



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Minimización de resistencia interna e incremento de potencia
volumétrica en una celda de combustible microbiana mediante el
diseño de una cámara de nuevo tipo y rearreglo de electrodos”**

Tesis que presenta

M.C. Areli del Carmen Ortega Martínez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA

Directores de Tesis: **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

Dr. Omar Solorza Feria

México, DF

Enero 2013

Esta tesis se realizó bajo la Dirección del Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo y el Dr. Omar Solorza Fera en el laboratorio de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Areli del Carmen Ortega Martínez agradece a CONACYT por la beca con número de registro 199581, otorgada para el desarrollo de esta investigación

COMITÉ TUTORIAL



Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo (Director)
CINVESTAV-IPN
Depto. de Biotecnología y Bioingeniería
Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables



Dr. Omar Solorza Feria (Director)
CINVESTAV-IPN
Depto. de Química
Hidrógeno y Celdas de Combustible



Dr. Fernando José Esparza García
CINVESTAV-IPN
Depto. De Biotecnología y Bioingeniería
Fisiología Microbiana



Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola
CINVESTAV-IPN
Depto. De Biotecnología y Bioingeniería
Mejoramiento genético de microorganismos



Dra. Katy Juárez López
IBT-UNAM



Dr. Cutberto J. Juvencio Galíndez Mayer
ENCB-IPN
Depto. De Ingeniería Bioquímica

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda desinteresada de las personas aquí citadas.

Al Dr. Poggi-Varaldo y Dr. Solorza-Feria por la oportunidad para pertenecer a su grupo de trabajo y su apoyo incondicional durante este periodo. Gracias por creer en mi!!!

A mi comité tutorial por todo su apoyo.

Al M.C. Rafael Hernández Vera, el Lic. David Portilla Silva y la Ing. Ma. Teresa Sánchez Chávez por el apoyo técnico en el laboratorio de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables

Al Ing. Sebastián Citalán y al Ing. Andrés Rodríguez Castellanos por su apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio 47 del Departamento de Química

A la Ing. Ana Lilia Tirado Chamú por el apoyo técnico durante mi estancia en el IBT-UNAM

A la Maestra Elvira Ríos Leal por su cariño y apoyo técnico en mis ensayos de cromatografía

Al Ing. Cirino Rojas por su apoyo durante mi estancia en Central Analítica

A Blanca Reyna Arizona Anaya por el apoyo administrativo

A todos los estudiantes del GBAER: Ana, Carlos, Paula, Karlita, Sathish, Giovani, Luz, Liliana, Wendy, Eli, German, Cuauhtémoc, Diana. Muchas gracias por su ayuda

A mi amiga Lizet por ser parte de esta travesía, por sus ánimos para seguir adelante, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias amiga por motivarme a entrar aquí

A mi amiga Beni Camacho por su amistad, por su apoyo incondicional, por los sueños vendidos, por las grandes pláticas y por ser mi familia durante mi estancia doctoral

A mi amiga Jussica que siempre creyó en mí y me alentó a seguir adelante

A Adri por ser parte de aquellas noches en vela para darme ánimos

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme el regalo más grande que es la vida, por permitirme llegar hasta aquí y lograr uno más de mis objetivos

A MI PADRE

Por el gran amor que me diste, por los ejemplos de perseverancia y constancia que siempre me infundaste y el valor para salir adelante. Esta meta alcanzada lleva tu nombre

A MI MADRE

Por haberme apoyado en todo momento, por tus consejos, tus valores, la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y por todo tu cariño

A MI HIJA VALERIA

Por la espera inquebrantable, por tu infinito amor, por tu sonrisa que ilumina siempre mi camino, por ser el motor para seguir adelante y por pintar mi vida de colores. Te amo princesa.

A MIS HERMANOS

Ivan y Chepis por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por el apoyo incondicional, por aquellos sueños que se han hecho realidad, los quiero mucho

A TI RICARDO

Por ser mi inspiración, por el ejemplo de lucha y perseverancia, por tu comprensión y apoyo y tu gran amor. Te amo

A MIS TÍOS

Fernando, Saris, Teresa, Belem, por su gran apoyo para concluir esta meta y por estar al pendiente de mí. Muchas gracias!!

A MI ABUELITA

Carmelita por todas sus oraciones para concluir esta meta

A MIS PRIMOS Y SOBRINOS

Mara, Romy, Oswaldo, Monse, Chío, Santi, Edgar por su apoyo en todo momento

Índice	Página
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Notación	vi
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción	1
1.1 Fuentes de energía renovables y no renovables	1
1.2 Alternativas energéticas	2
1.3 Celdas de combustible	3
1.3.1 Principios de una celdas de combustible microbiana	4
1.3.2 Mecanismos de transferencia de electrones en una celda de combustible microbiana	5
1.3.2.1 Transferencia directa vía citocromos tipo c en la membrana externa	6
1.3.2.2 Transferencia de electrones de amplio rango vía nanocables microbianos	7
1.3.2.3 Transferencia de electrones vía mediadores de electrones solubles	10
1.4 Procedimientos de enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas	11
1.4.1 Enriquecimiento dentro de la CCM por funcionamiento continuo	12
1.4.2 Enriquecimiento externo usando aceptores de electrones metálicos tales como manganeso y algunas formas de hierro	13
1.4.3 Aplicación de diferentes potenciales anódicos	14
1.5 Efectos de la arquitectura y de los materiales de construcción sobre el rendimiento de una CCM.	15
1.6 Resistencia interna	18
1.6.1 Resistencia de un conductor	18
1.6.2 Resistividad eléctrica	19
1.6.3 Resistencia interna en CCM	20
1.6.3.1 Curva de polarización	22
1.7 Biocátodos	23
1.7.1 Biocátodos aerobios	24
1.7.2 Biocátodos anaerobios	25
1.7.3 Remoción de compuestos xenobióticos en CCMs equipadas con biocátodos	25
2. Justificación	33
3. Hipótesis	35
3.1 Hipótesis general	35
3.2 Hipótesis específica	35
4. Objetivos	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos específicos	36
5. Materiales y métodos	37
5.1 Plan de trabajo	37
5.2 Actividad 1: Diseño, construcción y pruebas preliminares de la celda de combustible microbiana paralelepípeda de nuevo tipo y CCM estándar	38
5.2.1 Propósito	38
5.2.2 Diseño de la celda de combustible microbiana paralelepípedo de nuevo tipo	38
5.2.3 Diseño de la celda de combustible microbiana estándar	39
5.2.4 Activación de la membrana de intercambio protónico Nafion	40
5.2.5 Preparación y depósito de la tinta catalítica en la membrana Nafion	41
5.3 Actividad 2: Caracterización de la CCM paralelepípeda de nuevo tipo y la CCM estándar	41

5.3.1 Propósito	41
5.3.2 Extracto modelo y biocatalizadores	41
5.3.3 Determinación de la resistencia interna de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda por curva de polarización	42
5.3.4 Métodos analíticos y cálculos	43
5.4 Actividad 3: Operación de las celdas de combustible microbianas alimentadas con influente sintético e inóculo sulfato-reductor	44
5.4.1 Propósito	44
5.4.2 Descripción del ensayo de operación en lote de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda a temperatura ambiente	44
5.5 Actividad 4: Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas (BEAs)	44
5.5.1 Propósito	44
5.5.2 Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas en botellas serológicas	44
5.5.3 Determinación de la reducción de Fe(III)	45
5.6 Actividad 5: Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar alimentadas con influente sintética e inóculo enriquecido	46
5.6.1 Propósito	46
5.6.2 Evaluación del desempeño de la celda de combustible microbiana	46
5.7 Actividad 6: Diseño y construcción de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	46
5.7.1 Propósito	46
5.7.2 Diseño de la CCM equipada con biocátodo	46
5.8 Actividad 7: Evaluación del desempeño de una CCM equipada con biocátodo en la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo	48
5.8.1 Propósito	48
5.8.2 Evaluación de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	48
5.9 Actividad 8: Implementación de técnicas de biología molecular para la caracterización de consorcios microbianos	48
5.9.1 Propósito	48
5.9.2 Análisis de comunidades bacterianas	49
5.9.3 Secuenciación y análisis filogenético	49
5.9.4 Cálculo de índices ecológicos	50
6. Resultados	52
6.1 Actividad 1: Diseño, construcción y pruebas preliminares de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda estándar	52
6.1.1 Diseño de la celda de combustible microbiana paralelepípeda	52
6.1.2 Configuración de la CCM paralelepípeda de nuevo tipo	52
6.2 Actividad 2: Caracterización de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar	53
6.2.1 Determinación de la resistencia interna de la celda de combustible microbiana estándar con inóculo sulfato reductor e inóculo enriquecido	53
6.2.2 Determinación de la resistencia interna de la celda de combustible microbiana paralelepípeda con inóculo sulfato reductor e inóculo enriquecido	57
6.3 Actividad 3: Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar alimentadas con afluente sintético.	62
6.3.1 Operación en lote de la celda de combustible microbiana estándar alimentada con influente sintético e inóculo sulfato reductor	62
6.3.2 Operación en lote de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con influente sintético e inóculo sulfato reductor	63
6.4 Actividad 4: Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas (BEAs)	64
6.4.1 Procedimiento de enriquecimiento de bacterias reductoras de Fe(III)	64
6.5 Actividad 5: Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar con influente sintético e inóculo enriquecido	66
6.5.1 Operación en lote de la celda de combustible microbiana estándar alimentada con influente sintético e inóculo enriquecido	66

6.5.2 Operación en lote de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con influente sintético e inóculo enriquecido	67
6.6 Actividad 6. Diseño y construcción de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	68
6.6.1 Diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	68
6.7 Actividad 7. Evaluación del desempeño de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo en la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo	69
6.7.1 Caracterización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	69
6.8 Actividad 8: Implementación de las técnicas de biología molecular para la caracterización de consorcios microbianos	71
7. Conclusión	74
8. Referencias	75

Índice de figuras	Página
Figura 1. Transición global de los sistemas energéticos. Adaptado de Dunn, 2002	1
Figura 2. Estructura molecular de diversos tipos de combustibles. Adaptado de Dunn 2002.	3
Figura 3. Mecanismos para la transferencia extracelular de eelctrones por <i>G. Sulfurreducens</i> (Lovley 2006)	7
Figura 4. Los pili de <i>G. sulfurreducens</i> . Micrografía por transmisión electrónica de células creciendo en cristales de óxidos de Fe (III). a) Citrato Férrico soluble. Las flechas indican donde se ubica los Pili. b) Un acercamiento en una escala en bars de 0.5 μm .	9
Figura 5. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión Muestra células de cepas silvestres.	10
Figura 6. Materiales de A) mayor longitud y B) menor longitud al paso de corriente eléctrica	19
Figura 7. Materiales de A) mayor sección transversal y B) menor sección transversal al paso de corriente eléctrica	19
Figura 8. Representación gráfica de la fórmula de resistividad	20
Figura 9. Teorema de Jacobi. Adaptado de Halliday <i>et al.</i> 2006	23
Figura 10. a) CCM con cátodo abiótico; b) CCM equipada con biocátodo	24
Figura 11. CCM trabajando con un biocátodo sobre la reducción de Cr(VI)	26
Figura 12. Reducción microbiana de TCE en CCM equipada con biocátodo	27
Figura 13. Diagrama de plan de trabajo	37
Figura 14. Diseño de la celda de combustible microbiana paralelepípeda	38
Figura 15. Configuración de la CCM estándar. Adaptado de Carmona-Martínez <i>et al.</i> 2006	39
Figura 16. Diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	47
Figura 17. Celda de combustible microbiana estándar	52
Figura 18. Celda de combustible microbiana paralelepípeda	53
Figura 19. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana estándar: (A) inóculo sulfato-reductor, y (B) inóculo enriquecido	54
Figura 20. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con inóculo sulfato-reductor: (A) caras conectadas en serie y (B) caras conectadas en paralelo	58
Figura 21. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con inóculo enriquecido: (A) caras conectadas en serie y (B) caras conectadas en paralelo	59
Figura 22. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana estándar operada durante 7 días alimentada con inóculo sulfato-reductor	63
Figura 23. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana paralelepípeda operada durante 7 días alimentada con inóculo sulfato-reductor	64
Figura 24. Procedimiento de transferencias seriales: (A) Inoculación, (B) Primera transferencia, (C) Segunda transferencia, (D) Tercera transferencia	66
Figura 25. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana estándar operada durante 7 días alimentada con inóculo enriquecido	67
Figura 26. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana paralelepípeda operada durante 7 días alimentada con inóculo enriquecido	68
Figura 27. Celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.	69
Figura 28. Curva de polarización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	70

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Aplicación de biocátodos en celdas de combustible microbianas	28
Tabla 2. Reacciones en biocátodos	32
Tabla 3. Caracterización de la celda de combustible microbiana estándar cargada con inóculo sulfato-reductor e inóculo enriquecido	55
Tabla 4. Caracterización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda cargada con inóculo sulfato-reductor e inóculo enriquecido y conectada en serie y paralelo	60
Tabla 5. Desempeño de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda operadas durante 7 días e inoculadas con sulfato-reductor	64
Tabla 6. Concentración de Fe^{+2} y factor de enriquecimiento ϵ durante el procedimiento de transferencias seriales	65
Tabla 7. Desempeño de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda operadas durante 7 días e inoculadas con enriquecido	68
Tabla 8. Caracterización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo	71
Tabla 9. Diversidad bacteriana de la biopelícula de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con diferentes inóculos	72
Tabla 10. Índices ecológicos de los inóculos	73

Notación

A	Área superficial de los electrodos
BEA	Bacterias Electroquímicamente activas
CA	Circuito abierto
CCM-1	Celda de combustible microbiana estándar
CCM-2	Celda de combustible microbiana paralelepípeda
CCM-3	Celda de combustible microbiana equipada con biocátodo
CCM	Celda de combustible microbiana
CCM-SM	Celda de combustible microbiana sin mediadores
CMA	Cátodo-membrana-ánodo
DQO	Demanda química de oxígeno
E_{CCM}	Voltaje
E_{OX}	Voltaje del compuesto oxidante
E_{comb}	Voltaje del combustible
$E_{CCM,CA}$	Voltaje a circuito abierto
$[Fe^{+2}]_{inicial}$	Concentración inicial de Fe(II)
$[Fe^{+2}]_{final}$	Concentración final de Fe(II)
H'	Índice de diversidad
I_{CCM}	Intensidad de corriente generada por la celda
In-E	Inóculo enriquecido
In-SR	Inóculo sulfato-reductor
J'	Índice de equidad de Pielou
L	Distancia entre electrodos
MIP	Membrana de intercambio protónico
n_{AB}	Número de bandas que están presentes en la línea A (o comunidad A) y en la línea B (o comunidad B)
n'_A	Número de bandas en la línea A (o comunidad A) ausentes en la línea B (o comunidad B)
n'_B	Número de bandas en la línea B (o comunidad B) ausentes en la línea A (o comunidad A)
n_A	Número total de bandas en la línea A (o comunidad A)
n_B	Número total de bandas en la línea B (o comunidad B)
P_{CCM}	Potencia generada por la celda
P_{An}	Densidad de potencia generada por la celda
p_i	Número de especies
P_V	Potencia volumétrica generada por la celda
R	Resistencia eléctrica
R_{ext}	Resistencia externa
R_{int}	Resistencia interna
R_{ohmic}	Resistencia óhmica
R_{ion}	Resistencia iónica
S	Número total de especies
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
t_{lag}	Tiempo lag
V_{CCM}	Volumen de la CCM

Caracteres Griegos

ρ	resistividad del electrolito
κ	conductividad del electrolito
ξ	relación área superficial de los electrodos entre volumen de la celda
ϵ	Factor de enriquecimiento
Δ_p	índice de divergencia de Poggi

RESUMEN

Las celdas de combustible microbianas (CCMs) son dispositivos que convierten la energía química en electricidad a través de la actividad catalítica de los microorganismos. Entre los diversos factores que tienen impacto sobre el rendimiento de las CCMs, se encuentra la resistencia interna (R_{int}) siendo éste uno de los factores más importantes.

