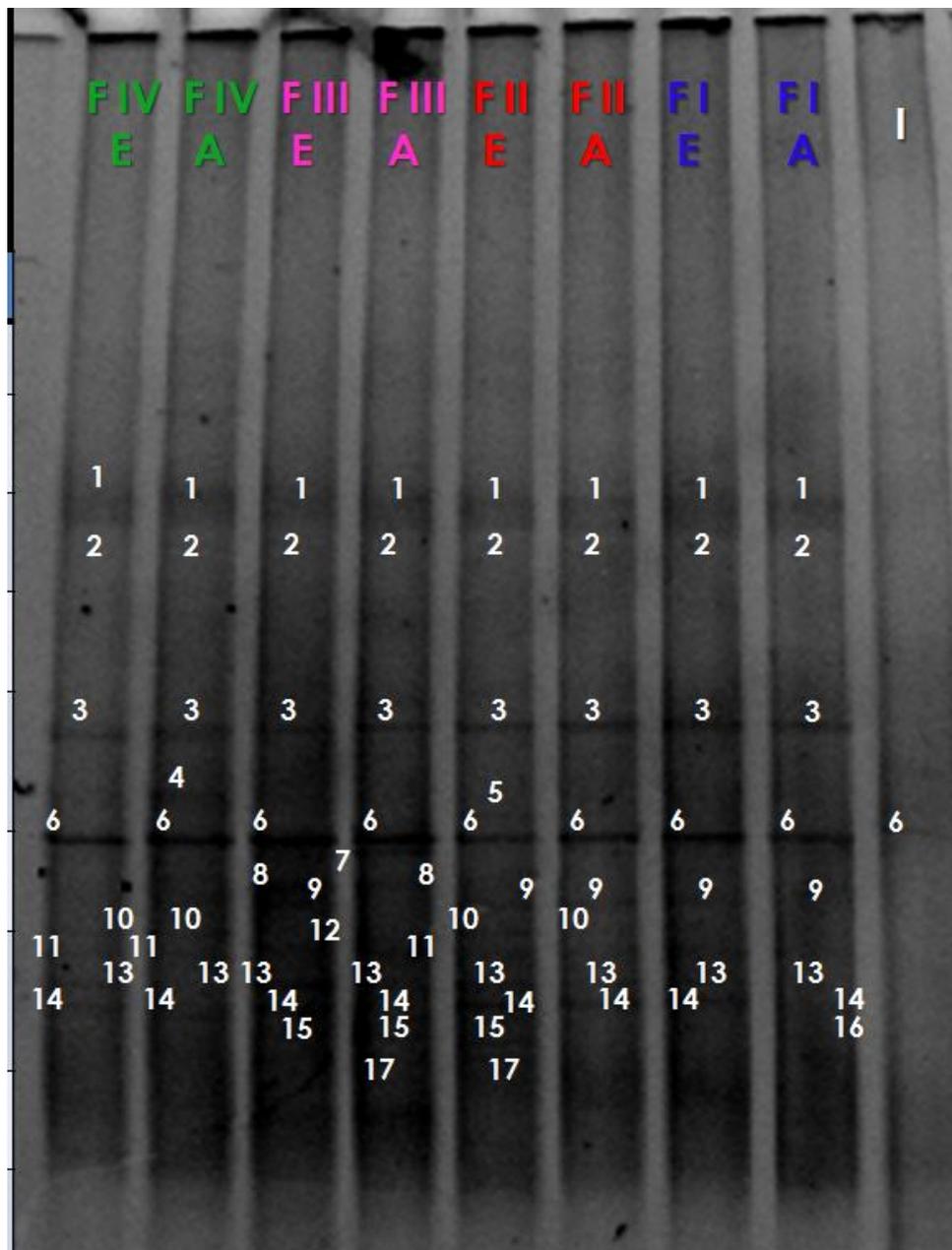


Figura 43. DGGE de las regiones hipervariables V3-V5. AI, AII, AIII y AIV: anolito fase I, II, III y IV. EI, EII, EIII y EIV: electrodo fase I, II, III y IV. I: inóculo

3.7 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La figura 44 muestra que no hay presencia de ningún microorganismo en la tela de carbón estéril, descartando presencia microbiana inicial en la tela de carbón empleada.

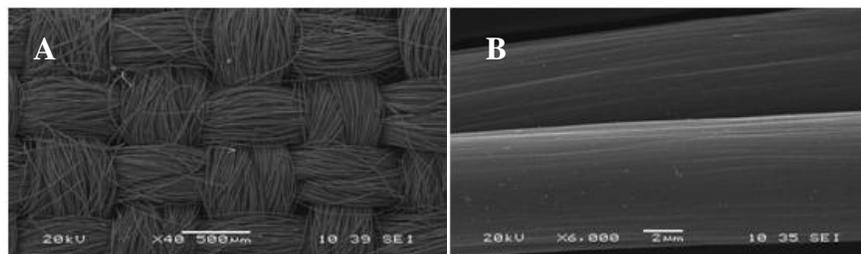


Figura 44 . Microscopia electrónica de barrido de la tela de carbón estéril usada para la preparación del electrodo biológico (formación posterior de biopelícula bacteriana). A: Vista general de la tela a 40X. B: Acercamiento a las fibras de la tela de carbón (6000 X)

En las fotografías obtenidas por medio de la microscopía electrónica de barrido se observa un aumento en cuanto a la colonización del electrodo (figura 45, 46, 47 y 48) y diversidad morfológica de las bacterias colonizadoras, conforme transcurre el tiempo de exposición del electrodo, permitiendo el desarrollo de la biopelícula. En la fase I (66 días) se observa una dominancia de bacilos (figura 45 B), mientras que en la Fase II (81 días) se observa la presencia de otras formas microbianas tales como diplobacilos (figura 46 G y F), cocos (figura 46 B, D y F), estreptococos (figura 46 C) y estafilococos (figura 46 E). Se observan también apéndices bacterianos (posiblemente nanocables) interconectando células entre sí (figura 47 B y F), y promoviendo la adherencia de las mismas al electrodo (figura 47 G, H e I). En los casos de la fase III y IV (figura 47 y 48) ocurrió una mayor colonización del electrodo, observándose cúmulos bacterianos entre las fibras de los electrodos y no solo en la superficie de las mismas, como en el caso de las fases I y II. Se observa una mayor cantidad de microorganismos en la fase IV (figura 48).

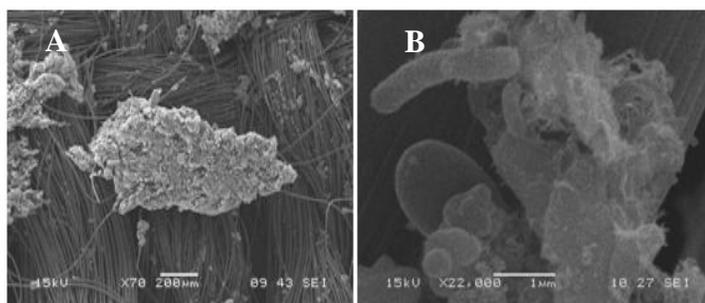


Figura 45 . Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase I. A: Vista panorámica a 70X. B: Acercamiento a 22 000 X.