Uno de los objetivos de esta investigación fue diseñar y caracterizar una novedosa celda de combustible microbiana de estructura paralelepípeda con la finalidad de disminuir la R_{int} e incrementar la potencia volumétrica (P_V). Por otro lado, esta investigación también tuvo como propósito, estudiar el efecto de inóculos sulfato-reductor (SR) y enriquecido (E), sobre las características de una celda de combustible microbiana estándar de una sola cámara (CCM-1) y una celda de combustible microbiana paralelepípeda (CCM-2), y analizar las comunidades microbianas de las celdas operadas con ambos inóculos.

La CCM-2 consistió de una estructura paralelepípeda con un volumen de operación de 270 mL. Las cinco caras de la celda estuvieron equipadas con electrodos tipo “emparedado” (cátodo-membrana-ánodo). Las resistencias internas fueron de 400 y 84 Ω , y 230 y 292 Ω ; mientras que las potencias volumétricas fueron de 655 y 1800 mW/m^3 , y 1772 y 5804 mW/m^3 para las caras conectadas en serie y paralelo y la CCM-2 alimentada con inóculos SR y E, respectivamente. Las densidades de potencia fueron de 18.4 y 50 mW/m^2 , y 64 y 209 mW/m^2 para las caras conectadas en serie y paralelo y la CCM-2 alimentada con inóculo sulfato-reductor y enriquecido, respectivamente. La CCM-1 de 150 mL consistió de una sola cámara con electrodos separados por una distancia de 7.8 cm. Los valores de R_{int} fueron de 4602 y 1592 Ω , y las potencias volumétricas fueron de 52 y 76 mW/m^3 , para la CCM-2 alimentada con inóculo sulfato-reductor y enriquecido, respectivamente.

Por otro lado, el inóculo enriquecido se obtuvo mediante transferencias seriales y se alcanzó una concentración final de 42 mM de Fe^{+2} en la tercera transferencia. La concentración inicial de $Fe(III)$ fue de 55 mM. En la etapa de inoculación, en el cuarto día se alcanzó una concentración de 10 mM de Fe^{+2}

mientras que en las últimas transferencias esta misma concentración se logró en el primer día de incubación, esto fue una evidencia del incremento en bacterias reductoras de Fe(III).

En lo que respecta a caracterización de comunidades microbianas, hubo una diferencia significativa en la composición de ambos inóculos. *Clostridia* predominó en la comunidad de la biopelícula derivada del inóculo SR, esta especie se cree que podría ser la responsable de la transferencia directa de los electrones al electrodo de trabajo de las CCMs, según reportes en literatura. Los microorganismos predominantes en la biopelícula derivada del inóculo enriquecido pertenecen a la clase *Deferribacteres*, esta clase es conocida por contener citocromos tipo *c*. Evidencias actuales sugieren que existe una serie de citocromos tipo *c* asociados a la membrana interna, el periplasma y la membrana externa. Los valores para el índice de Shanon fueron de 1.27 y 1.38 para las comunidades microbianas de los inóculos SR y E, respectivamente.

Como conclusión, la conexión en paralelo de las caras de la celda mejoró significativamente las características electroquímicas de la CCM-2. El inóculo enriquecido fue mejor que el sulfato-reductor sobre el rendimiento de las CCMs; así mismo, el rendimiento de la CCM-2 fue mejor que la CCM-1, alimentadas con ambos inóculos. La comunidad microbiana derivada del inóculo SR fue poco diversa que la comunidad derivada del inóculo E. Ambos inóculos presentan microorganismos que son electroquímicamente activos.

ABSTRACT

Microbial fuel cells (MFC) are electrochemical devices that convert chemical energy into the form electricity through the catalytic activity of microorganisms. Among several factors that have an impact on microbial fuel cell (MFC) performance, the internal resistance (R_{int}) is of paramount significance. The aim of this work was to design and characterize a novel, multiface parallelepiped MFC in the perspective of decreasing the R_{int} and increasing the volumetric power (P_v) output.

This work had a double purpose: (i) to study the effect of inoculum (sulfate-reducing (SR) and enriched (E) inocula) on the characteristics of one-chamber standard microbial fuel cell (MFC-S) and parallelepiped cell and (ii) to analyze the bacterial communities in cells operated with either SR or E.

The MFC-P consisted of a parallelepiped built in plexiglass with a liquid volume of 270 mL. Five faces of this cell were fitted with 'sandwich' cathode-membrane-anode assemblages (CMA). The internal resistances were 400 and 84, and 230 and 292 Ω ; and volumetric powers were 655 and 1800 mW/m^3 , and 5804 and 1772 mW/m^3 for the faces connected in series and parallel and the MFC-P loaded with SR and E, respectively. Anode density powers were 18.4 and 50 mW/m^2 , and 209 and 64 mW/m^2 for the faces connected in series and parallel and the MFC loaded with SR and E, respectively. The MFC-S of 150 mL consisted of one-chamber plexiglass cell with electrodes separated 7.8 cm. The values of R_{int} were 4602 and 1593 Ω , and volumetric powers were 52 and 76 mW/m^3 , for the MFC-S loaded with SR and E, respectively.

Regarding the enrichment of the microbial inoculum, we could achieve a 419 mM Fe^{+2} concentration at the end of the 3rd and last transfer; this was an evidence of the increase of either the Fe(III) reducing microflora, or Fe(III)-reducing activity, or both. Furthermore, 100 mM Fe^{+2} concentration was achieved on day 4 of the first transfer, while this concentration in last transfers was achieved in just the first day of incubation. There was a significant difference in community composition between both inocula. *Clostridia* predominated in the community of the

biofilm derived from the SR inoculum; this class is believed to be responsible for the direct electron transfer to the anode according to other literature reports. Predominant microbes in the biofilm derived from the E belonged to *Deferribacteres* class; this class is known to contain c-type cytochromes. Current evidence suggests that a series of c-type cytochromes associated with the inner membrane, the periplasm, and the outer membrane might interact to transfer electrons to the outer membrane surface. Shannon indices were 1.27 and 1.38 for the community derived from SR and E inoculum, respectively.

As conclusion, parallel connection of cell faces significantly improved the electrochemical characteristics of the cell. E inoculum was better than SR on the performance of the MFCs as well as, performance of MFC-P was better than MFC-S performance, feed with both inoculua. Also, the SR-derived community was slightly diverse than the E-derived one. Both communities harbored microbes that are electrochemically active.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fuentes de energía renovables y no renovables

Para satisfacer nuestras necesidades como sociedad, es indispensable la utilización de energía que puede ser provista tanto de fuentes no renovables como de renovables. Dentro de las fuentes no renovables con más demanda han sido los combustibles fósiles que presentan diversas desventajas, además de escasear en un futuro cercano tienden a emitir diversos contaminantes en su combustión.

La mayor parte de la energía empleada actualmente en el mundo proviene de los combustibles fósiles. Las sociedades del siglo XX son llamadas correctamente “sociedades de hidrocarburos” porque utilizan diez veces más energía que en el siglo XIX (Dunn, 2002) (Fig. 1). Este aumento de la demanda fue satisfecho principalmente por combustibles fósiles (90% del mercado mundial).

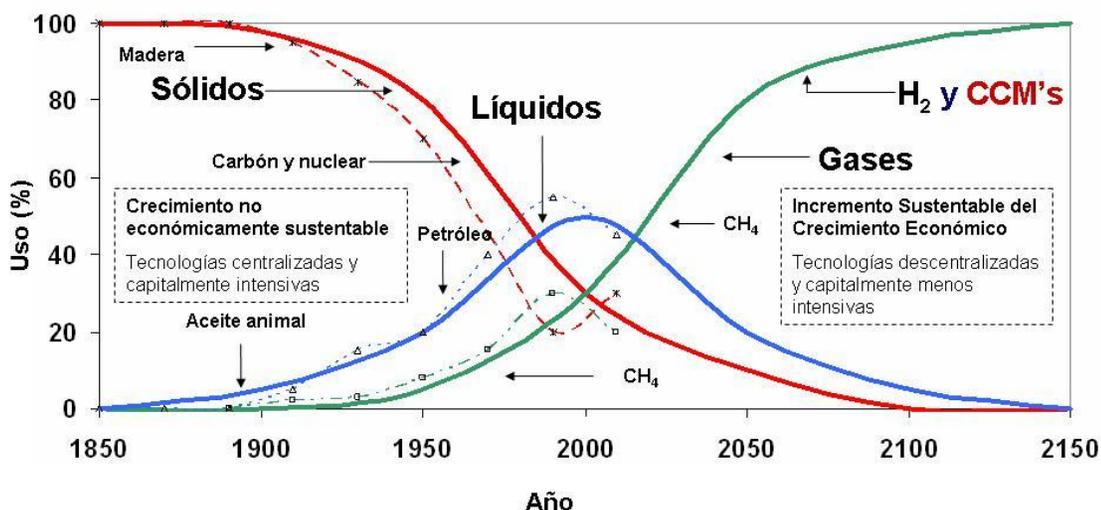


Figura 1. Transición global de los sistemas energéticos. Adaptado de Dunn, 2002.

Por otro lado, los combustibles renovables presentan una alternativa prometedora debido al “mínimo” impacto negativo al ambiente (Elam, 2003: Wunshiers y Lindbland, 2002).

Dentro de las fuentes energéticas renovables y sostenibles, es posible mencionar la energía solar, eólica, hidráulica y aquella que puede ser obtenida a partir de biomasa. Dentro de la energía obtenida a partir de biomasa se encuentran los combustibles no convencionales, como metanol, etanol o biogás (Elam, 2003; Wünschiers y Lindbland, 2002). La disponibilidad de algunas fuentes energéticas renovables depende de la localización geográfica de tales sistemas, es por esto que un factor primordial a evaluar es la cantidad de materia prima para extraer energía.

1.2 Alternativas energéticas

Dentro de los procesos que emplean biomasa como materia prima para la obtención de energía, se destacan principalmente los que utilizan microorganismos, como bacterias, hongos, algas, entre otros; ya que al utilizar biomasa como materia prima, se da un doble enfoque al proceso, por un lado al tratamiento de biomasa como materia prima y por otro, la obtención de energía aprovechable del mismo (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997).

En los procesos que se utiliza biomasa como sustrato, se busca la degradación completa de la misma. En ocasiones esto no es posible, como la obtención de H₂ a partir de biomasa, mediante la utilización de inhibidores de la metanogénesis, en la cual, sólo se logra la degradación parcial de la biomasa adicionada al sistema, lo que conlleva a la consecuente generación de metabolitos orgánicos extraíbles (Sparling *et al.*, 1997).

Estos últimos son candidatos de utilizarse para la generación adicional de energía, ya sea por un sistema acoplado metanogénico o por medio de bacterias fototróficas capaces de producir H₂ como combustible o por medio de una celda de combustible microbiana (CCM)(Carmona-Martínez *et al.*, 2007).

Por otro lado, la energía obtenida a partir de biomasa representa una fuente de obtención renovable y sostenible a futuro. Por ejemplo, el tratamiento de residuales municipales mediante procesos anaerobios genera biogás como combustible que con algunas modificaciones del proceso se obtienen cantidades

importantes de H_2 (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006b; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006a; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005b; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005a). Este último conocido por ser un combustible ambientalmente amigable (Lay *et al.*, 2003), debido a su carencia de átomos de carbono u otros elementos precursores de contaminantes en su molécula (Fig. 2). Como una alternativa adicional, la obtención de energía eléctrica se presenta como una tecnología atractiva e innovadora, mediante la cual la materia orgánica soluble genera una diferencia de potencial traduciéndose en una corriente eléctrica.

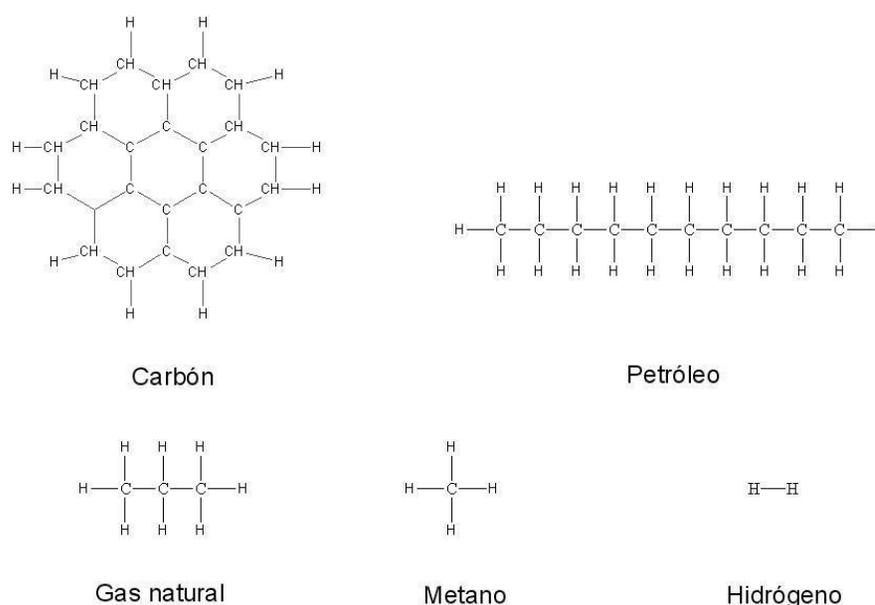


Figura 2. Estructura molecular de diversos tipos de combustibles. Adaptado de Dunn, 2002.

1.3 Celdas de combustible

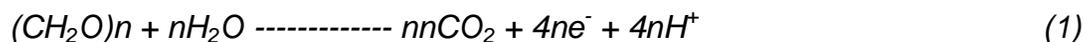
Las celdas de combustible químicas son dispositivos que convierten energía química directamente a electricidad. La conversión química ocurre en un electrodo anaerobio, donde se emplea un catalizador para acelerar la oxidación de un combustible específico (H_2 , CH_4 , CH_3OH). Los electrones de esta oxidación son transportados hacia el cátodo por el exterior, mientras que los protones pasan a través de una membrana de intercambio protónico hacia el cátodo. Los protones y

electrones son usados para reducir el oxígeno a agua, por una reacción catalizada en el electrodo catódico.

1.3.1 Principios de una celda de combustible microbiana

Las CCMs convierten energía química en electricidad por medio de la actividad catalítica de los microorganismos.