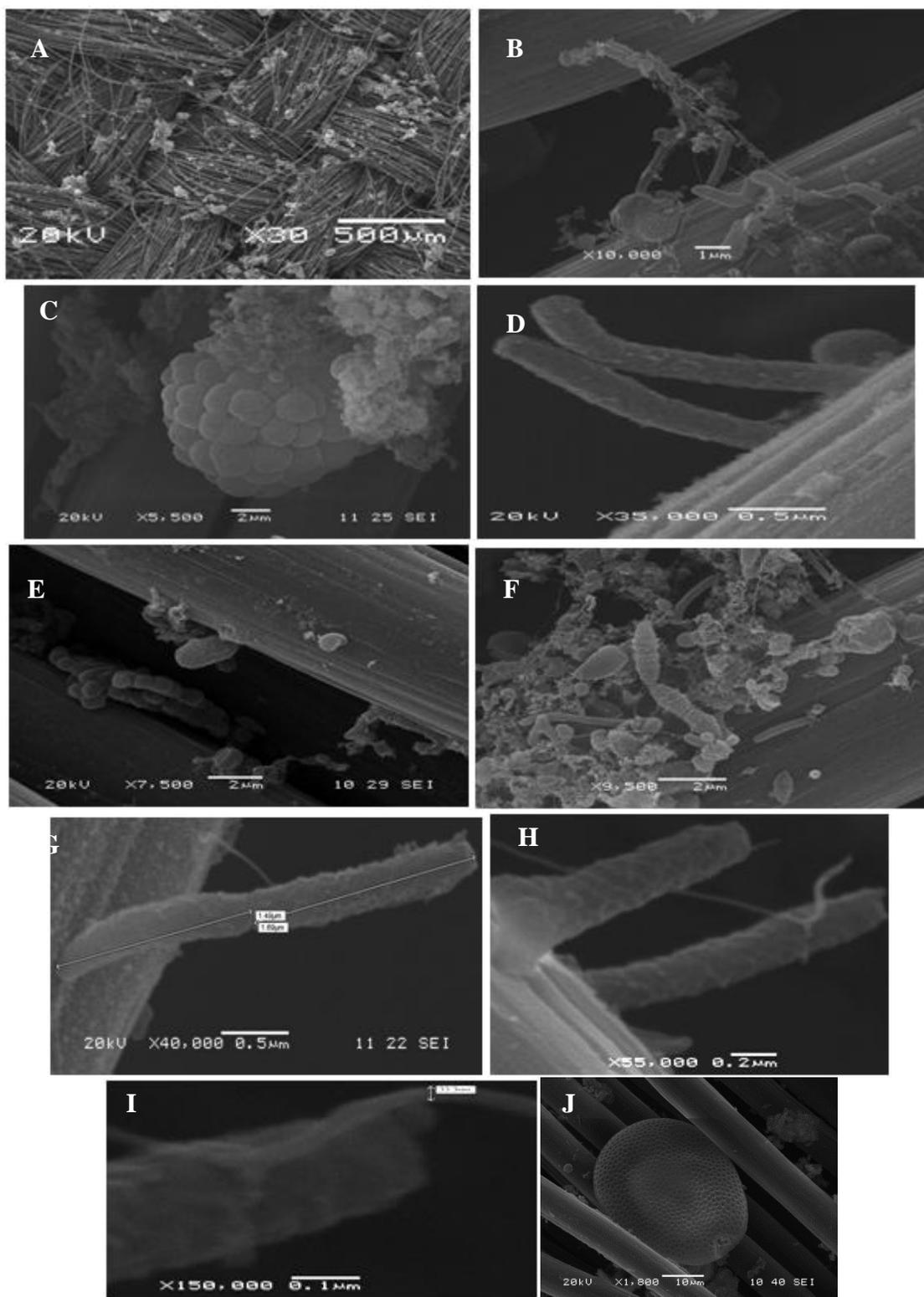


Figura 46. Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase II. A: Vista panorámica a 30X. B-J: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías.

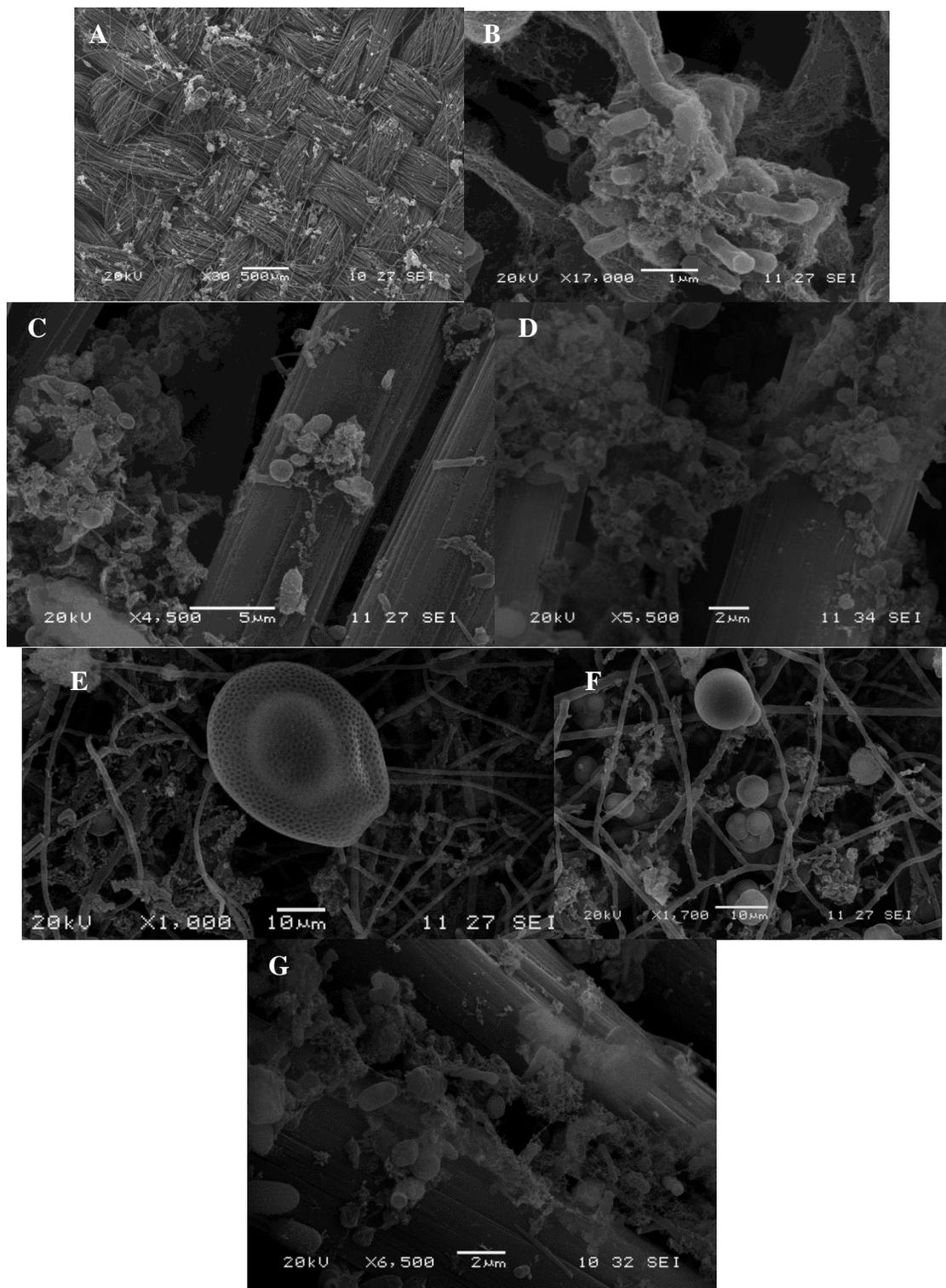


Figura 47. Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase III. A: Vista panorámica a 30X. B-G: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías.

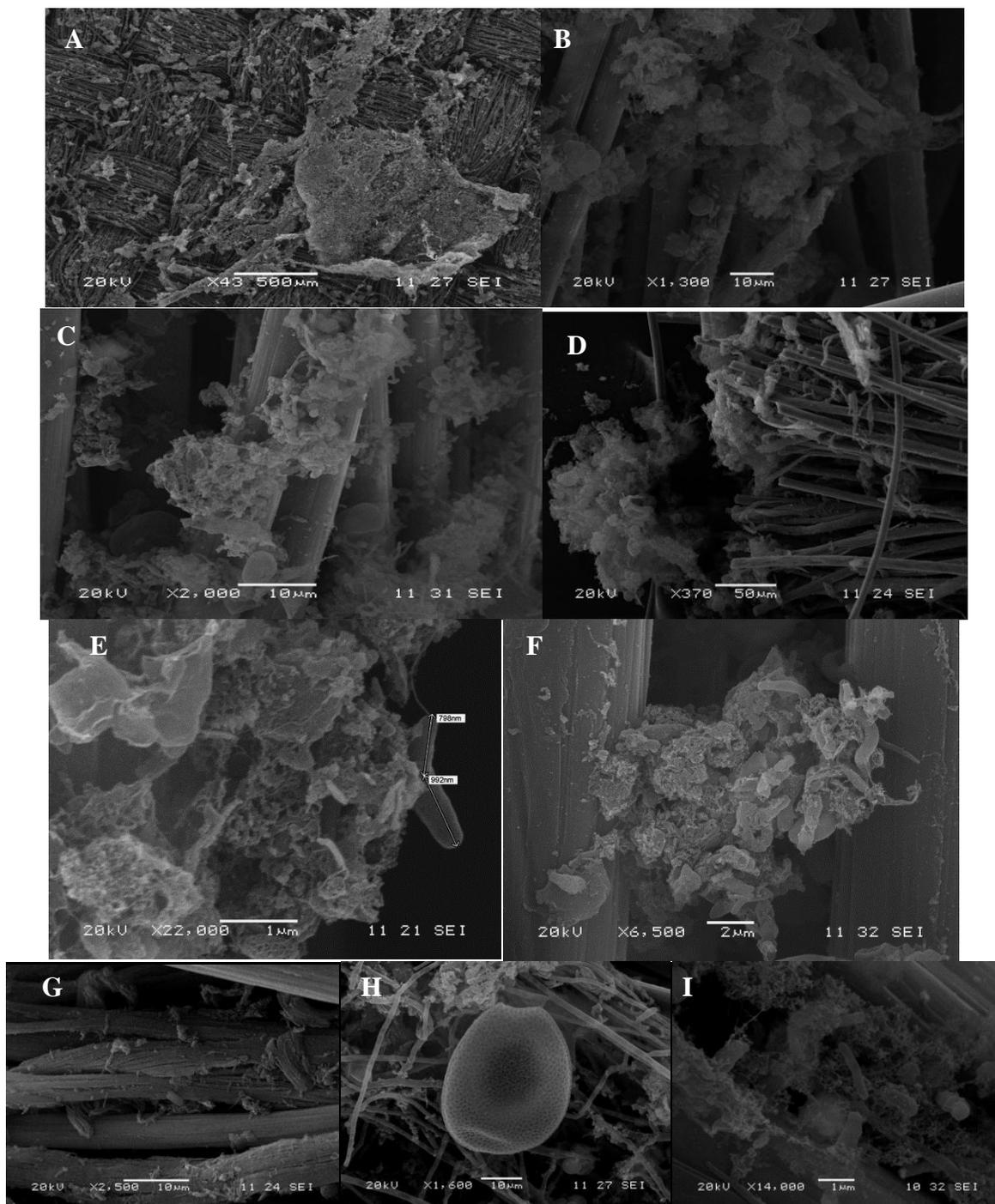


Figura 48. Microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada en la tela de carbón en la fase IV. A: Vista panorámica a 33X. B-I: Acercamiento a células bacterianas con diferentes morfologías.

CONCLUSIONES

Hubo una tendencia de incremento en las densidades de potencia (15.32-68.28 W/m²), densidades de corriente (210.88-347 mA/m²), voltaje a circuito abierto (615.08-654.03 mV) y de eficiencia coulombica (34.91-57.44%) al transcurrir las fases analizadas en la CCM. Estos datos se relacionan con las bajas R_{int} medidas en la media celda (1.2-4.5 $\Omega \cdot cm^2$) y con el aumento en las densidades de corriente obtenidas en las VC en la última fase de análisis. La tendencia hacia la disminución de R_{int} en el caso de la biopelícula puede ser explicada por la prevalencia y enriquecimiento de microorganismos exoelectrógenos tanto los suspendidos como los del electrodo, lo cual se observó en la fase IV que presentó una mayor actividad electroquímica.

Los procesos de transferencia de carga fueron los que contribuyeron con una mayor resistencia en cada uno de los análisis realizados, a lo largo de las cuatro fases de estudio, mientras que la resistencia óhmica permaneció prácticamente invariable además de ser la menor respecto a la R_D y R_{TC} .

La interacción entre los microorganismos de la biopelícula y del anolito parece crucial para optimizar el desempeño de la CCM, puesto que se disminuyen las pérdidas dentro del sistema bioelectroquímico causadas por la R_{Ω} , R_{TC} y R_D .

Los resultados de VC sugieren la presencia de mediadores redox involucrados en mecanismos de transferencia directa e indirecta de electrones en el anolito y la biopelícula. La variedad de los posibles mecanismos redox involucrados, explicaría la tendencia de incremento de las densidades de corriente y de potencia conforme los resultados obtenidos en las cuatro fases de estudio. Así, inicialmente dichos mecanismos parecen de tipo indirecto puesto que la biopelícula no presentó picos de reacción en los primeros 66 días (fase I), mientras que el anolito muestra actividad electroquímica desde el inicio. Probablemente se presentan mecanismos directos de transferencia de electrones a partir de los 81 días de operación (fase II), ya que se obtuvieron picos de reacción en la biopelícula (predominando la acción probable de citocromos).

El análisis preliminar de las microcomunidades en el electrodo y anolito de la CCM mediante perfiles DGGE sugieren que ocurre una sucesión microbiana a lo largo de la operación de la CCM.

PERSPECTIVAS

Los resultados que se obtuvieron en las densidades de potencia son competitivos, pero es claro que se deben plantear estrategias para disminuir la R_{TC} , por ejemplo implementar técnicas de enriquecimiento de microorganismos exoelectrógenos en el ánodo y de especies redox en el anolito, así como el análisis de nuevos materiales altamente conductivos y no corrosivos, para la elaboración de electrodos de soporte en el ánodo.