Las CCMs comparten muchas similitudes con las celdas de combustible químicas. El combustible es oxidado en una cámara anódica anaerobia, pero en lugar de un elemento catalizador, las bacterias son usadas para catalizar la oxidación del combustible. Como los microorganismos oxidan los donadores de electrones (combustible), los electrones resultantes son transferidos del ánodo, el cual está separado del cátodo por una membrana de intercambio protónico (reacción de oxidación en el ánodo, ecuación 1);



Los electrones del ánodo se transfieren a través de un circuito externo al cátodo aireado. Esta transferencia es inducida por la diferencia de potencial entre los electrodos del ánodo y el cátodo. Una reacción de reducción de oxígeno toma lugar en el cátodo utilizando los electrones transferidos, los protones, transportados a través de la membrana, y el oxígeno molecular. (Reacción de reducción en el cátodo, ecuación 2);



Bajo la condición de circuito cerrado, la potencia disponible de la CCM (P_{CCM}) depende del voltaje de la celda (V_{CCM}) y la corriente de la celda (I_{CCM}) (ecuación 3). Los últimos factores están vinculados por la aplicación de resistencia usando la Ley de Ohm en la cual R representa la resistencia (ecuación 4). El voltaje ideal de la celda es la diferencia entre los potenciales del compuesto

oxidante y el combustible ($E_{OX} - E_{Comb}$), sin embargo las pérdidas irreversibles (sobrepotencial) son resultado de las limitaciones cinéticas (ecuación 5).

Las cinéticas de un sistema electroquímico pueden ser de difusión controlada (control de transporte de masa) y/o activación controlada (control de transferencia de carga). El control de la difusión se plantea cuando la concentración del flujo del combustible o del oxidante llega a ser limitado. El control de transferencia de carga domina cuando hay valores altos de resistencia de los materiales de los electrodos, los electrolitos y/o la membrana de intercambio protónico. La transferencia de carga y el transporte de masa son afectados también por la dimensión y geometría del electrodo en la CCM. Finalmente, ambos tipos de limitaciones cinéticas pueden disminuir la generación de potencia.

$$P_{CCM} = V_{CCM} \times I_{CCM} \quad (3)$$

$$V_{CCM} = I_{CCM} \times R \quad (4)$$

$$V_{CCM} = (E_{OX} - E_{Comb}) - \eta \quad (5)$$

Las CCMs tienen algunas diferencias notables a las celdas de combustible químicas, las cuales relacionan el hecho que en lugar de químicos, emplean catalizadores vivientes. Las bacterias emplean como combustible diferentes compuestos y no se ven limitadas por un sólo sustrato, además estos microorganismos tienen la habilidad de reproducirse y pueden ser optimizadas para una amplia variedad de condiciones físicas y químicas.

1.3.2 Mecanismos de transferencia de electrones en una celda de combustible microbiana

Estudios recientes han expandido grandemente el rango de microorganismos conocidos que también pueden funcionar como microorganismos reductores de electrodos en el ánodo o como microorganismos oxidantes de electrodos en el

cátodo. Los microorganismos que pueden oxidar completamente compuestos orgánicos, con un electrodo sirviendo como el único aceptor de electrones, se espera que sean, primeramente, productores de potencia (Lovley 2006).

Desde que los microorganismos actúan como un catalizador en la transferencia de electrones del substrato al ánodo, la selección de un cultivo microbiano de alto rendimiento (ya sea puro o mezcla) es de crucial importancia en CCMs.

Diversos mecanismos de transferencia de electrones al ánodo ha sido propuesto incluyendo: (i) transferencia de electrones directa vía citocromos tipo c en la membrana externa, (ii) transferencia de electrones de amplio rango vía nonocables microbianos, y (iii) transferencia de electrones vía mediadores de electrones solubles. Tales mecanismos son importantes dependiendo de los microorganismos y el grosor de la biopelícula en el ánodo (Lovley 2006).

1.3.2.1 Transferencia directa vía citocromos tipo c en la membrana externa

Shewanella putrefaciens MR-1 es un microorganismo modelo para el estudio de los procesos de transferencia de electrones en el comportamiento anódico de una CCM, porque es capaz de transferir directa e indirectamente electrones a los aceptores de electrones sólidos con L-lactato como el donador de electrones (Rosembaum *et al.* 2007) Durante la transferencia directa, las proteínas citocromos tipo c de la membrana externa facilita la respiración de los microorganismos con, por ejemplo, electrodos. *S. putrefaciens* puede también transferir electrones indirectamente con la ayuda de (ribo)flavinas como mediadores de electrones (Marsili *et al.* 2008, von Canstein *et al.* 2008).

Se reportó que aproximadamente el 80% de los citocromos anclados a la membrana de *S. putrefaciens* durante su crecimiento anaerobio, están localizados en la membrana externa (Myers and Myers 1992). Cuatro distintos citocromos han sido identificados en una fracción de la membrana de la bacteria, y el contenido de un citocromo tipo c de 83 kDa fue menor en las células que crecieron bajo condiciones aerobias que en aquellas células que crecieron anaeróticamente

Por otro lado, la manipulación experimental, el análisis electroquímico y los modelos de estudio, han sugerido que *G. sulfurreducens* transfiere electrones al ánodo directamente gracias a su capacidad de producir alrededor de 100 citocromos tipo c que se encuentran codificados en su genoma y que se ha encontrado que se relacionan directamente con la transferencia de electrones a metales, algunos de ellos son MacA, PpcA, OmcB, OmcE, OmcS, OmcZ (Fig. 3).

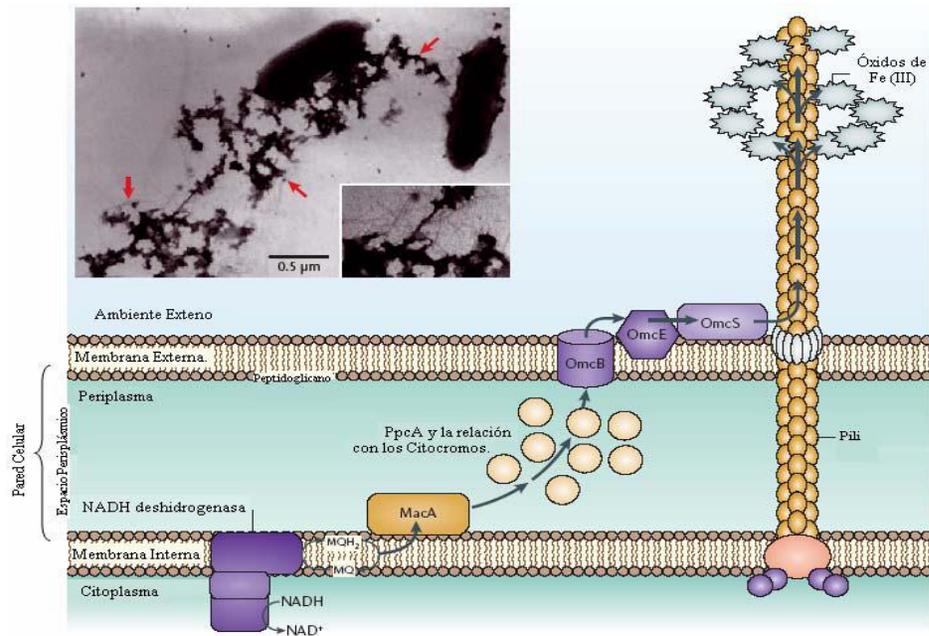


Figura 3. Mecanismo para la transferencia extracelular de electrones por *G. sulfurreducens* (Lovley 2006).

1.3.2.2 Transferencia de electrones de amplio rango vía nanocables microbianos

El genoma de *G. sulfurreducens* ya ha sido secuenciado y se ha obtenido información valiosa acerca de su metabolismo y estrategias de supervivencia. Pero sin lugar a dudas abre un camino para el entendimiento de los mecanismos que esta bacteria emplea, en los procesos bioquímicos que participan en la transferencia de electrones, tanto para la reducción de metales como para la producción de electricidad (Lovley *et al.* 2012).

Recientemente se ha encontrado que los pili de *G. sulfurreducens*, presentan la característica de ser los conductores de la electricidad a óxidos de Fe(III), Mn(IV) (ambiente natural) y a electrodos (laboratorio) comportándose como nanocables. Los electrones generados en el metabolismo central son

transportados fuera de la célula, tanto por los citocromos presentes en la membrana externa como por el pili. Los procesos de dicha transferencia de electrones es el resultado de la respiración anaeróbica y la reducción desasimilatoria de metales es de gran importancia. La producción de los pili, así como la formación de la biopelícula se encuentra estrictamente regulado en esta bacteria.

Regulación de la expresión de la pilina. En *G. sulfurreducens* se han identificado numerosos genes que participan en la biogénesis de los pili. El gen *pilA* codifica para la proteína estructural (pilina). PilR y PilS son proteínas que constituyen un sistema regulatorio de dos componentes involucrados en la expresión siendo en este caso PilR, el activador trascricional y PilS el sensor (Nuñez *et al.* 2006). Además de *pilB*, *pilT* y *pilC* que participan probablemente en el ensamblaje de esta estructura. El análisis de la región arriba de *pilA* reveló una secuencia reconocida por el cofactor sigma alternativo RpoN y recientemente se demostró la participación de *pilR* en su activación (Nuñez *et al.* 2006; Juarez *et al.* 2008) se comprobó también, que *pilR* interviene directamente en la expresión de *pilA* y en la de ciertos citocromos importantes en la transferencia de electrones a Fe (III) (Juarez *et al.* 2008).

Pili actuando como nanocables. Previas investigaciones en la transferencia de electrones a Fe (III) se han enfocado en el rol de la membrana externa en citocromos tipo C (Lovley *et al.* 2004; Richardson 2000). Sin embargo, algunos organismos reductores de Fe(III) carecen de citocromos tipo c (Lovley *et al.* 1995). Las especies de *Geobacter* son predominantes en reducir Fe(III) de distintos ambientes, esto se debe al contacto directo con los óxidos de Fe(III) para reducirlos, y producir de forma monolateral el pili, es por esto que se propuso que el pili podría ser el conductor de electricidad, lo cual se comprobó posteriormente (Reguera *et al.* 2007).

G. sulfurreducens produce pili durante el crecimiento en óxidos de Fe(III), pero esto no ocurre en Fe(III) soluble (Fig. 4 a, b). La formación de pili también se lleva a cabo con otros aceptores de electrones como fumarato a una temperatura que puede ir de los 25°C a los 30°C (Fig. 5) indicando que la producción de pilina

en *G. sulfurreducens* puede también ser regulada en su crecimiento, como sucede con otras bacterias. Los pili de *G. sulfurreducens* no parece estar relacionado con la motilidad (Reguera *et al.* 2005).

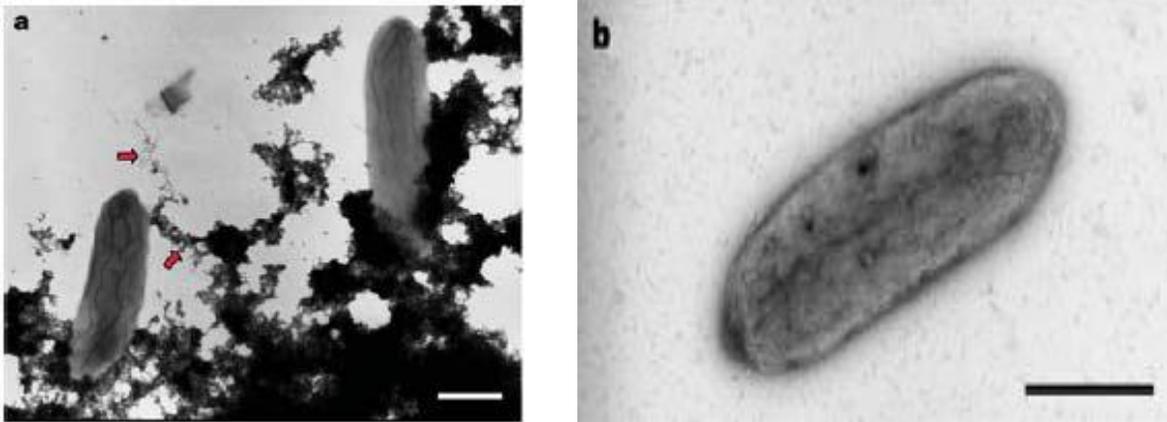


Figura 4. Los pili de *G. sulfurreducens*. Micrografía por transmisión electrónica de células creciendo en cristales de óxidos de Fe(III). a) Citrato Férrico soluble. Las flechas indican donde se ubica los Pili. b) Un acercamiento en una escala en bars de 0.5 μm .

Se ha reportado que la deficiencia de pili en mutantes de *G. sulfurreducens* no son buenos reductores de óxidos de Fe(III) aunque si se pueden unir a ellos. Una sonda conductora microscópica de fuerza atómica reveló que los pili son altamente conductivos. Dichos resultados indican que los pili de *G. sulfurreducens* pueden funcionar como nanocables biológicos, para transferir electrones de la superficie de la célula a la superficie de los óxidos de Fe(III) (Reguera *et al.* 2005) . La transferencia de electrones a través de pili, abre muchas posibilidades de interacciones entre superficies de células y/o materiales, y así, obtener novedosos materiales conductores en bioingeniería.

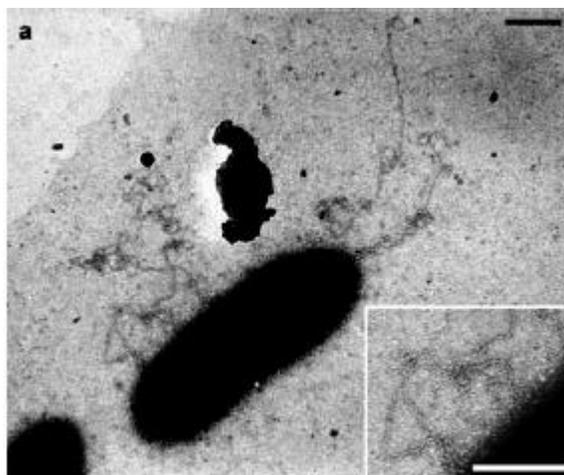


Figura 5. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión. Muestra células de la cepa silvestre.

1.3.2.3 Transferencia de electrones vía mediadores de electrones solubles

La corriente eléctrica fue generada sólo cuando compuestos mediadores solubles fueron agregados a aquellos cultivos microbianos para facilitar la transferencia de electrones de la bacteria a los electrodos en una CCM. Algunos mediadores incluyen ferricianuro de potasio, ácido disulfónico 2,6-antroquinona, tionina, rojo neutral, entre otros. El requerimiento de mediadores es problemático, porque muchos de estos mediadores son tóxicos y no pueden ser usados cuando la energía eléctrica es alcanzada de la materia orgánica en un ambiente natural. Estos mediadores en su forma oxidada penetran a la célula microbiana y llegan a ser reducidos durante el metabolismo microbiano. Los mediadores reducidos entonces se difunden fuera de la célula y viajan al ánodo donde son entonces oxidados. Sin embargo, la mayoría de estos mediadores son caros y tóxicos, causando que su uso llegue a ser inefectivo y poco amigable con el ambiente.

Las células bacterianas son electroquímicamente inactivas porque los acarriadores de electrones activos están encerrados en una pared celular no conductiva y otras estructuras superficiales. Por estas razones, varios mediadores electroquímicos han sido usados en estudios electroquímicos de células bacterianas intactas y para la construcción de una CCM (Kim *et al.* 2001).

1.4 Procedimientos de enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas

Dos de las cepas más estudiadas sobre su capacidad de producir electricidad son *Shewanella oneidensis* y *Geobacter sulfurreducens*, a través de ellas se busca dilucidar los mecanismos de transferencia de electrones exocelular (Xiang *et al.* 2008).