Se requiere de un análisis más detallado sobre las pérdidas ocasionadas por el incremento del espesor y las irregularidades en la distribución de la biopelícula en el electrodo. Existen estudios que determinan el espesor de capas de óxido depositadas en electrodos, basándose en resultados de pruebas de impedancia cuyos circuitos equivalentes presentan elementos de fase constante, empleando la constante dieléctrica del material del electrodo, su área y la capacitancia efectiva experimental, para el cálculo de dicho espesor,^{214,215} este tipo de determinación no puede ser ejecutada en el caso particular del análisis de biopelículas en CCM, debido a que las múltiples irregularidades en la distribución de la biopelícula sobre el electrodo (a diferencia de los estudios realizados en capas de corrosión), no permiten una lectura precisa que permita estimar el espesor de la biopelícula y tampoco proporciona información al respecto a su topografía. Es por ello que se requiere de la implementación de técnicas de microscopía de fuerza atómica, para la determinación precisa del espesor y un análisis detallado sobre la topografía de la biopelícula.¹⁹²

Debido a problemas técnicos en el presente estudio, al momento no se tienen resultados respecto a la identificación de los microorganismos estudiados dentro de las cuatro fases de estudio. La identificación de estos microorganismos permitirá explorar la sucesión de la biopelícula establecida en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. Kim *et al.* *A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, Shewanella putrefaciens.* Enzyme Microb. Technol. 30, 145–152, 2002.
2. H. Park, G. Zeikus. *Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore.* Appl. Environ. Microbiol. 66, 1292–1297, 2000.
3. U. Schröder. *Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency.* Phys. Chem. Chem. Phys. 9, 2619–2629, 2007.
4. S. Jung y J. Regan. *Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 393-402, 2007.
5. J. Kim *et al.* *Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells.* Bioresour. Technol. 98, 2568–2577, 2007.
6. H. Lee *et al.* *Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates.* Water Res. 42, 1501-1510, 2008.
7. B. Jong *et al.* *Enrichment, performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell.* Environ Sci Technol. 40, 6449-6454, 2006.
8. B. Mathis *et al.* *Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment.* Appl Microbiol Biotechnol. 78, 147-155, 2008.
9. J. Chang *et al.* *Removal of volatile fatty acids (VFA) by microbial fuel cell with aluminum electrode and microbial community identification with 16S rRNA sequence.* Korean J. Chem. Eng. 25, 535-541, 2008.
10. K. Rabaey *et al.* *Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer.* Appl. Environ. Microbiol. 70, 5373–5382, 2004.
11. N. Phung *et al.* *Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences.* FEMS Microbiol. Lett. 233, 77–82, 2004.
12. B. Kim *et al.* *Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 672-681, 2004.
13. J. Lee *et al.* *Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses.* FEMS Microbiol. Lett. 223, 185–191, 2003.

14. B. Logan *et al.* *Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell.* Water Res. 39, 942–952, 2005.
15. D. Bond *et al.* *Electrodereducing microorganisms that harvest energy from marine sediments.* Science. 295, 483–485, 2002.
16. L. Tender *et al.* *Harnessing microbially generated power on the seafloor.* Nat. Biotechnol. 20, 821–825, 2002.
17. D. Holmes *et al.* *Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments.* Microb. Ecol. 48, 178–190, 2004.
18. K. Rabaey y W. Verstraete. *Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation.* Trends in Biotechnol. 2023, 291-298, 2005.
19. WW. Li *et al.* *Recent advances in the separators for microbial fuel cells.* Bioresource Tech. 102, 244-252, 2011.
20. Z. Du; Li H.; T. Gu. *A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy.* Biotechnol. Advances. 25, 464–82, 2007.
21. B. Logan *et al.* *Microbial fuel cells: Methodology and technolgy.* Environ. Sci. Technol. 40, 5181–5192, 2006.
22. R. Bullen *et al.* *Biofuel cells and their development.* Biosens. Bioelectron. 21, 2015–45, 2006.
23. B. Rittmann. *Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms.* Biotechnol. Bioeng. 100, 203-212, 2008.
24. K. Watanabe. *Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy.* Biosci. Bioeng. 106, 528-536, 2008.
25. J. Fornero; M. Rosenbaum; L. Angenent. *Electric power generation from municipal, food, and animal wastewaters using microbial fuel cells.* Electroanalysis. 22, 832-843, 2010.
26. R. Rozendal *et al.* *Microbial fuel cells for wastewater treatment.* Trends. Biotech. 26, 450-459, 2008.

27. H. Liu; B. Logan. *Electricity generation using an aircathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane*. Environ. Sci. Technol. 38, 4040–4046, 2004.
28. A. Borole *et al.* *Controlling accumulation of fermentation inhibitors in biorefinery recycle water using microbial fuel cells*. Biotechnol. Biofuels. 2, 1-7, 2009.
29. H. Kim, J. Nam y H. Shin. *Ammonia inhibition and microbial adaptation in continuous single-chamber microbial fuel cells*. J. Power Sources. 196, 6210-6213, 2011.
30. Y. Feng *et al.* *Continuous electricity generation by a graphite granule baffled air–cathode microbial fuel cell*. Bioresource Tech. 101, 632-638, 2010.
31. H. Liu *et al.* *Scale-up of membrane-free single-chamber microbial fuel cells*. J. Power Sources. 179, 274–279, 2008.
32. H. Liu, R. Ramnarayanan y B. Logan. *Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell*. Environ Sci Technol. 38, 2281–2285, 2004.
33. B. Logan *et al.* *Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells*. Environ. Sci. Technol. 41, 3341-3346, 2007.
34. K. Rabaey *et al.* *Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity*. Wat. Sci. Technol. 52, 515–523, 2005.
35. C. Reimers *et al.* *Substrate degradation kinetics, microbial diversity, and current efficiency of microbial fuel cells supplied with marine plankton*. Appl. Envir. Microbiology. 73, 7029-7040, 2007.
36. C. Molina *et al.* *Scale-up of membrane-free double-chamber microbial fuel cells with novel anode materials using domestic wastewater as sole feed*. Poster. XVIII International Materials Research Congress, Solar-Hydrogen and Biofuels Symposium. Cancún, 2009.
37. S. Navarro *et al.* *New microbial fuel cell design using polyaniline-coated anodes and Geobacter sulfurreducens*. Poster. XVIII International Materials Research Congress, Solar-Hydrogen and Biofuels Symposium. Cancún, 2009.
38. MFCO(Microbial Fuel Cell Org). *Experiences from MFC pilot plant operation*. 2008. Presentación elaborada por Keller, J. y Rabaey, K. enlace consultado el 24 de Marzo

del 2010:
<http://www.microbialfuelcell.org/Presentations/First%20MFC%20symposium/JK%20presentation%20MFC%20Pilot%20v3.pdf>

39. A. Mathuriya y V. Sharma. *Bioelectricity production from various wastewaters through microbial fuel cell technology*. J Biochem Tech. 2, 133-137, 2009.
40. B. Min *et al.* *Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells*. Water Res. 39, 4961–4968, 2005.
41. S. Cheng *et al.* *Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing*. Environ. Sci. Technol. 40, 2426–2432, 2006.
42. C. Picioreanu *et al.* *Mathematical model for microbial fuel cells with anodic biofilms and anaerobic digestion*. Water Science and Technology. 57, 965-971, 2008.
43. S. Cheng y B. Logan. *Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells*. Electrochem. Commun. 9, 492–496, 2008.
44. F. Zhao *et al.* *Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective*. Chem. Soc. Rev. 38; 1926–1939, 2008.
45. S. Venkata; G. Mohanakrishna; P. Sarma. *Effect of anodic metabolic function on bioelectricity generation and substrate degradation in single chambered microbial fuel cell*. Environ. Sci. Technol. 42; 8088–8094, 2008.
46. K. Fricke, H. Harnisch y U. Schröder. *On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells*. Energy & Environmental Science. 1; 144-147, 2008.
47. E. Marsili *et al.* *Microbial biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached biofilms*. Appl. Environ. Microbiol. 74; 7329-7337, 2008.
48. K. Vincent, A. Parkin y F. Armstrong. *Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases*. Chem. Rev. 107, 4366–4413, 2007.
49. B. Kim, I. Chang y G. Gadd. *Challenges in microbial fuel cell development and operation*. Appl Microbiol Biotechnol. 76, 485-494, 2007.

50. C. Reimers *et al.* *Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep*. *Geobiology*. 4, 123–136, 2006.
51. A. Manohar, O. Bretschger, K. Nealon y F. Mansfeld. *The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell*. *Electrochim. Acta*. 53, 3508–3513, 2008.
52. S. Ouitrakul, M. Sriyudthsak, S. Charojrochkul y T. Kakizono. *Impedance analysis of bio-fuel cell electrodes*. *Biosens. Bioelectron.* 23, 721–727, 2007.
53. U. Michaelidou *et al.* *Microbial Communities and Electrochemical Performance of Titanium-Based Anodic Electrodes in a Microbial Fuel Cell*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1069-1075, 2011.
54. A. Manohar y F. Mansfeld. *The internal resistance of a microbial fuel cell and its dependence on cell design and operating conditions*. *Electrochim. Acta*. 54, 1664-1670, 2008.
55. Y. He *et al.* *Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell*. *Bioelectrochemistry*. 74, 78–82, 2008.
56. D. Zhuwei, L. Haoran y G. Tingyue. *A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy*. *Biotechnology Advances*. 25, 464–482, 2007.
57. H. Liu, S. Cheng y B. Logan. *Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell*. *Environ Sci. Technol.* 39, 658–662, 2005.
58. J. Niessen, U. Schröder, M. Rosenbaum y F. Scholz. *Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells*. *Electrochem Commun.* 6, 571–575, 2004.
59. K. Rabaey *et al.* *A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1531–1535, 2003.
60. B. Min y B. Logan. *Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5809–5814, 2004.
61. H. Rismani-Yazdi *et al.* *Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells*. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1398-1407, 2007.

62. Z. He *et al.* *An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy.* Environ. Sci. Technol. 40, 5212–5217, 2006.
63. Q. Wen *et al.* *Electricity generation and brewery wastewater treatment from sequential anode-cathode microbial fuel cell.* J Zhejiang Univ Sci B. 11, 87–93, 2010.
64. B. Erable, L. Etcheverry y A. Bergel. *Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment.* Electrochemistry Communications. 11, 619-622, 2009.
65. B. Logan y J. Regan. *Microbial fuel cells - challenges and applications.* Environ. Science and Technol. 40, 5172-5180, 2006.
66. B. Kim, H. Kim, M. Hyun y D. Park. *Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, Shewanella putrefaciens.* J Microbiol Biotechnol. 9,127–131, 1999.
67. D. Lonergan *et al.* *Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria.* J. Bacteriol. 178,2402–2408, 1996.
68. P. Clauwaert *et al.* *Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 901–913, 2008.
69. C. Torres, A. Marcus y B. Rittmann. *Proton transport inside the biopelícula limits electrical current generation by anode-respiring bacteria.* Biotechnol. Bioeng. 100, 872–881, 2008.
70. J. Kim, B. Min y B. Logan. *Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production.* Appl Microbiol Biotechnol. 68, 23–30, 2005.
71. Y. Choo, J. Lee, I. Chang y B. Kim. *Bacterial communities in microbial fuel cells enriched with high concentrations of glucose and glutamate.* J. Microbiol. Biotechnol. 16, 1481–1484, 2006.
72. D. Lovley. *The microbe electric: conversion of organic matter to electricity.* Current opinion in Biotechnology. 19, 564-571, 2008.
73. G. Delaney *et al.* *Electron-transfer coupling in microbial fuel-cells.2. Performance of fuel-cells containing selected microorganism mediator substrate combinations.* Chem. Technol. Biotechnol. B Biotechnol. 34, 13–27, 1984.

74. C. Vega y I. Fernandez. *Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel-cells with Lactobacillus plantarum, Streptococcus lactis, and Erwinia dissolvens*. Bioelectrochem. Bioenerg. 17, 217–222, 1987.
75. Y. Choi *et al.* *Dynamic behaviors of redox mediators within the hydrophobic layers as an important factor for effective microbial fuel cell operation*. B. Kor. Chem. Soc. 24, 437–440, 2003.
76. K. Rabaey *et al.* *Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells*. Environ. Sci. Technol. 39, 3401–3408, 2003.
77. D. Bond y D. Lovley. *Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1548–1555, 2003.
78. S. Chaudhuri y D. Lovley. *Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells*. Nat. Biotechnol. 21, 1229–1232, 2003.
79. D. Park y J. Zeikus. *Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation*. Biotechnol. Bioeng. 81, 348-355, 2003.
80. B. Logan y J. Regan. *Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells*. Trends in Microbiology. 14, 512-518, 2006.
81. T. DiChristina, C. Moore y C. Haller. *Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by Shewanella putrefaciens requires ferE, a homolog of the pulE (gspE) type II protein secretion gene*. Bacteriol. 184, 142-151, 2002.
82. S. Ishii. *Characterization of a filamentous biopelícula community established in a cellulose-fed microbial fuel cell*. BMC Microbiol. 8, 6-15, 2008.
83. Y. Gorby *et al.* *Electrically conductive bacterial nanowires produced by Shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 11358-11363, 2006.
84. G. Reguera *et al.* *Extracellular electron transfer via microbial nanowires*. Nature 435, 1098–1101, 2005.
85. T. Pham *et al.* *Metabolites produced by Pseudomonas sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer*. Appl Microbiol Biotechnol. 77, 1119-1129, 2008.

86. S. Freguia, K. Rabae, Z. Yuan y J. Keller. *Syntrophic processes drive the conversion of glucose in microbial fuel cell anodes*. Environ Sci Technol. 42, 7937-7943, 2008.
87. D. Bond y D. Lovley. *Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by Geothrix fermentans*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2186-2189, 2008.
88. P. Ha, B. Tae y I. Chang. *Performance and bacterial consortium of microbial fuel cell fed with formate*. Amer. Chemical Soc. 22, 164–168, 2008.
89. Y. Fan *et al.* *Sustainable power generation in microbial fuel cells using bicarbonate buffer and proton transfer mechanisms*. Environ. Sci. Technol. 41, 8154–8158, 2007.
90. A. Borole, C. Hamilton, D. Aaron y C. Tsouris. *Investigating microbial fuel cell bioanode performance under different cathode conditions*. Biot. Prog. 25, 1630-1636, 2009.
91. A. Franks *et al.* *Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biopelícula*. Energ. Environ. Sci. 2, 113–119, 2009.
92. L. Zhuang, S. Zhou, Y. Li y Y. Yuan. *Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode*. Bioresour. Technol. 101, 3514-3519, 2010
93. Y. Feng, X. Wang, B. Logan y H. Lee. *Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells*. Appl Microbiol Biotechnol 78, 873-880, 2008.
94. X. Wang, Y. Feng y H. Lee. *Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell*. Wat. Sci. Technol. 57, 1117-1121, 2008.
95. Q. Wen *et al.* *Electricity generation and modeling of microbial fuel cell from continuous beer brewery wastewater*. Bioresour. Technol. 100, 4171–4175, 2009.
96. M. Cai, J. Liu y Y. Wei. *Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment*. Environ. Sci. Technol. 38, 3195-3202, 2004
97. Y. Yuan *et al.* *Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells*. Bioresour Technol. 102, 6887-6891. 2011
98. J. Biffinger *et al.* *The influence of acidity on microbial fuel cells containing Shewanella oneidensis*. Biosens Bioelectron. 24, 906-911. 2008.