Bond & Lovley (2002), utilizaron una cepa pura de *G. sulfurreducens* para inocular en una cámara en la cual se tenía barra de grafito como aceptor de electrones y acetato e hidrógeno como donador de electrones obteniendo una producción de corriente en la celda de combustible de 65 mA/m², por electrodo de superficie, producción superior a los reportes a esa fecha utilizando sistemas microbianos e incluso es superior a sistemas donde se agregaban compuestos mediadores a las celdas.

Una estrategia para determinar cuales microorganismos contribuyen a la producción de potencia de diversas fuentes de carbono, es identificar aquellos microorganismos que colonizan selectivamente las superficies anódicas. Los microorganismos que son abundantes en el ánodo pueden depender de las condiciones de enriquecimiento

En el caso particular de las celdas de combustible microbianas se han hecho esfuerzos por establecer protocolos con los cuales se logre obtener células que sean capaces de generar una cantidad de potencia atractiva por la celda, esto sin la necesidad de agregar mediadores exógenos, y que los cultivos que estén trabajando en el interior de la celda, sea un cultivo de microorganismos específicos y evitar tener la presencia de bacterias que en lugar de favorecer el rendimiento de la CCM, afecte directamente en el consumo de sustrato sin liberar a cambio energía para la celda o que incluso actúe como una resistencia más para el sistema al interponerse en el camino entre las BEAs y el ánodo.

El fundamento para empezar a utilizar superficies sólidas como aceptores de electrones en condiciones anóxicas se basa en la habilidad de *Geobacteraceae*

para transferir los electrones a aceptores de electrones insolubles como óxidos de Fe (III) (Rabaey *et al.* 2006).

La identificación de condiciones reductoras de Fe(III) está basado en la aparición de elevadas concentraciones de Fe(II) en muestras de aguas profundas, donde la solubilidad del Fe(II) es mucho más alta que la de especies de Fe(III) (Gorm *et al.* 1994).

Algunos cepas de bacterias electroquímicamente activas han sido estudiadas, entre ellas se conocen *Aeromonas hydrophilia*, *Clostridium butyricum*, *Desulfobulbus propionicus*, *Enterococcus gallinarum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodoferrax ferrireducens* y *Shewanella oneidensis* (Chang *et al.* 2005).

Algunos trabajos sobre rutas de transporte de electrones han sido utilizando bacterias que tienen la capacidad de llevar a cabo una respiración mineral. Usando compuestos insolubles como aceptor terminal de electrones (Schröder 2007). Esta característica de los microorganismos de reducir los metales ha sido usado tradicionalmente como un método para seleccionar y caracterizar bacterias electroquímicamente activas para ser usadas en CCM (Biffinger *et al.* 2008). A la fecha se pueden establecer tres métodos de enriquecimiento: 1) enriquecimiento dentro de la CCM por funcionamiento continuo; 2) enriquecimiento externo usando aceptores de electrones metálicos tales como manganeso y algunas formas de Hierro y, 3) por aplicación de diferentes potenciales anódicos.

1.4.1 Enriquecimiento dentro de la celda de combustible microbiana por funcionamiento continuo

El enriquecimiento en CCM es más sencillo y consiste en operar la celda por un lapso de tiempo prolongado, dejando que en el interior se establezca una selección inducida, en este caso principalmente por el tipo de sustrato que sea proporcionado para la operación de la celda. Una vez transcurrido un tiempo y al término de operación de la celda se espera que las bacterias que prevalezcan sean aquellas con capacidad de lograr degradar de mejor forma el sustrato y sobre todo que sean las que en un ambiente anóxico, al no tener un aceptor de

electrones disponible como tal, transfieran sus electrones hacia el ánodo para generar una corriente eléctrica.

Sobre enriquecimiento en celda, se conoce un estudio sobre el efecto de la aclimatación de inóculos previamente enriquecidos (Kim *et al.* 2005, Wang *et al.* 2010, Sathish-Kumar *et al.* 2012). Después de un enriquecimiento mediante una serie de transferencias usando como inóculo lodos con un medio que contenía hierro férrico como aceptor de electrones, se encontró que cuando este inóculo enriquecido se aplicó a una celda, la potencia obtenida fue baja, del orden 2 mW/m², aún más baja que la potencia obtenida por el inóculo original. Sin embargo, cuando se tomó inóculo del ánodo de trabajo para aplicarlo a un nuevo electrodo anódico la potencia máxima se incrementó de 2 a 40 mW/m². Por lo anterior se concluyó que es posible obtener mejores resultados de un enriquecimiento cuando una biopelícula es tomada de un electrodo anódico de una CCM existente y aplicada a un nuevo ánodo (Kim *et al.* 2005).

Otro tipo de enriquecimiento en celda reporta una cepa de bacteria púrpura fototrófica no del azufre, como una de las bacterias de interés para generar altas producciones de potencia. Esta bacteria es la *Rhodopseudomonas palustris* DX-1, que fue aislada de una CCM y que en comparación del cultivo mixto del cual fue aislado, arrojó mejores densidades de potencia (2720 ± 60 mW/m²). Se contaba con reportes de que algunas especies de *Rhodopseudomonas palustris* tienen la habilidad de generar hidrógeno, pero éstas no habían sido mostradas como generadoras de potencia en una CCM. De este modo, se tiene el reporte de una bacteria más con la capacidad de generar electricidad en las CCM (Xing *et al.* 2008).

1.4.2 Enriquecimiento externo usando aceptores de electrones metálicos tales como manganeso y algunas formas de Fierro

El enriquecimiento externo consiste en aplicar condiciones específicas en matraz con la finalidad de crear un ambiente crítico para la biodiversidad del inóculo, donde al paso del tiempo y llevando a cabo una serie de transferencias se logra establecer cultivos que se han adaptado a ese microambiente. El objetivo del

enriquecimiento es después implementar el inóculo obtenido dentro de la celda y operar con dicho consorcio.

Las principales variables en el enriquecimiento para generar las BEAs son temperatura, sustrato y aceptor de electrones. Siendo este último factor de los más importantes. Algunos aceptores de electrones que se han trabajado son: nitratos, sulfatos, tiosulfato, óxidos de metal (Fe y Mn), CO₂, fumarato, etc. Los cuales son utilizados en sustitución del oxígeno, es decir, para lograr esto, es en condiciones anoxigénicas (Chang *et al.* 2005).

Debido a la propiedad del Fe(III) que es insoluble a pH alrededor de la neutralidad y que por lo tanto se asemeja a una superficie sólida como lo es el electrodo anódico, es que es el más importante de los aceptores de los electrones para los microorganismos en ambientes anaerobios (Lovley 1991).

Poggi-Varaldo *et al.* (2009), utilizaron como inóculo para operar la celda un consorcio de bacterias sulfato-reductoras y otro con bacterias metanogénicas obtenidas previamente de reactores en los que se les proporcionó las condiciones adecuadas para generar los tipos de bacterias con las que trabajó. La operación de la celda fue a 50 horas, obteniendo una densidad de potencia promedio por las bacterias sulfato reductoras de 12.31 mW/m², este resultado fue 12 veces mayor que la densidad de potencia obtenida utilizando el inóculo de bacterias metanogénicas.

1.4.3 Aplicación de diferentes potenciales anódicos

Este tipo de enriquecimiento consiste en aplicar una diferencia de potencial al ánodo, para que la selección dependa únicamente del potencial aplicado al ánodo. Esto se logra usando una celda de electrólisis microbiana en donde se incrustan los electrodos que funcionarán como ánodo y a cada uno se les aplica una diferencia de potencial anódico. Usando esta técnica potencioestática se encontró que aplicando potenciales bajos mostraron un crecimiento de biopelícula rápido y además se obtuvieron altas densidades de corriente. También se sabe que con bajos potenciales no existe una gran diversidad de bacterias, tal como sucede utilizando potenciales altos, sino que efectivamente se logra un enriquecimiento

generando en mayor número bacterias similares a *G. sulfurreducens* (Torres *et al.* 2009).

1.5 Efectos de la arquitectura y de los materiales de construcción sobre el rendimiento de una celda de combustible microbiana

La producción de energía eléctrica en una CCM está afectada por diferentes factores incluyendo la arquitectura del reactor y tipo de materiales de construcción. Min *et al.* (2005) evaluaron el uso de un puente salino y membrana (Nafion 117) en una CCM de dos cámaras obteniendo 2.2 y 38 mW/m² respectivamente, donde el bajo valor de densidad de potencia para el puente salino se atribuyó a su alta resistencia interna (R_{int}) siendo de 19 920 Ω comparada con el sistema de membrana cuya resistencia resultó de 1 286 Ω .

Se ha demostrado que removiendo la membrana de intercambio protónico (MIP) en una CCM de una cámara incrementa la densidad de potencia de 262 a 494 mW/m² para una CCM con MIP y una CCM sin MIP respectivamente (Liu *et al.* 2005a). Por otro lado ha sido evaluado el efecto del área superficial de la MIP de 3.5, 6.2 y 30.6 cm², donde el área de ánodo y cátodo fue de 22.5 cm² respectivamente. La densidad de potencia fue de 45, 68 y 190 mW/cm² respectivamente, esto indica que el área superficial de la MIP es un factor importante en el desempeño de una CCM (Oh & Logan. 2007).

Song *et al.* 2008 demostraron que la disminución de distancia entre electrodos conduce a un aumento de densidad de potencia. Disminuyeron la distancia entre los electrodos ánodo de 4 a 2 cm en una CCM sin membrana y obtuvieron densidades de potencia máximos de 108 y 160mW/m² respectivamente, donde el incremento de la densidad de potencia estuvo asociado a la disminución de la R_{int} de 400 a 200 Ω . El efecto de la distancia entre los electrodos sobre el rendimiento de una CCM también ha sido evaluado en otros estudios (Vázquez-Larios *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2005b; Liang *et al.*, 2007) y los resultados disponibles sugieren que la disminución de la distancia inter-electrodos puede disminuir sustancialmente la resistencia interna de la celda, particularmente

cuando se usan electrodos emparedados.

Du *et al.* (2007) han resumido la lista de materiales utilizados en electrodos y membranas de intercambio protónico, a saber:

- (i) Ánodo: grafito esférulas y varillas, tela de grafito, papel impregnado de carbón, tela de carbón, carbón vítreo reticulado, carbón activado, platino, negro de platino, recubrimientos con polímeros.
- (ii) Cátodo: grafito, tela de grafito, papel impregnado de carbón, tela de carbón, platino, negro de platino.
- (iii) Catalizador en los electrodos: platino, negro de platino, polianilina, mediadores de electrones (compuestos de Fe (III), Mn (IV), el análogo de sustancias húmicas 2,6-disulfonato de antraquinona o AQDS por su sigla en inglés, y 1,4-naftoquinona) inmovilizados o adsorbidos en o sobre el material de los electrodos (dopado o dopamiento).
- (iv) MIP: puente salino, Nafion, Ultrex, polímeros selectos (poli etileno-políesteren- co divinil benceno), porcelana.

El tipo de material de construcción de electrodos influye decisivamente sobre las pérdidas de polarización debidas a la activación. En ese sentido, los electrodos de platino y negro de platino son más efectivos que los de grafito y carbón, tanto para disminuir las energías de activación de reacciones anódicas como la de la reducción de O₂ en el cátodo. Sin embargo, el costo del Pt es altísimo, y además hay consideraciones sobre la desactivación de la capacidad catalítica del Pt por formación de PtO y 'envenenamiento' con otras sustancias usualmente presentes en el licor de las celdas. Una solución de compromiso entre efectividad y costo es la utilización de electrodos de grafito o papel de carbón pintados (recubiertos) con una suspensión de platino tal que el contenido superficial quede entre 0.1 a 0.5 mg Pt/cm². El recubrimiento de electrodos de Pt y negro de Pt con polímeros selectos como polianilina y polianilinas fluoradas condujo a incrementos de la corriente eléctrica de las celdas, presumiblemente tanto por su conductividad eléctrica propia como por la protección contra la formación de PtO (Schroder *et al.*, 2003; Niessen *et al.*, 2004; Niessen *et al.*,

2006). En otro trabajo (Jian & Li, 2009) se recubrió el ánodo de tela de carbón con polipirrol (polímero conductor, no tóxico) en una celda bicameral operada en lote y alimentada con una mezcla de agua residual municipal y acetato de sodio, de 1 000 mg/L DQO. Se comparó su rendimiento con el de una celda bicameral cuyo ánodo de tela de carbón sin recubrir. Se encontró un aumento de potencia en los primeros seis días de operación de la celda con ánodo recubierto, comparado con la otra celda. Sin embargo, en lotes posteriores, los desempeños de las celdas resultaron similares. Los autores discutieron este efecto en términos de la colonización progresiva de los ánodos y la consiguiente disminución de las cargas debidas al polímero (cargas tipo $R-NH_4^+$) y la disminución de la fuerza iónica localizada.

Se ha visto que la inclusión de compuestos de Fe (III) y Mn (IV) en electrodos (dopado o dopamiento) puede aumentar en hasta dos órdenes de magnitud la intensidad eléctrica obtenida, comparado al desempeño de la celda con electrodos sin dopar (Park & Zeikus, 2000). Un efecto similar se ha reportado para CCM *in situ* basadas en sedimentos marinos (Lovley *et al.*, 2006).

Históricamente, se recurrió a puente salino como dispositivo de intercambio protónico y control de la difusión o retrodifusión de otros cationes y especies químicas entre las cámaras catódica y anódica de celdas de dos cámaras. Sin embargo, contemporáneamente se ha abandonado el puente salino debido a su mayor resistencia interna (Min *et al.*, 2005) y se ha reemplazado por membranas poliméricas y otros materiales. El material comúnmente utilizado para MIPs es el Nafion, seguido de Ultrex, que ostentan permeabilidad selectiva y relativa larga duración, esto debido a su posible asolvamiento cuando se alimenta residuales reales a la CCM. Sin embargo, por un lado, son materiales muy caros, además, su permeabilidad selectiva no es perfecta pues en ciertas condiciones permite el paso de otros cationes específicos. La disponibilidad de protones en el cátodo depende en grado sumo de la MIPs, por lo que se requiere no solamente de una alta permeabilidad selectiva hacia protones sino también de suficiente área superficial. Así, la relación volumen celda/área MIP ó relación área electrodo/área MIP juega un papel significativo en el desempeño de una CCM, como se discutió más arriba.

Para bajos valores de estos cocientes, se facilita el transporte de protones hacia el cátodo y consecuentemente baja la resistencia interna de la celda (bajan las pérdidas óhmicas) (Oh & Logan, 2006).

Se buscan activamente materiales de menor costo para la construcción de MIPs. Una membrana construida con caolín porcelanizado (Park & Zeikus, 2000) en una CCM equipada con electrodos de grafito dopados con Mn (IV) y Fe (III) e inoculada con lodo de purga de planta de tratamiento, mostró un desempeño atractivo, con máximos de 450 mV y 790 mA/m² de voltaje de celda y densidad de corriente, respectivamente. Sin embargo, un intento más reciente que no ha dado resultados atractivos ha sido el uso de polietileno-poliestireno con divinil benceno sulfonado (Grzebyk & Pozniak, 2005).

Así, la búsqueda de materiales efectivos y de menor costo para reemplazar catalizadores caros en electrodos (Pt) y polímeros caros en MIPs (Nafion, Ultrex), es un área de investigación dinámica destinada a contribuir significativamente al desarrollo y a la factibilidad económica de la tecnología de CCM.

1.6 Resistencia Interna

1.6.1 Resistencia de un conductor

Se denomina resistencia eléctrica a la dificultad u oposición que presenta un cuerpo al paso de una corriente eléctrica para circular a través de él.

Los factores principales que determinan la resistencia eléctrica de un material son:

- tipo de material
- longitud
- sección transversal
- temperatura

Un material puede ser aislante o conductor dependiendo de su configuración atómica.

El conductor es el encargado de unir eléctricamente cada uno de los componentes de un circuito. Dado que tiene resistencia óhmica, puede ser

considerado como otro componente más con características similares a las de la resistencia eléctrica.

Un material de mayor longitud tiene mayor resistencia eléctrica (Fig. 6). El material de mayor longitud ofrece más resistencia al paso de la corriente que el de menor longitud.

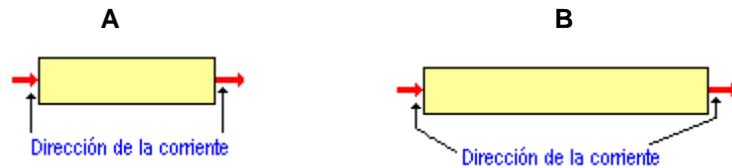


Figura 6. Materiales de A) menor longitud y B) mayor longitud, al paso de corriente

Un material con mayor sección transversal tiene menor resistencia (Fig. 7). El material de menor sección ofrece mayor resistencia al paso de la corriente que el de mayor sección.

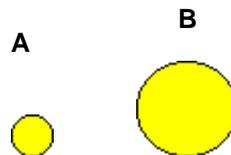


Figura 7. Materiales de A) menor sección transversal y B) mayor sección transversal, al paso de corriente eléctrica

De este modo, la resistencia de un conductor eléctrico es la medida de la oposición que presenta al movimiento de los electrones en su seno, o sea la oposición que presenta al paso de la corriente eléctrica.

1.6.2 Resistividad eléctrica

La resistividad es una característica propia de un material y tiene unidades de ohmios–metro. La resistividad indica que tanto se opone el material al paso de la corriente.

La resistividad $[\rho]$ (*rho*) se define como:

$$\rho = R * A / L \quad (6)$$

donde ρ : es la resistividad medida en ohmios-metro; R: es el valor de la resistencia eléctrica en Ohmios; L: es la longitud del material medida en metros; A: es el área transversal medida en m^2

De la anterior fórmula se puede deducir que el valor de un resistor, utilizado normalmente en electricidad y electrónica, depende en su construcción, de la resistividad (material con el que fue fabricado), su longitud, y su área transversal.

$$R = \rho * L / A \quad (7)$$

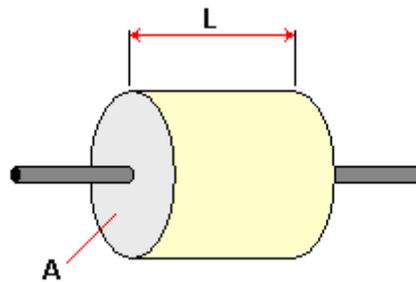


Figura 8. Representación gráfica de la fórmula de resistividad

A mayor longitud y menor área transversal del elemento, más resistencia.

A menor longitud y mayor área transversal del elemento, menos resistencia.

1.6.3 Resistencia interna en celdas de combustible microbianas

El voltaje actual de salida en una CCM es menor que el voltaje ideal termodinámico predicho debido a las pérdidas irreversibles. Las tres principales pérdidas irreversibles que afectan el rendimiento de una CCM son: pérdidas de activación, pérdidas óhmicas y pérdidas de transporte de masa. Estas pérdidas se definen como el voltaje requerido para compensar la corriente perdida debido a las reacciones electroquímicas, el transporte de carga y los procesos de transferencia de mas que toman lugar en los compartimientos anódico y catódico. El grado de estas pérdidas varía de un sistema a otro. Las limitaciones electroquímicas sobre el rendimiento de la CCM se deben a su resistencia interna (R_{int}). El principal componente de la R_{int} es la resistencia óhmica, la cual puede estar dividida en la

resistencia electrolítica, la resistencia óhmica de los electrodos y la resistencia de transferencia de los electrodos.

La resistencia óhmica (R_{ohmic}) está típicamente dominada por la resistencia iónica (R_{ion}) asociada a la resistencia del electrolito (Deng *et al.* 2009; Feng *et al.* 2010). La R_{ion} debida al electrolito está dada por la siguiente expresión:

$$R_{ion} = \rho * L/A = (1/\kappa) * L/A \quad (8)$$

donde ρ : es la resistencia específica o resistividad del electrolito, L : es la distancia entre los electrodos; A : área superficial de los electrodos, κ : conductancia específica o conductividad del electrolito. La revisión de la Ec. (8) llama la atención sobre las maneras de reducir las pérdidas óhmicas, por ejemplo, mediante la reducción de la distancia que separa los electrodos (disminuyendo L), incrementando el área superficial de los electrodos (incrementando A), e incrementando la conductividad del electrolito y el material de la membrana de intercambio protónico (incrementando κ). Una imagen física del efecto de la separación inter-electrodos pudiera ser que los protones tienen menos distancia por recorrer, y consecuentemente la resistencia óhmica es menor.

La influencia del espacio entre los electrodos sobre el rendimiento de las CCMs se ha observado en diferentes trabajos.

Otra variable que pudiera permitir la disminución de R_{ohmic} es el área de los electrodos. Esta última puede ser expresada en términos de una variable ξ , que se define como la relación del área de los electrodos entre el volumen de la celda, expresada:

$$\xi = A/V_{CCM} \quad (9)$$

donde V_{CCM} es el volumen de la CCM. Esto representa el área anódica específica en contacto con el licor de la celda.

Diversos trabajos han investigado el uso de materiales anódicos con un alto valor de ξ , tales como grafito granular y reticulado y carbón activado granular

(Martin *et al.* 2010; Rismani-Yazdi *et al.* 2008). Con respecto al uso de electrodos planos, el ξ de la celda puede ser incrementado si la mayoría de las paredes de la celda se encuentran equipadas con electrodos.

1.6.3.1 Curva de polarización

Las curvas de polarización son consideradas como una herramienta muy útil para el análisis y caracterización de una CCM (Logan *et al.*, 2006). Este tipo de curvas en particular se utilizan para encontrar la resistencia interna, así como también los puntos máximos de Potencia (P_{CCM} en mW) y Voltaje (E_{CCM} en V) con respecto a la Corriente (I_{CCM} en mA) (Oh y Logan, 2006). La manera en que una curva de polarización se obtiene, es mediante la variación de la resistencia externa (R_{ext}), ya sea en aumento o en decremento.

Primero es necesario operar la CCM sin necesidad de conectarla a una R_{ext} y analizar su comportamiento con respecto al Voltaje a circuito abierto (E_{CCMCA}). Una vez que éste último presente un comportamiento estable (Tender *et al.*, 2002), la CCM se somete a una R_{ext} , la cual se irá variando hasta obtener una curva que permita conocer el punto máximo de Potencia y Voltaje de la CCM. También es posible usar dos métodos distintos para la construcción de una curva de polarización.

El primer método se basa en fijar el circuito bajo una resistencia externa variable durante un ciclo en lote con el objetivo de estimar el valor de la resistencia interna (R_{int}) de la celda de combustible microbiana. Este valor comprende una de las características más importantes de una celda de este tipo, ya que de acuerdo al Teorema de Jacobi de la “máxima potencia producida por una fem” (Halliday *et al.*, 2005), una celda de combustible microbiana operada bajo una resistencia externa igual a su resistencia interna resultará por consecuencia en un valor de máxima potencia generada (Fig. 9).

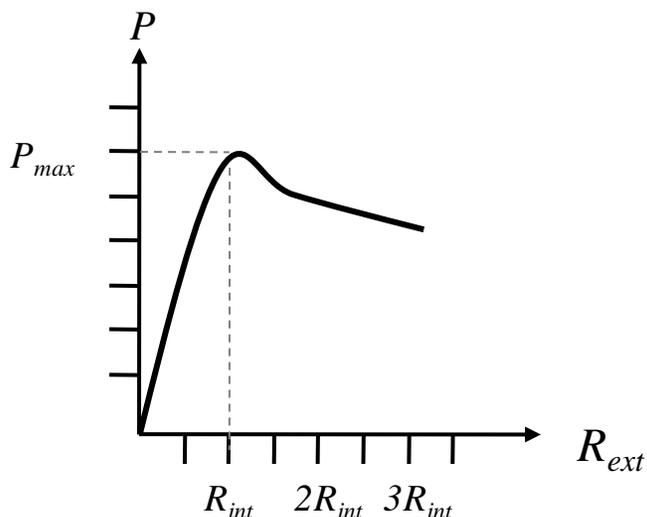


Figura 9. Teorema de Jacobi. Adaptado de Halliday *et al.*, 2006.

El segundo método se basa en operar la celda en un ciclo completo en lote utilizando una sola resistencia externa y entonces cambiar hacia una nueva resistencia para operar la celda en el siguiente ciclo en lote (Heilman y Logan, 2006).

1.7 Biocátodos

Los biocátodos (Fig. 10) son factibles en CCMs de doble compartimiento, pero solo muy pocos estudios se han realizado (Tabla I). Los biocátodos pueden aventajar a los cátodos abióticos por diferentes razones. Primero, el costo de construcción y operación de las CCMs puede ser menor. Los catalizadores metálicos o los mediadores artificiales de electrones pueden llegar a ser superfluos en CCMs con biocátodos, porque los microorganismos pueden funcionar como catalizadores para asistir la transferencia de electrones. Además bajo ciertas condiciones especiales, los microorganismos, tales como las algas, pueden producir oxígeno mediante reacciones fotosintéticas, omitiendo el costo de un suministro externo de oxígeno. Segundo, los biocátodos pueden mejorar la sustentabilidad de la CCM, porque el suministro de mediadores de electrones será eliminado. Tercero, el metabolismo microbiano en biocátodos puede ser utilizado para generar productos útiles o remover compuestos no deseados. Los biocátodos

también pueden estar involucrados en los procesos de remoción de nitrógeno durante el tratamiento de aguas residuales por compuestos reductores de nitrato (denitrificación). Mediante el uso de la denitrificación en CCMs, los electrones de la oxidación de los residuos orgánicos pueden ser usados, en lugar de los donadores de electrones externos, tales como el etanol, metanol, o gas hidrógeno, los cuales son comúnmente agregados para la denitrificación de biorreactores.

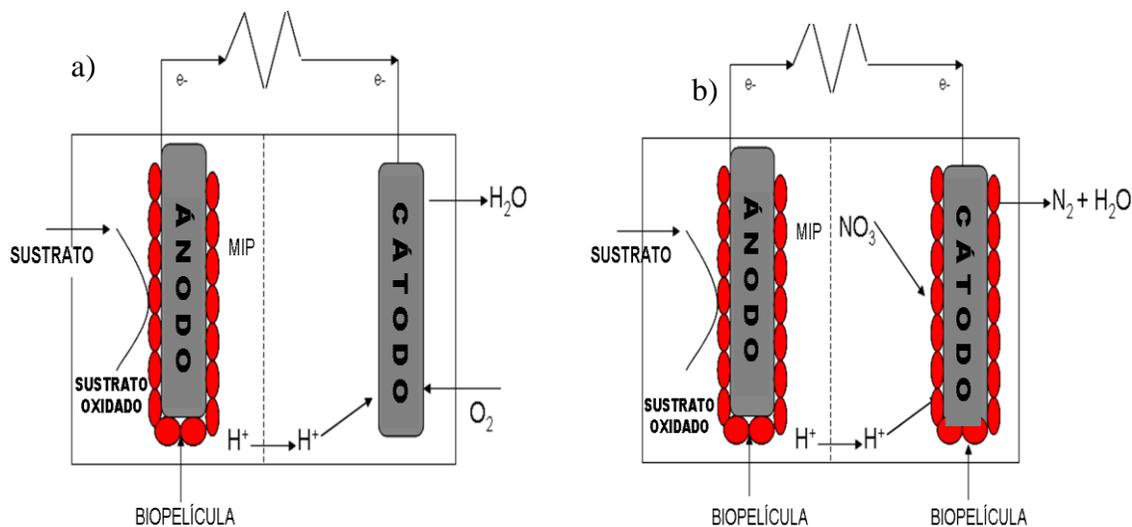


Figura 10. a) CCM con cátodo abiótico; b) CCM equipada con un biocátodo

1.7.1 Biocátodos aerobios

En general, los biocátodos pueden ser clasificados como biocátodos aerobios y anaerobios, dependiendo de los aceptores terminales de electrones que se adapten en el cátodo. El oxígeno es el aceptor terminal de electrones más popular en las reacciones del cátodo en las CCMs, por su alto potencial redox y su abundancia en el aire, así como también su costo relativamente bajo en su suministro. Diferentes estudios utilizaron microorganismos para asistir la oxidación de compuestos metálicos de transición, tales como $Mn(II)$ o $Fe(II)$, para liberar electrones al oxígeno. Además, las bacterias en el cátodo benefician la reacción por el suministro de oxígeno.

1.7.2 *Biocátodos anaerobios*

En ausencia de oxígeno, otros compuestos, tales como nitrato, sulfato, hierro, manganeso, selenato, arseniato, urinato, fumarato y bióxido de carbono (Tabla II) como aceptores terminales de electrones (notar que aquí el hierro y el manganeso no funcionan como mediadores de electrones bajo condiciones anaerobias).

Entre los compuestos comúnmente encontrados, nitrato, hierro y manganeso tienen una actividad relativa metabólica parecida a la del oxígeno, mientras que el sulfato tiene una muy baja actividad redox. En cuanto a sus potenciales redox, el potencial catódico con nitrato, manganeso y hierro como aceptores terminales de electrones es comparable al oxígeno. Por otro lado, el sulfato tiene un potencial negativo eliminando una generación de energía favorable. Por lo tanto, basado en la actividad metabólica y su propiedad electroquímica, el nitrato, hierro y manganeso son una promesa como aceptores terminales de electrones en un cátodo anaerobio. Una ventaja del uso de un biocátodo anaerobio a un cátodo aerobio es la eliminación de la difusión de oxígeno dentro del ánodo por medio de la MIP, previniendo la pérdida de electrones al oxígeno en lugar de los electrodos.

1.7.3 *Remoción de compuestos xenobióticos en celdas de combustible microbianas equipadas con biocátodos*

Los biocátodos de una CCM ofrecen una promesa prominente para el tratamiento reductivo de contaminantes. Los biocátodos en CCMs han sido usados para reducir O_2 , NO_3 , perclorato, CO_2 y $Cr(VI)$ (Tabla I).