99. G. Jadhav y M. Ghangrekar. *Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration*. Bioresource Technology, 100, 717-723. 2009
100. D. Park y J. Zeikus. *Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using Shewanella putrefaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 58–61, 2002.
101. J. Kostka *et al.* *Growth of iron(III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6256–6262, 2002.
102. L. Peng, S. You y J. Wang. *Electrode potential regulates cytochrome accumulation on Shewanella oneidensis cell surface and the consequence to bioelectrocatalytic current generation*. Biosens Bioelectron. 25, 2530-2533, 2010.
103. D. Park *et al.* *A novel electrochemically active and Fe(III)- reducing bacterium phylogenetically related to Clostridium butyricum isolated from a microbial fuel cell*. Anaerobe. 7, 297–306, 2001.
104. J. McKinlay y J. Zeikus. *Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3467–3474, 2004.
105. C. Pham *et. al.* *A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to Aeromonas hydrophila, isolated from a microbial fuel cell*. FEMS Microbiol. Lett. 223, 129-134, 2003.
106. D. Lovley. *Microbial fuel cells: Novel microbial physiologies and engineering approaches*. Current Opinion in Biotechnology. 17, 327-332, 2006.
107. D. Lovley. *Bug juice: Harvesting electricity with microorganisms*. Nature Reviews Microbiology. 4, 497-508, 2006.
108. F. Aulenta *et al.* *Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE*. Environ Sci Technol. 41, 2554-2559, 2007
109. B. Cohen. *The bacterial culture as an electrical half-cell*. J. Bacteriol. 21, 18-19, 1931.

110. H. Bennetto. *Electricity generation by microorganisms*. Biotechnology Education. 1, 163–168, 1990.
111. H. Bennetto, J. Stirling, K. Tanaka y C. Vega. *Anodic reactions in microbial fuel cells*. Biotechnol. Bioeng. 25, 559–568, 1983.
112. M. Hernandez *et al.* *Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 921–928, 2004.
113. M. Hernandez y D. Newman. *Extracellular electron transfer*. Cell. Mol. Life Sci. 58, 1562–1571, 2001.
114. D. Newman. *How bacteria respire minerals*. Science. 292, 1312-1313, 2001.
115. D. Newman y R. Kolter. *A role for excreted quinones in extracellular electron transfer*. Nature. 405, 94-97, 2000.
116. D. Lies *et al.* *Shewanella oneidensis MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biopelículas*. Appl. Envir. Microbiol. 71, 4414-4426, 2005.
117. T. Angenent *et al.* *Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater*. Trends in Biotechnology. 22, 477-485, 2004.
118. K. Rosso *et al.* *Nonlocal bacterial electron transfer to hematite surfaces*. Geochim. Cosmochim. 67, 1081–1087, 2003.
119. K. Straub y B. Schink. *Ferrihydrite-dependent growth of Sulfurospirillum deleyianum through electron transfer via sulfur cycling*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5744–5749, 2004.
120. C. Torres *et al.* *Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization*. Environ Sci Technol. 43, 9519-9524, 2009.
121. J. Champine *et al.* *Electron transfer in the dissimilatory iron-reducing bacterium Geobacter metallireducens*. Anaerobe. 6, 187–196, 2000.
122. M. Madigan, J. Martink y J. Parker. *Brock Biology of Microorganisms*.. Prentice Hall International, Inc. Upper Saddle River, NJ. 1999, 1061 p.

123. D. Bond *et al.* *Characterization of citrate synthase from Geobacter sulfurreducens and evidence for a family of citrate synthases similar to those of eukaryotes throughout the Geobacteraceae.* Appl Environ Microbiol. 71, 3858-3865, 2005.
124. D. Holmes. *Potential for quantifying expression of Geobacteraceae citrate synthase gene to assess the activity of Geobacteraceae in the subsurface and on current harvesting-electrodes.* Appl Environ Microbiol. 71, 6870-6877, 2005.
125. I. Karube, T. Matsunaga, T. Tsuru y S. Suzuki. *Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of Clostridium butyricum.* Biotechnol. Bioeng. 19, 1727–1733, 1977.
126. J. Niessen, U. Schröder y F. Scholz. *Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation: a bacterial fuel cell operating on starch.* Electrochem Commun. 6, 955–958, 2004.
127. J. Niessen, U. Schröder, F. Harnisch y F. Scholz. *Gaining electricity from in situ oxidation of hydrogen produced by fermentative cellulose degradation.* Letters in Applied Microbiology. 41, 286-290, 2005.
128. M. Rosenbaum, U. Schröder y F. Scholz. *In situ electrooxidation of photobiological hydrogen in a photobioelectrochemical fuel cell based on Rhodobacter sphaeroides.* Environmental Science & Technology. 39, 6328-6333, 2005.
129. M. Rosenbaum, U. Schröder y F. Scholz. *Utilizing the green alga Chlamydomonas reinhardtii for microbial electricity generation: a living solar cell.* Applied Microbiology and Biotechnology. 68, 753-756, 2005.
130. T. Shigematsu *et al.* *Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation.* J. Biosci. Bioeng. 96, 547–558, 2003.
131. S. Freguia *et al.* *Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids.* Bioresour. Technol. 101, 1233–1238, 2010.
132. J. Jang *et al.* *Electricity generation coupled to oxidation of propionate in a microbial fuel cell.* Biotechnol Lett. 32, 79-85, 2010
133. L. De Schampelaire *et al.* *Microbial community analysis of anodes from sediment microbial fuel cells powered by rhizodeposits of living rice plants.* Applied and Environmental Microbiology. 76, 2002-2008. 2010.

134. D. Xing, S. Cheng, J. Reagan y B. Logan. *Change in microbial communities in acetate- and glucose-fed microbial fuel cells in the presence of light*. Biosensors and Bioelectronics. 25, 105–111, 2009.
135. Y. Zhang *et al.* *Generation of electricity and analysis of microbial communities in wheat straw biomass-powered microbial fuel cells*. Appl Environ Microbiol. 75, 3389-3395, 2009.
136. X. Wang *et al.* *Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cells: Effect of anodic positive poised potential*. Electrochemical Acta. 54, 1109-1114, 2010.
137. M. Kaláb, A. Yang y D. Chabot. *Conventional scanning electron microscopy of bacteria*. Proceedings of the Royal Microscopical Society. 10, 42-61, 2008.
138. A. Glauert. *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. North-Holland Publishing Company. Tercera impresión. Amsterdam, The Netherlands. 1980, 110 p.
139. G. Greyer. *Lipid fixation*. Acta Histochemica Supplement. 19, 202, 1977.
140. G. Kim *et al.* *Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell*. J. Appl. Microbiol. 101, 698–710, 2006
141. J. Kassongo y C, Togo. *The potential of whey in driving microbial fuel cells: A dual prospect of energy recovery and remediation*. African J of Biotech. 9, 7885-7890, 2010.
142. L. Alzate-Gaviria, P. Sebastián y A. Pérez-Hernández. *Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater*. Int. J. Hydrogen Energy. 32, 3141-3146, 2008.
143. G. Dong. *Effect of substrate concentration and loading and catalyst type on the performance of a microbial fuel cell*. Master Thesis. University of Waterloo. 2009.
144. Y. Fan, H. Hu y H. Liu. *Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration*. J. Power Sources. 171, 348-354, 2007.
145. S. Puig *et al.* *Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells*. Bioresource Tech. 101, 9594–9599, 2010.