El $Cr(VI)$ es una sustancia química tóxica que se encuentra en aguas residuales de galvanoplastia, pigmentos y de los procesos de productos de la madera, ha sido reducido por biocátodos en CCMs, demostrando su potencial aplicación en el tratamiento de aguas residuales con $Cr(VI)$ (Fig. 11). Tandukar *et al.* (2009) obtuvieron una densidad de potencia de 0.9 W/m^2 , simultánea a la reducción de $Cr(VI)$; sin embargo la tasa de reducción de $Cr(VI)$ fue lenta en comparación con los procesos anaerobios y aerobios convencionales, esto debilita las ventajas de los biocátodos en CCMs para la biorremediación actual

sobre los sitios contaminados con Cr(VI). El desarrollo de la reducción de Cr(VI) por CCMs equipadas con biocátodos, está aún en la infancia con la necesidad de amplias investigaciones hacia la búsqueda de CCMs con biocátodos más eficientes para mejorar la tasa de reducción de Cr(VI) y la producción de potencia. Tandukar *et al.* (2009) demostró la reducción biológica en el cátodo de una CCM e identificó microorganismos reductores de Cr(VI). La CCM fue continuamente monitoreada para la reducción de Cr(VI) y la generación de potencia, empleando acetato como sustrato en la cámara anódica y bicarbonato en la cámara catódica como la única fuente de carbono externa. La contribución de la biomasa decayó y los procesos abióticos sobre la reducción de Cr(VI) fue mínima, confirmando al menos que la reducción de Cr(VI) estuvo asistida por la actividad microbiana en el cátodo, los cuales utilizan electrones y protones generados de la oxidación del acetato en el ánodo. Una tasa de reducción máxima de 0.46 mg Cr(VI)/gSSV se logró, lo cual resultó en una corriente y densidad de potencia de 123.4 mA/m² y 55.5 mW/m², respectivamente. El cromo reducido no se detectó en el sobrenadante del catolito, lo cual indica la completa remoción de cromo como precipitado Cr(OH).

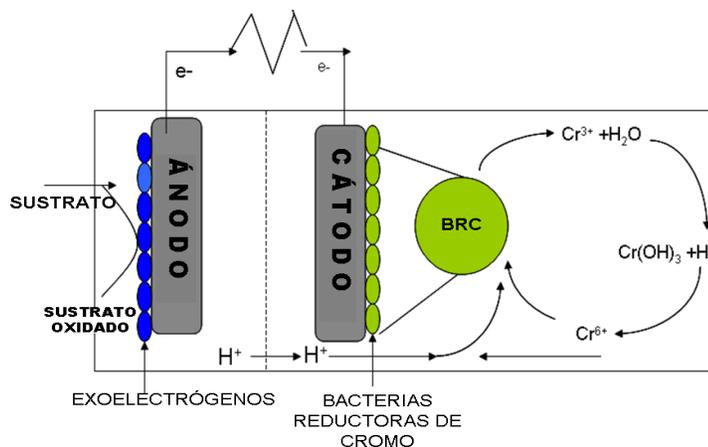


Figura 11. CCM trabajando con un biocátodo sobre la reducción de Cr(VI)

El perclorato es un contaminante emergente del agua potable, y es de preocupación ambiental, por su efecto inhibitorio sobre la glándula tiroides (Clark *et al.* 2000). Existe la necesidad de eliminar las concentraciones de bajo nivel de

perclorato en los suministros de agua potable, así como la concentración de alto nivel en las aguas residuales industriales (Hatzinger *et al.* 2005). Un enfoque efectiva es la bioreducción a cloruro por bacterias reductoras de perclorato en vía desasimilatoria (Coates *et al.* 2004). Mientras un número de biorreactores se han desarrollado para la reducción de perclorato (Logan *et al.* 2002), la reducción usando un cátodo biológicamente activo (biocátodo) en una CCM es un enfoque potencialmente rentable (Figura 12). Muchas bacterias reductoras de perclorato en vía desasimilatoria son anaerobio facultativos y desnitrificantes. La pareja $\text{ClO}_4\text{-Cl}$ tiene un potencial redox similar al del oxígeno y el rendimiento teórico por electrón sobre el perclorato es similar a aquellos de la respiración aeróbica y nitrato-dependiente. Sin embargo, el crecimiento sobre el perclorato es bajo en comparación al crecimiento sobre oxígeno o nitrato, posiblemente porque el perclorato y su reducción intermedia, clorato, son reducidos por la misma enzima, la (per)clorato reductasa (Nerenberg *et al.* 2002, Kengen *et al.* 1999; Bender *et al.* 2005; Dudley *et al.* 2008). Los biocátodos aprovechan la capacidad de microorganismos específicos para aceptar electrones de una superficie sólida (cátodo) (Gregory *et al.* 2004). La reducción de oxígeno en altas tasas sin un catalizador de platino y la desnitrificación se han logrado usando biocátodos (Clauwaert *et al.* 2007; Gregory *et al.* 2005) así como también la reducción de contaminantes clorados de aguas subterráneas y uranio(VI) (Gregory *et al.* 2005; Strycharts *et al.* 2008).

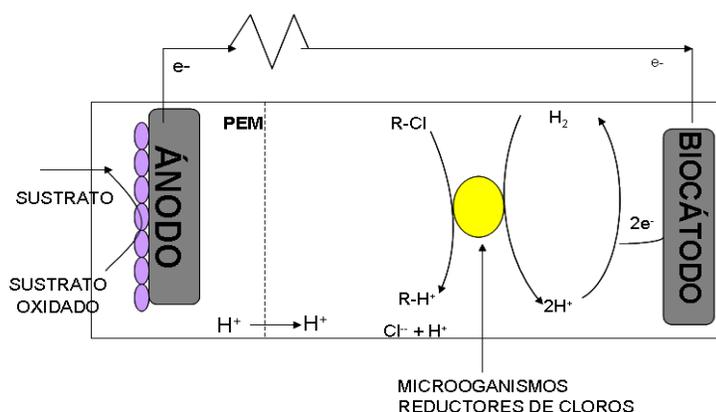


Figura 12. Reducción microbiana de TCE en celdas de combustible microbianas equipada con biocátodo

TABLA 1. Aplicación de biocátodos en celdas de combustible microbianas

Tipo de celda	Electrodos	Membrana	Modo de Operación	Inoculo en el cátodo	Substrato Anódico	Potencia (mW/m ²)	Aceptor Terminal de electrones	Ref.
Tubular	Anode: Grafito Granular Cathode: Filtro de Carbón	Ultrex CM 17000	Lote Continuo	Efluente de una CCM, lodos y sedimento	Acetato de Sodio	83 ± 11 65±5	Mn (IV)	Clauwaert <i>et al.</i> 2007a
Tubular	Grafito Granular	Ultrex CM 17000	Continuo	Medio y KNO ₃	Efluente de una CCM y Acetato de Sodio	8	NO ₃	Clauwaert <i>et al.</i> 2007b
Dos-cámaras	Placas de grafito granular	Ultrex	Lote	Lodo de un tanque anóxico	Etapa inicial: agua residual doméstica Etapa estable: Acetato de Sodio	0.13 ± 0.04 6.5 ± 1.9	O ₂ NO ₃	Chen <i>et al.</i> 2008
Dos Cámaras	papel carbón a prueba de humedad	Nafion	Lote	Cultivo mixto de bacterias desnitrificantes	Etapa inicial: Lodos Etapa estable: Acetato de Sodio	0.19	NO ₃	Lefvbre <i>et al.</i> 2008
Dos cámaras	Varas de Grafito	Ultrex CM 17000	Lote	Lodo aerobio	Acetato de Sodio	0.11	O ₁	Liang <i>et al.</i> 2008
Dos cámaras	Carbón granular	Nafion 117	Lote Continuo	Lodos anaerobios	Acetato de Sodio	32 28	Fe ²⁺ Mn ²⁺	Yanping <i>et al.</i> 2009

Tres Cámaras	Grafito	Porcelana protón permeable	Continuo	Lodos anaerobios y biomasa enriquecida nitrificante	Agua residual sintética y glucosa	0.22	NO ₃	Tran <i>et al.</i> 2009
Celda de electrolisis microbiana (CEM)	Filtro de grafito	No	Continuo	Efluente de un biocátodo de una CEM previa	Acetato de Sodio	0.5	O ₂	Jeremiass <i>et al.</i> 2009
Dos Cámaras	Fibras de Grafito	Membrana de intercambio catiónico	Lote	Lodos activados anaerobios	Acetato de Sodio	68.4	O ₂	You <i>et al.</i> 2009
CCM de Sedimento	Filtro de Carbón Acero inoxidable	No	Lote	Agua de una CCM de sedimento con biocátodo previa operación	Acetato de Sodio	0.0028	O ₂	De Schampelair <i>et al.</i> 2010
Tubular	Placas de filtro de Grafito	CMI7000	Lote	Medio y mezcla de lodos anaerobios y aerobios	Acetato de Sodio	750	CO ₂	Cao <i>et al.</i> 2009

Dos cámaras	Grafito Granular	Ultrex CMI-7000	Lote	Consortio de una CCM existente	Acetato de Sodio	9.8	NO ₃	Viridis <i>et al.</i> 2010
Dos Cámaras	Papel Carbón	Membrana de celofan	Lote	Buffer de fosfatos	Medio y <i>S. Putrefaciens</i> <i>A. Calcoacetivus</i>	--	O ₂	Freguia <i>et al.</i> 2009
Dos cámaras	Grafito granular	Ultrex CMI-7000	Lote	Consortio microbiano	Medio y acetato de sodio	9.9	NO ₃	Viridis <i>et al.</i> 2009
Dos Cámaras	Cátodo: Tela de Carbón Anodo: Pt/C	Nafion 117	Lote	Cátodo Enzimático	Glucosa	122	O ₂	Colmati <i>et al.</i> 2007
CCM Anóxica y óxica Tres cámaras	Filtros de Grafito	Ultrex CMI-7000	Lote Continuo	CCM óxica: Mezcla de lodos nitrificantes CCM anóxica: Mezcla de lodos desnitrificantes	Glucosa	13.1 7.9	NO ₃	Xie <i>et al.</i> 2010

CCM rectangular	Grafito Granular	Ultrex CMI-7000	Lote	Perclorato	Acetato de Potasio	3	NO ₃	Butler <i>et al.</i> 2010
CCM tipo "H"	Placas de Grafito	Nafion 117	Lote	Cr(IV)	Acetato de Sodio	55.5	NO ₃	Tandukar <i>et al.</i> 2009
Dos Cámaras	Anódo: Placas de grafito Cátodo: Grafito Granular	Nafion 117	Lote	Cr(IV)	Acetato de Sodio	2.4	NO ₃	Huaung <i>et al.</i> 2010

TABLA 2. Reacciones en biocátodos

REACCIÓN	REFERENCIA
$\text{MnO}_2(\text{s}) + 4\text{H}^+ + 3\text{e}^- \longrightarrow \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	Rhoads <i>et al.</i> (2005)
$\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$	Lopez <i>et al.</i> (1999)
$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5 \longrightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{Otros productos}$	Bert and Canfield (1964)
$\text{NO}_3^- + 2\text{H} + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	Gregory <i>et al.</i> (2004)
$2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$	Del Duca and Fuscoe (1964)
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{S}_2^- + 4\text{H}_2\text{O}$	
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \longrightarrow \text{S}_2^- + 4\text{H}_2\text{O}$	
$\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	Park <i>et al.</i> 2000
$\text{Fumarato} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{Succinato}$	

2. JUSTIFICACIÓN

Las CCM tienen ventajas sobre otras tecnologías usadas para la generación de energía a partir de materia orgánica: i) la conversión directa de sustrato a electricidad permite altas eficiencias de conversión; ii) operan eficientemente a temperatura ambiente incluidas temperaturas bajas; iii) no requieren del tratamiento de biogás generado en la celda; iv) no requieren de energía extra para airear el cátodo, pues éste puede ser aireado pasivamente; v) tienen aplicación potencial en lugares alejados con ausencia de infraestructura eléctrica, convirtiéndose en una opción más de energía renovable para los requerimientos de energía a nivel mundial. A partir de la biomasa orgánica presente en residuos sólidos y líquidos se pueden obtener una variedad de biocombustibles y subproductos (Logan *et al.*, 2004; Alzate *et al.*, 2007; He y Angenent., 2006).

Las CCMs se plantean como una alternativa energética que a la luz de los avances obtenidos por diversos grupos alrededor del mundo (Estados Unidos, Alemania, Australia, Corea del Sur, etc.) podría satisfacer en un futuro no muy lejano las necesidades de lugares específicos como plantas de tratamiento de aguas residuales (haciéndolas autosostenibles energéticamente hablando), localidades rurales o inclusive dando tratamiento a residuales orgánicos provenientes de procesos anaerobios para la obtención de biocombustibles (producción biológica de hidrógeno).

Aunado al punto anterior, el acercamiento de este tipo de tecnología dependerá en gran medida en encontrar nuevas arquitecturas, sustituir algunos materiales actualmente utilizados como catalizadores en celdas de combustibles microbianas por materiales de origen biológico que actúen como catalizadores finales de sistema, etc.

La CCM convencional consiste de un ánodo biológico y un cátodo abiótico, el cual, usualmente, requiere un catalizador o un mediador de electrones para lograr una alta transferencia de electrones; sin embargo, los biocátodos pueden aventajar a los cátodos abióticos por muchas razones: Primero, el costo de construcción y operación de la CCM puede ser menor; segundo, los biocátodos pueden mejorar la sustentabilidad de la CCM; tercero, el metabolismo microbiano

en los biocátodos puede ser utilizado para generar productos útiles o remover componentes no deseados.

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general

La nueva arquitectura (paralelepípedo) de la celda de combustible de una cámara y el rearrreglo de electrodos conducirán a mayores potencias volumétricas y menor resistencia interna comparado con una celda estándar de una cámara.

3.2 Hipótesis específicas

1. El desempeño de la celda de combustible microbiana de nuevo tipo mejorará con el enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas.
2. El empleo de una CCM equipada con biocátodo permitirá la remoción simultánea de nitratos y compuestos xenobióticos clorados modelo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Construir y operar una celda de combustible microbiana de estructura paralelepípeda sobre la cual se evaluará el efecto de ξ y, construir y operar una celda de combustible microbiana de doble cámara equipada con biocátodo sobre la cual se evaluará la producción de bioelectricidad y degradación simultánea de un compuesto tóxico modelo.

4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar y construir una celda de combustible microbiana paralelepípeda a escala laboratorio.
2. Evaluar la arquitectura y el efecto de ξ de la CCM paralelepípeda mediante su caracterización y desempeño comparada con CCM estándar.
3. Evaluar un procedimiento de enriquecimiento externo de BEAs para su empleo en CCMs.
4. Evaluar el desempeño de las CCMs empleando un inóculo enriquecido en bacterias electroquímicamente activas.
5. Construir, operar y evaluar el desempeño de una CCM equipada con biocátodo para la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo.
6. Caracterizar las comunidades microbianas radicada en las CCMs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Plan de trabajo

El plan de trabajo estuvo compuesto por cuatro fases divididas en 8 actividades (Fig. 13). El trabajo experimental comprendió desde el diseño y construcción de la celda de combustible microbiana paralelepípeda hasta la caracterización de comunidades microbianas presentes en el sistema.

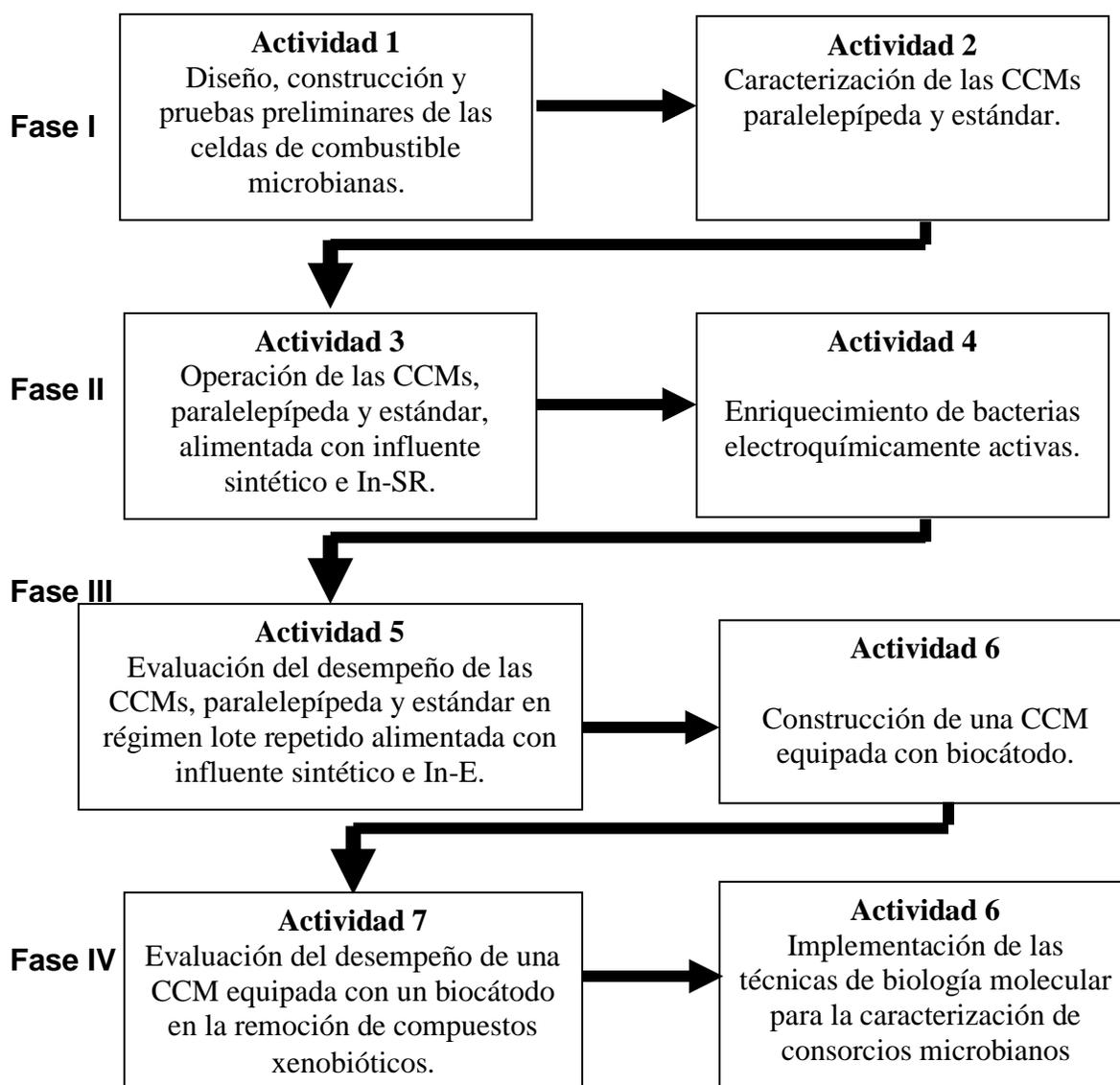


Figura 13. Diagrama de plan de trabajo

Fase 1

5.2 Actividad 1: Diseño, construcción y pruebas preliminares de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar.

5.2.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue diseñar y construir una CCM de estructura paralelepípeda que permitiera la extensión del área de los electrodos tipo “emparedado” que conllevaría a la posible disminución de la resistencia interna y el incremento de la potencia volumétrica comparada con una CCM estándar de arquitectura cilíndrica cuyos electrodos se encuentran separados y colocados en las caras opuestas del cilindro.

5.2.2 Diseño de la celda de combustible microbiana de nuevo tipo

La CCM de nuevo tipo (CCM-2) consistió de una estructura paralelepípeda de plexiglás de 10 cm de largo, 8 cm de ancho y 6.5 cm de altura, con un volumen de operación de 270 mL, aproximadamente. En cada una de las caras de la cámara paralelepípeda se colocó un sistema de electrodos tipo “emparedado” constituidos por una lámina de acero inoxidable perforada, tela de carbón Toray (cátodo) con una concentración de 0.5 mg Pt/cm^2 (Pt 10 wt%/C-EOTEK), membrana de intercambio protónico (MIP) (Nafion 117), tela de carbón Toray (ánodo) y una malla de acero inoxidable perforada (Fig. 14). Los cátodos para cada emparedado se airearon por convección natural.

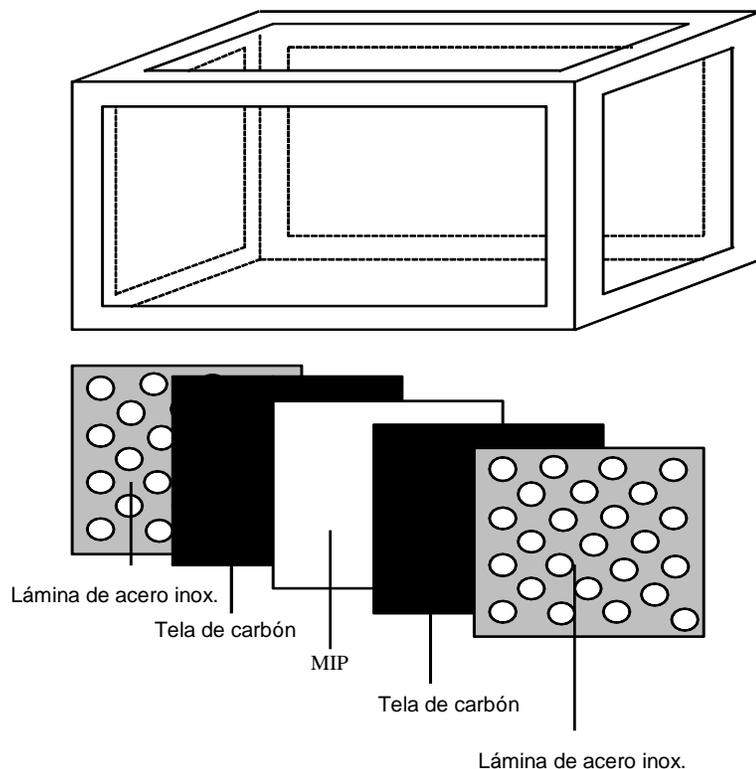


Figura 14. Diseño de la celda de combustible microbiana paralelepípeda.

5.2.3 Diseño de la celda de combustible microbiana estándar

La celda de combustible microbiana estándar (CCM-1) consistió de un ánodo y un cátodo colocados en lados opuestos de la cámara cilíndrica de Plexiglas, de 78 mm de largo por 49 mm de diámetro y un volumen de operación de 150 mL. El electrodo del ánodo estuvo constituido de una lámina de acero inoxidable con un diámetro de 49 mm y perforaciones con diámetro de 2 mm y tela de carbón Toray (Fig. 15). El cátodo estuvo conformado por una lámina de acero inoxidable con las mismas condiciones del ánodo, una placa de acrílico perforada (para evitar que la MIP se corrugara), una MIP entre la fase acuosa y la lámina de acero, y entre éstas se colocó la tela de carbón Toray con un diámetro similar a la lámina de acero con una concentración final de 0.5 mg Pt/cm^2 (Pt 10 wt%/C-EOTEK). El cátodo se aireó por convección natural (Carmona-Martínez, 2007).

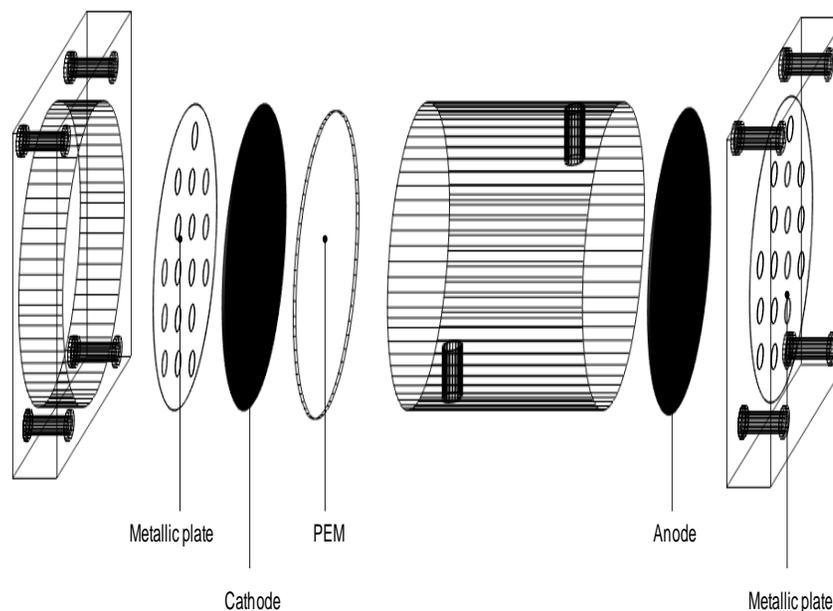


Figura 15. Configuración de la celda de combustible microbiana estándar adaptado de Carmona-Martínez *et al.*, 2007.

5.2.4 Activación de la membrana de intercambio protónico Nafion

La activación de una membrana protónica Nafion[®] precede al depósito del catalizador. Este pre-tratamiento se llevó a cabo mediante “lavados” secuenciales a una temperatura de 80°C. El procedimiento llevado a cabo se enlista a continuación (Rodríguez-Castellanos, 2005).

1. Inmersión de la membrana en una solución de H₂O₂ al 30% (% v/v) durante 1 h con la intención de remover impurezas orgánicas de la superficie.
2. Inmersión de la membrana en H₂O desionizada durante 1 h para hidratar la superficie de la membrana y remover impurezas que hayan quedado en ésta.
3. Inmersión de la membrana en una solución de H₂SO₄ 2 M durante 1 h que removerá iones metálicos contaminantes de la superficie.
4. Inmersión de la membrana en H₂O desionizada durante 1h con lo cual se remueve el H₂SO₄ de la superficie y se hidrata la membrana.

5.2.5 Preparación y depósito de la tinta catalítica en la membrana Nafion

Se preparó la tinta catalítica a una concentración de 0.5 mg Pt/cm². Fue necesario colocar previamente en un vial, y pesando en balanza analítica, la cantidad de platino a utilizar. Una vez pesada la cantidad de platino requerida, al vial se le agregó etanol y solución Nafion al 5%. Por último, se agitó la mezcla de los componentes anteriores en un sonicador durante 5 minutos hasta observar una consistencia homogénea.

El catalizador en forma de tinta se depositó mediante aspersión en una membrana activada. Cuando la tinta se depositó en la membrana, después de 5 minutos de ser expuesta a la luz de una lámpara para garantizar que el solvente se evaporar, la membrana entintada se colocó en una prensa. El objetivo de colocar la membrana en la prensa fue garantizar una mayor adhesión del catalizador, esto se logró al utilizar una temperatura de 120°C y 4 kg/cm² durante 2 minutos (SPECAC: Prensa hidráulica manual con una carga máxima de 15 toneladas).

5.3 Actividad 2: Caracterización de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar

5.3.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue determinar la resistencia interna de ambos sistemas mediante el método de curva de polarización con inóculo sulfato reductor (In-SR) e inóculo enriquecido (In-E).

5.3.2 Extracto modelo y biocatalizadores

Las CCMs estándar y paralelepípeda fueron cargadas con 7 y 18 mL, respectivamente, de un extracto modelo similar al perfil de metabolitos generados en la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos municipales (Valdez-Vázquez *et al.* 2005, Poggi-Varaldo *et al.* 1997, Sparling *et al.* 1997). El extracto modelo estuvo constituido de una mezcla de los siguientes compuestos (en g/L): ácido acético (4.0), ácido propiónico (4.0) y ácido butírico (4.0), así como

también acetona (4.0), etanol (4.0) y sales minerales tales como NaHCO_3 (3.0), NaCO_3 (3.0), K_2HPO_4 (0.6) y NH_4Cl (0.6). La concentración de materia orgánica del extracto modelo fue de ca. 25 gDQO/L. El pH del sustrato fue de 7. Las celdas se cargaron con 143 y 252 mL de biocatalizador (In-SR e In-E). El In-SR se obtuvo de un biorreactor sulfato-reductor mesofílico de mezcla completa el cual tenía un volumen de operación de 3 L funcionando a 35°C en un cuarto de temperatura constante de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. El reactor fue alimentado a una velocidad de flujo de 150 mL/d con un influente cuya composición fue (en g/L): sacarosa (5.0), ácido acético (1.5), NaHCO_3 (3.0), K_2HPO_4 (0.6), NaCO_3 (3.0), NH_4Cl (0.6) además de sulfato de sodio (7.0). La DQO inicial y la concentración de biomasa en el licor de las celdas fueron de 1450 mg O_2 /L y 1100 g SSV/L.

Por otro lado, el inóculo enriquecido se obtuvo mediante transferencias seriales. Una muestra de sedimento se transfirió a botellas serológicas llenadas bajo una atmósfera de nitrógeno que contenían medio con citrato férrico (55 mM) como el aceptor de electrones y acetato de sodio (2 M) como el donador de electrones. Las botellas serológicas fueron incubadas a 30°C por 7 días en condiciones oscuras. El procedimiento de enriquecimiento se repitió tres veces (Hyun *et al.* 1999). El biorreactor con el inóculo enriquecido (In-E) tenía un volumen de 1.5 L y se operó a 35°C en un cuarto a temperatura constante de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, el biorreactor se alimentó con influente cuya composición era (en g/L): NaHCO_3 (1.8), $\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.5), $\text{COOHNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2.0), Na_2SeO_4 (0.1), a una velocidad de flujo de 75 mL/d. La DQO inicial y la concentración de biomasa en el licor de las celdas fueron de 950 mg O_2 /L y 800 mg SSV/L.

5.3.3 Determinación de la resistencia interna de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda por curva de polarización

La resistencia interna (R_{int}) de las celdas se determinó mediante el método de curva de polarización, variando la resistencia externa (R_{ext}) y monitoreando el voltaje y la intensidad de corriente, de acuerdo con los procedimientos sugeridos por Clawaert *et al.* (2007) y Logan *et al.* (2006). Para la CCM-2, la caracterización se llevó a cabo primero con las caras conectadas en serie y después en paralelo.

Las celdas estándar y paralelepípeda se cargaron con el sustrato e inóculos como se describió anteriormente. Las celdas fueron operadas en lote durante 6 horas a temperatura ambiente. El circuito de las CCMs se equipó con una R_{int} variable. La curva de polarización se realizó con una relación matemática del voltaje de la celda (V_{CCM}) y la intensidad de corriente (I_{CCM}) contra el valor de R_{int} , hacia adelante y hacia atrás respecto a los valores de R_{int} . Inicialmente las CCMs se operaron a circuito abierto (CA) durante 1 h hasta obtener un valor estable en el voltaje, posteriormente se varió la R_{ext} de un valor de 100 Ω a 100 k Ω y viceversa. Al finalizar la variación del voltaje en función de la R_{ext} , nuevamente se operaron las CCMs a CA para corroborar el estado estacionario del sistema y si las condiciones en que se obtiene la curva de polarización son las adecuadas (los valores a circuito abierto al inicio y al final de la curva deben ser similares). El voltaje fue medido y registrado con un multímetro, la intensidad de corriente se calculó por la Ley de Ohm indicada más abajo.