146. X. Zhang, S. Cheng, X. Huang y BE. Logan. *Improved performance of single-chamber microbial fuel cells through control of membrane deformation*. *Biosensors and Bioelectronics*. 25, 1825–1828, 2010.
147. L. Alzate-Gaviria *et al.* *Evaluación del desempeño e identificación de exoelectrógenos en dos tipos de celdas de combustible microbianas con diferente configuración en el ánodo*. *Interciencia*. 35, 19-25, 2010.
148. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th ed., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). Washington DC, USA. 2005.
149. BE. Logan. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons. New Jersey. 2008. 200 p.
150. E. Barsoukov y J. Macdonald. *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications*. 2nd ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ. 2005, 595 p.
151. R. Ramasamy *et al.* *Impact of initial biopelícula growth on the anode impedance of microbial fuel cells*. *Biotechnology and Bioengineering*. 101, 101-108, 2008.
152. R. Rojas-Herrera, J. Narváez-Zapata, M. Zamudio-Maya y M. Mena-Martínez. *A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments*. *Molecular Biotech*. 40, 13–17, 2008.
153. Q. Wang, G. Garrity, J. Tiedje y J. Cole. *Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy*. *Appl Environ Microbiol*. 73, 5261-5267, 2007.
154. J. Cole *et al.* *The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data*. *Nucleic Acids Res*. 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889. 2007.
155. J. Cole *et al.* *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. *Nucleic Acids Res*. 37 (Database issue): D141-D145; doi: 10.1093/nar/gkn879. 2009.
156. K. Tamur, J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. *MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0*. 2007. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596-1599, 2009.

157. J. Campanella, L. Bitincka y J. Smalley. *MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences*. BMC Bioinformatics. 4, 1-4, 2003.
158. O. Bretschger. *Electron transfer capability and metabolic processes of the genus Shewanella with applications to the optimization of microbial fuel cells*. Thesis Doctoral en Ingenieria. Universidad Southern California. 2008, 176 p.
159. H Tran *et al.* *Continuous bioelectricity production and sustainable wastewater treatment in a microbial fuel cell constructed with non-catalyzed granular graphite electrodes and permeable membrane*. Water Sci Technol. 61, 1819-1827, 2010.
160. S. Mohan, G. Mohanakrishna y P. Sharma. *Composite vegetable waste as renewable resource for bioelectricity generation through non-catalyzed open-air cathode microbial fuel cell*. Bioresource Tech. 101, 970-976, 2010.
161. M. Berhera *et al.* *Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH*. Bioelectrochem. 79, 228–233, 2010.
162. B. Erable *et al.* *Nitric acid activation of graphite granules to increase the performance of the non-catalyzed oxygen reduction reaction (ORR) for MFC applications*. Electrochem. Communications. 11, 1547-1549, 2009.
163. S. Ferguia *et al.* *Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells*. Electrochem. Acta. 53, 598-603, 2008.
164. K. Rabaey *et al.* *Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells*. ISME J. 2, 519-527, 2008.
165. K. Chae *et al.* *Methanogenesis control by employing various environmental stress conditions in two-chambered microbial fuel cells*. Bioresource Tech. 101. 5350-5357, 2010.
166. K. Rabaey, L. Angenet y U. Schröder. *Bioelectrochemical systems: from extracellular electron transfer to technological application*. Ed IWA. New York. 2010. 488 p.
167. S. Venkata *et al.* *Non-catalyzed microbial fuel cell (MFC) with open air cathode for bioelectricity generation during acidogenic wastewater treatment*. Bioelectrochem. 75, 130-135, 2009.

168. R. Rozendal *et al.* *Hydrogen production with a microbial biocathode*. Environ Sci Technol 42, 629-34, 2008.
169. Y. Yuan *et al.* *Bioelectricity generation and microcystins removal in a blue-green algae powered microbial fuel cell*. Journal of Hazardous Materials. 187, 591-595, 2011.
170. H. Liu *et al.* *Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration*. Environ. Sci. Technol. 39, 5488-5493. 2005.
171. S. Mohan, S. Srikanth y P. Sarma. *Non-catalyzed microbial fuel cell (MFC) with open air cathode for bioelectricity generation during acidogenic wastewater treatment*. Bioelectrochem. 75, 130-135, 2009.
172. B. Ringeinsen *et al.* *High power density from a miniature microbial fuel cell using Shewanella oneidensis DSP10*. Environ. Sci. Technol. 40, 2629-2634, 2006.
173. A. Borole *et al.* *A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile Acidiphilium cryptum*. Biotechnol Lett. 30, 1367-1372, 2008
174. A. Gates, D. Richardsin y J. Butt. *Voltammetric characterization of the aerobic energy-dissipating nitrate reductase of Paracoccus pantotrophus: exploring the activity of a redox-balancing enzyme as a function of electrochemical potential*. Biochem. 409, 159-168, 2008.
175. D. Metzler y C. Metzler. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. Academic Press. New York. Vol. 2. 2003, 1973 p.
176. R. Bernhardt y N. Inestrosa. *Neurodegenerative Diseases: From Molecular Concepts to Therapeutic Targets*. Niva Science Publishers. New York. 2008, 223 p.
177. M. Rodríguez-Manzanaque. *Caracterización y análisis funcional de una familia de glutaredoxinas monotiólicas en la levadura Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. Universitat de Lleida. Lleida. 2002
178. D. Widdowson y C. Anthony. *The microbial metabolism of C1 compounds. The electron-transport chain of Pseudomonas AM1*. Biochem J. 152, 349-356, 1975.
179. R. Garrett y C. Grisham. *Biochemistry*. Ed. Brooks. Boston. 2010, 1059 p.
180. G. Karp. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. Ed Wiley and Sons. USA. 2009, 832 p.

181. M. Houston. *Biochemistry primer for exercise science*. Versa Press. USA. 2006, 269 p.
182. B. Lower *et al.* *Antibody recognition force microscopy shows that outer membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of Shewanella oneidensis MR-1*. *Appl Environ Microbiol.* 75, 2931-2935, 2009.
183. C. Reardon *et al.* *Role of outer-membrane cytochromes MtrC and OmcA in the biomineralization of ferrihydrite by Shewanella oneidensis MR-1*. *Geobiology.* 8, 56-68, 2010.
184. M. Madigan y J. Martinko. *Brock biology of microorganisms*. Ed Pearson. USA. 2006, 1056 p.
185. H. Richter *et al.* *Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant Geobacter sulfurreducens on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer*. *Energy Environ. Sci.* 2, 506–516, 2009.
186. T. Shibamoto *et al.* *Redox potential of the primary plastoquinone electron acceptor Q(A) in photosystem II from Thermosynechococcus elongatus determined by spectroelectrochemistry*. *Biochemistry.* 48, 10682-10684, 2009.
187. S. Srikanth *et al.* *Electrochemical characterization of geobater sulfurreducens cells immobilized on graphite paper electrodes*. *Biotechnol Bioeng.* 99, 1065-1073, 2009.
188. M. Orazem y B. Tribollet. *Electrochemical impedance spectroscopy*. Ed Wiley. USA. 2008, 523 p.
189. R. Ramasamy *et al.* *Impedance spectroscopy as a tool for non-intrusive detection of extracellular mediators in microbial fuel cells*. *Biotech. And Bioeng.* 104, 882-291, 2009.
190. Z. Ren *et al.* *Characterization of Microbial Fuel Cells at Microbially and Electrochemically Meaningful Timescales*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2435-2441, 2011
191. X. Yuan, C. Song, H. Wang y J. Zhang. *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells*. Springer. Londres. 2010, 428 p.
192. Asesoría personal del M. en C Abdiel García. Asistente técnico de la empresa Micra Nanotecnología. Microscopía Electrónica (TESCAN) Microscopía Fuerza Atómica (Asylum Research). México, DF. 2011. Sitio web: www.micra.com.mx

193. A. Vázquez-Larios *et al.* *Effects of architectural changes and inoculum type on internal resistance of a microbial fuel cell designed for the treatment of leachates from the dark hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes.* *Int. J. Hydrogen Energy.* 36, 6199-6209, 2011.
194. C. Torres, A. Marcus y B. Rittmann. *Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 77, 689-697, 2007.
195. G. Luna, A. Dell'Anno y R. Danovaro. *DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments.* *Environmental Microbiology.* 8, 308-320, 2006.
196. G. Muyzer, E. De Waal y A. Uitterlinden. *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* *Applied and Environmental Microbiology.* 99, 695-700, 1993.
197. S. Altschul *et al.* *Basic local alignment search tool.* *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, 1990.
198. S. Mohan, S. Raghavulu, D. Peri y P. Sarma. *Integrated function of microbial fuel cell (MFC) as bio-electrochemical treatment system associated with bioelectricity generation under higher substrate load.* *Biosensors and Bioelectronics.* 24, 2021-2027, 2009.
199. L. Zhang *et al.* *Influences of initial pH on performance and anodic microbes of fed-batch microbial fuel cells.* *J Chem Technol Biotechnol.* 86, 1226–1232, 2011.
200. S. Jung y J. Reagan. *Influence of external resistance on electrogenesis, ethanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells.* *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 564-571, 2011.
201. S. Mohan, S. Raghavulu y P. Sarma. *Biochemical evaluation of bioelectricity production process from anaerobic wastewater treatment in a single chambered microbial fuel cell (MFC) employing glass wool membrane.* *Biosensors and Bioelectronics.* 23, 1326–1332, 2008.
202. L. Liu *et al.* *Occurrence of power overshoot for two-chambered MFC at nearly steady-state operation.* *Int. J. Hydrogen Energy.* 36, 13896-13899, 2011.

203. S. Bakhshian, H. Kariminia y R. Roshandel. *Bioelectricity generation enhancement in a dual chamber microbial fuel cell under cathodic enzyme catalyzed dye decolorization*. *Biores. Tech.* 102, 6761-6765, 2011.
204. E. Martin *et al.* *The influence of operational conditions on the performance of a microbial fuel cell seeded with mesophilic anaerobic sludge*. *Biochem. Eng. J.* 51, 132-139, 2010.
205. J. Biffinger *et al.* *Simultaneous analysis of physiological and electrical output changes in an operating microbial fuel cell with shewanella oneidensis*. *Biotech. and Bioeng.* 103, 524-531, 2009.
206. A. Borole *et al.* *Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems*. *Biochem. Eng. J.* 48, 71-80, 2009
207. J. Ok *et al.* *Bioelectricity production using seaweed biomass in microbial fuel*. Poster. Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste Venice. Italy. 2010
208. S. Tsujimura, K. Kano y T Ikeda. *Electrochemical oxidation of NADH catalyzed by diaphorase conjugated with Poly-1-vinylimidazole complexed with Os(2,2'-dipyridylamine)₂Cl*. *Chem Lett.* 10, 1022-1023, 2001
209. A. Manohar, O. Bretschger, K. Neelson y F. Mansfeld F. *The use of electrochemical impedance spectroscopy in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell*. *Bioelectrochem.* 72, 149-154, 2008
210. A. Borole *et al.* *Understanding long-term changes in microbial fuel cell performance using electrochemical impedance spectroscopy*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2740-2745, 2010
211. A. Hutchinson, J. Tokash y B. Logan. *Analysis of carbon fiber brush loading in anodes on startup and performance of microbial fuel cells*. *J. of Power Sources.* 196, 9213-9219, 2011
212. Z. Ren *et al.* *Characterization of microbial fuel cells at microbially and electrochemically meaningful time scales*. *Enviromental Sci. Tech.* 45, 2435-2441, 2011.

213. J. Sun, P. Zhang y Y. Hu. *Electrochemical characterization of the bioanode during simultaneous azo dye decolorization and bioelectricity generation in an air-cathode single chambered microbial fuel cell*. *Electrochem. Acta*. 56, 6874-6879, 2011
214. H. Oh, K. Jang y C. Chi. *Impedance characteristics of oxide layers on aluminium*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 20, 1340-1344, 1999.
215. B. Hirschorn *et al.* *Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters*. *Electrochem. Acta*. 55, 6218–6227, 2010
216. R. Compton y C. Banks. *Understanding voltammetry*. Imperial College. London. 2011, 429 p.

ANEXO 1

Tabla 17. Picos de reacción de las VC en cámara anódica, anolito y biopelícula, de las cuatro fases de estudio y sus probables reacciones. NI: no identificado.

VC	Fase	Picos vs SHE (Volts)		Posibles reacciones	
Cámara Anódica	I	Oxidación	0.460	Sitio T1 de enzima de <i>Myrothecium verrucaria</i>	
		Reducción	***	***	
	II	Oxidación	0.420	Citocromo aa ₃	
		Reducción	***	***	
	III	Oxidación	0.620	NI	
		Reducción	***	***	
	IV	Oxidación	0.120	Ferrocitocromo b ₂ (Fe ²⁺) → Ferricitocromo b ₂	
		Reducción	0.120	Ferrocitocromo b ₂ (Fe ²⁺) → Ferricitocromo b ₂	
Anolito	I	Oxidación	0.360	Ferrocitocromo f (Fe ²⁺) → Ferricitocromo f (Fe ³⁺) + e ⁻	
		Reducción	-0.220	FAD + 2H ⁺ + 2e ⁻ → FADH ₂ (coenzima libre) Glutaredoxinas Pili electroconductorio (<i>Geobacter</i>)	
	II	Oxidación	0.360	Ferrocitocromo f (Fe ²⁺) → Ferricitocromo f (Fe ³⁺) + e ⁻	
		Reducción	0.260	Citocromo c	
	III	Oxidación	0.520	NI	
		Reducción	***	***	
	IV	Oxidación	0.500	NI	
		Reducción	***	***	
	Biopelícula	I	Oxidación	***	***
			Reducción	***	***
II		Oxidación	0.230	Ferrocitocromo c (Fe ²⁺) → Ferricitocromo c (Fe ³⁺) + e ⁻ + 2H ⁺	
		Reducción	-0.140	Plastoquinona	
III		Oxidación	0.120	Ferrocitocromo b ₂ (Fe ²⁺) → Ferricitocromo b ₂	
		Reducción	0.001	[FAD] + 2H ⁺ + 2 e ⁻ → [FADH ₂]	
IV		Oxidación	0.230	Ferrocitocromo c (Fe ²⁺) → Ferricitocromo c (Fe ³⁺) + e ⁻ + 2H ⁺	
		Reducción	0.006	[FAD] + 2H ⁺ + 2 e ⁻ → [FADH ₂]	

Nota: Potenciales probables tomados de referencias 174-182, 208. Considerando potenciales vs SHE, a condiciones de pH 7