5.3.4 Métodos analíticos y cálculos

La DQO y SSV del licor de las celdas y de la alimentación del biorreactor sulfato-reductor fueron determinados de acuerdo al Standard Methods (APHA 1989). La intensidad de corriente (I_{CCM}), la potencia (P_{CCM}) y la densidad de potencia (P_{An}) se determinaron de acuerdo a Poggi-Varaldo *et al.* 2009.

La potencia por unidad de volumen o potencia volumétrica (P_V) fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$P_V = \frac{E_{CCM}^2}{V_{CCM} \cdot R_{ext}} \quad (10)$$

donde: R_{ext} = resistencia externa, E_{CCM} = el voltaje, y V_{CCM} = el volumen de la celda.

FASE 2

5.4 Actividad 3. Operación de las celdas de combustible microbianas alimentadas con influente sintético e inóculo sulfato reductor.

5.4.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue evaluar el desempeño de las CCM-1 y CCM-2 durante su operación en lote por 7 días a temperatura ambiente alimentadas con influente sintético e inóculo sulfato reductor.

5.4.2 Descripción del ensayo de operación en lote de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar a temperatura ambiente.

Las CCMs estándar y paralelepípeda fueron cargadas como se describe en la sección 5.3.2 empleando únicamente In-SR

La operación de las CCMs se realizó en régimen por lote con un tiempo de operación de 7 días a temperatura ambiente y con su correspondiente R_{int} .

Los métodos analíticos y cálculos se detallan en dicha sección (5.3.4).

5.5 Actividad 4. Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas (BEAs).

5.5.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue enriquecer bacterias reductoras de Fe(III) en botellas serológicas mediante transferencias seriales con la finalidad de obtener un inóculo enriquecido para su uso en CCM.

5.5.2 Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas en botellas serológicas

El procedimiento de enriquecimiento se detalló en la sección 5.3.2

5.5.3 Determinación de la reducción de Fe(III)

La actividad de reducción de Fe(III) se determinó mediante el método (Lovley and Phillips 1986). Se tomó, asépticamente con una jeringa, una muestra de 0.5 mL de cultivo y se mezclaron con 1 mL de HCl (0.5N), esta mezcla se hizo reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 5 min. Se tomó una muestra del sobrenadante (0.1 mL) y se mezcló con una solución de ferrocina (1 mL, 1 g/L en 50 mM de HEPES), esta mezcla se hizo reaccionar durante 15 min antes de su medición utilizando un espectrofotómetro a una densidad óptica de 562 nm. El medio fresco se empleó como una muestra control. Sulfato ferroso etilendiamonio tetrahidratado ($C_2H_{10}N_2O_4SFeSO_4 \cdot 4H_2O$) se utilizó para hacer los estándares de la solución de Fe(II) (Hyun *et al.* 1999).

Durante este trabajo, se empleó un factor de enriquecimiento denominado (ϵ) y se define como:

$$\epsilon \text{ (mM/d)} = ([Fe^{+2}]_{final} - [Fe^{+2}]_{inicial})/t_{lag} \quad (11)$$

donde $[Fe^{+2}]_{final}$ es la concentración final de Fe (II) en una transferencia dada, $[Fe^{+2}]_{inicial}$ es la concentración inicial de Fe (II) en la transferencia (ambas concentraciones en mM), y t_{lag} es el tiempo lag (en d) de Fe(II) aparente en la transferencia.

FASE 3

5.6 Actividad 5. Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar alimentadas con influente sintético e inóculo enriquecido.

5.6.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue evaluar el desempeño de las CCM-1 y CCM-2 durante su operación en lote por 7 días a temperatura ambiente alimentadas con influente sintético e inóculo enriquecido.

5.6.2 Evaluación del desempeño de la celda de combustible microbiana

Las CCMs estándar y paralelepípeda fueron cargadas como se describe en la sección 5.3.2 empleando únicamente In-E

La operación de las CCMs se realizó en régimen por lote con un tiempo de operación de 7 días a temperatura ambiente y con su correspondiente R_{int} .

Los métodos analíticos y cálculos se detallan en dicha sección (5.3.4).

5.7 Actividad 6. Diseño y construcción de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.

5.7.1 Propósito

Esta actividad tuvo como propósito el diseño y construcción de una CCM de doble cámara que estará equipada con un biocátodo (CCM-3) anaerobio con la finalidad de reducir costos de construcción y evaluar la posible remoción de compuestos xenobióticos.

5.7.2 Diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo

Se diseñó una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo (CCM-3) mediante un sistema de doble cámara, donde la cámara anódica se encontraba separada de la cámara catódica por una membrana de intercambio protónico. Esta

celda fue de estructura cúbica hecha de plexiglás con dimensiones de (3 x 3 x 3) cm donde los electrodos estaban conformados por grafito granular. La figura 16 muestra el diseño de esta CCM.

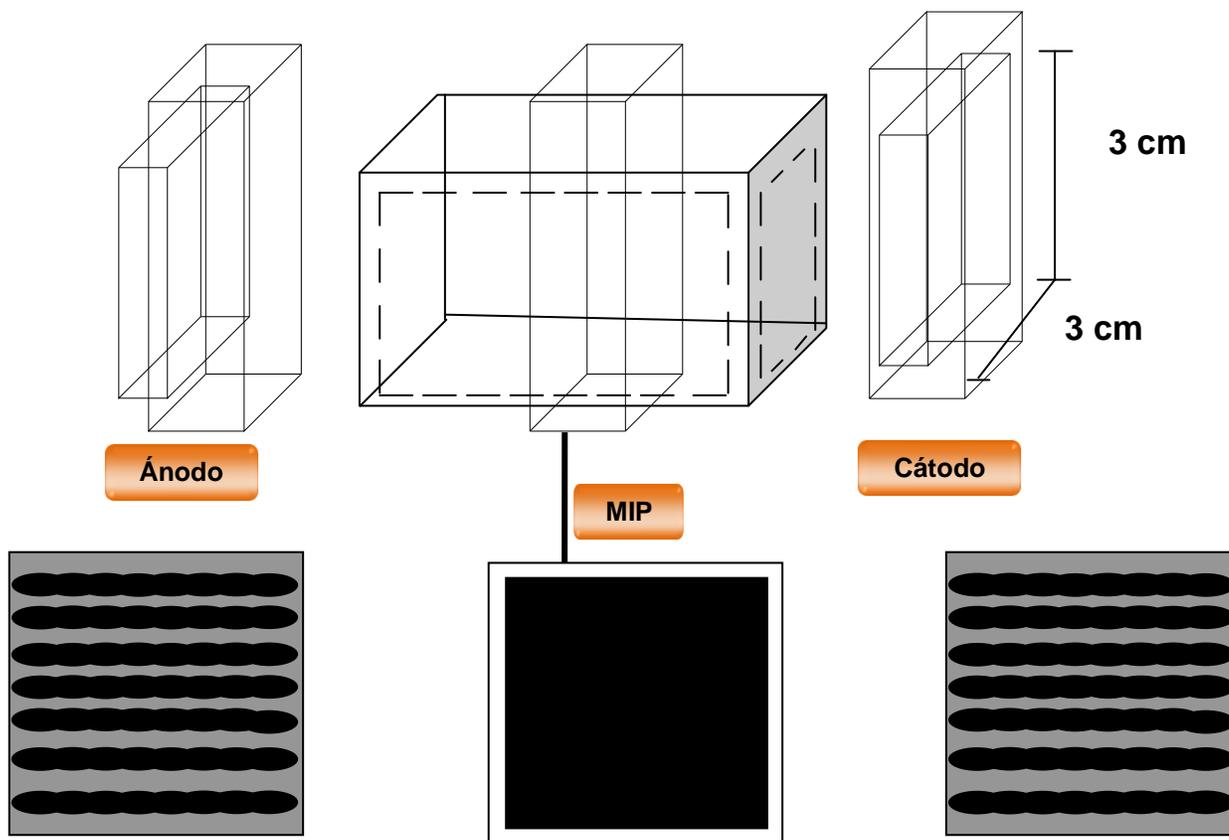


Figura 16. Diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.

Fase 4

5.8 Actividad 7: Evaluación del desempeño de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo en la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo.

5.8.1 Propósito

La finalidad de esta actividad fue evaluar la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo (tetracloruro de carbono), los cuales fueron parte de la alimentación de la CCM equipada con biocátodo.

5.8.2 Evaluación de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.

La celda de combustible microbiana equipada con biocátodo fue un sistema de doble cámara. La cámara anódica se alimentó con inóculo enriquecido en bacterias reductoras de Fe(III) y la cámara catódica fue cargada con un inóculo desnitrificante aclimatado a tetracloruro de carbono a una concentración de 10 mg/L; por lo tanto, el contaminante se puso en dicha cámara.

El monitoreo de la CCM se realizó a través de parámetros electroquímicos tales como densidad de potencia, corriente eléctrica generada y voltaje, como se describe en la actividad 3. También se evaluó la remoción de tetracloruro de carbono por EL método correspondiente.

5.9 Actividad 8: Implementación de las técnicas de biología molecular para la caracterización de consorcios microbianos.

5.9.1 Propósito

Esta actividad tuvo la finalidad de caracterizar las poblaciones microbianas radicadas en el ánodo de las celdas de combustible microbianas con el objetivo de conocer las comunidades bacterianas que conforman los diferentes inóculos empleados en las celdas.

5.9.2 Análisis de comunidades bacterianas

La biopelícula formada sobre los electrodos de tela de carbón de los ánodos de las celdas se empleó para la extracción de DNA usando el kit Power Soil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Inc. Carlsbad, CA). El DNA genómico total se empleó como molde para la amplificación por PCR de aproximadamente 1500 pb del 16S rDNA con los oligonucleótidos 27f, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492r, 5'-GGTTACCTTGTTAACGACTT-3' (Weisburg 1991). Los productos de PCR se purificaron y clonaron en un vector de clonación TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Estos fueron transformados en células competentes de *E. coli* XL1-Blue por electroporación. Las transformantes blancas se transfirieron a placas que contenían medio LB (25 µg/mL de kanamicina y 200 µg/mL de ampicilina), se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Los plásmidos fueron aislados usando el kit High Pure Plasmid (ROCHE, Indianapolis, IN) y las clonas fueron digeridas (2 h, 37°C) con *EcoR1* (BioLabs, New England) para la presencia de insertos.

5.9.3 Secuenciación y análisis filogenético

Los insertos se secuenciaron en sentido y antisentido en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México, usando un ciclo de secuencia Taq FS Dye Terminator basado en la fluorescencia con un secuenciador automático capilar (Perkin Elmer, modelo 3130x, Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se realizó utilizando M13F-pUC (5'-GTTTTCCCAGTCACGTTGTA-3') y M13R-pUC (5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTC-3'). Las secuencias del gen 16S RNA de aproximadamente 1500 nucleótidos obtenidos de cada clon fueron reunidos y editados usando Bioedit. Todas las secuencias fueron analizadas con el programa de verificación Bellerephon y con el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information (Aldschul *et al.* 1990) para determinar las secuencias más cercanas a la base de datos disponible. Los alineamientos de las secuencias múltiples se realizaron usando el software ClustalW y MEGA 5.0. Los análisis filogenéticos se realizaron de las secuencias alineadas por el algoritmo Neighbor-

Joining con el parámetro a distancia Kimera 2 y la tira de 1000 réplicas en el programa Phylip.

5.9.4 Cálculo de índices ecológicos

El índice de diversidad de Shanon-Weaver ha sido muy popular dentro de la literatura ecológica (Shanon 1948). Este índice se define como:

$$H' = -\sum_{i=1}^S (p_i \log p_i) \quad (12)$$

donde p_i = número de individuos el la *i*-ésima especie

El índice de equidad de Pielou es una medida de la biodiversidad que cuantifica que tan igual, numéricamente, es la comunidad (Mulder *et al.* 2004). Este índice se define como:

$$J' = \frac{H'}{\ln S} \quad (13)$$

donde

H' = es el índice de Shanon Weaver

S = es el número total de especies

J' = está limitada entre 0 y 1

El índice de divergencia de Poggi (Poggi-Varaldo *et al.* 2012) se define como:

$$\Delta_p = \frac{(n'_A + n'_B)}{(n_A + n_B)} \quad (14)$$

donde:

n_{AB} = Número de bandas que están presentes en la línea A (o comunidad A) y en la línea B (o comunidad B)

n'_A = Número de bandas en la línea A (o comunidad A) ausentes en la línea B (o comunidad B)

n'_B = Número de bandas en la línea B (o comunidad B) ausentes en la línea A (o comunidad A)

n_A = Número total de bandas en la línea A (o comunidad A)

n_B = Número total de bandas en la línea B (o comunidad B)

La Δ_p es usualmente aplicado para cuantificar la diferencia entre dos comunidades microbianas basada en la riqueza; varía de 0 a 1 y los valores bajos de Δ_p indican que las comunidades son similares mientras que los valores altos (1 o cercano a 1) indican que las comunidades “difieren”, es decir que son muy diferentes o completamente diferentes.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad 1: Diseño, construcción y pruebas preliminares de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar

6.1.1 Configuración de la celda de combustible microbiana estándar

La celda de combustible estándar (CCM-1) se construyó con las características mencionadas en la sección 5.2.3 y el diseño final se muestra en la figura 17. El valor de ξ de la CCM-1 fue de 12.9 (1/m). El área anódica específica fue de 18.9 cm² mientras que el volumen de la celda fue de 150 mL, por lo tanto $\xi = (18.9 \text{ cm}^2/150 \text{ cm}^3)*(100 \text{ cm}/1 \text{ mL}) = 12.9 \text{ 1/m}$

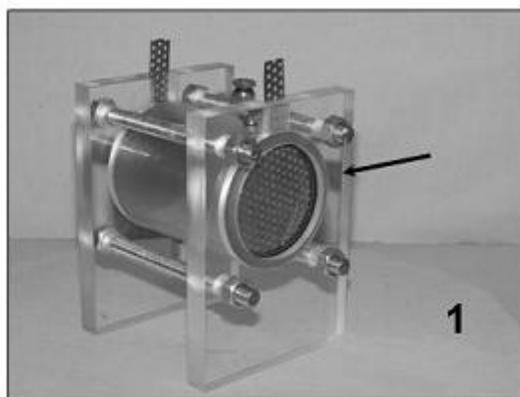


Figura 17. Celda de combustible microbiana estándar

6.1.2 Configuración de la celda de combustible microbiana paralelepípeda

La celda de combustible microbiana paralelepípeda (CCM-2) se diseñó con las características descritas en la sección 5.2.2, en la figura 18 se muestra el esquema de dicha celda. El valor de ξ de la CCM-2 fue de 23.8 (1/m). El área anódica específica de la CCM-2 fue de 64.5 cm², mientras que su volumen fue de 270 mL, así que $\xi = (64.5 \text{ cm}^2/270 \text{ cm}^3)(100 \text{ cm}/1 \text{ mL}) = 23.8 \text{ (1/m)}$. Este valor de ξ fue el esperado ya que a pesar de que presentaba un mayor volumen comparado con CCM-1, la CCM-2 tenía 5 áreas anódicas específicas en lugar de una como la celda estándar.



Figura 18. Celda de combustible microbiana paralelepípeda

6.2 Actividad 2: Caracterización de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar

6.2.1 *Determinación de la resistencia interna de la celda de combustible microbiana estándar con inóculo sulfato reductor e inóculo enriquecido*

Las curvas de polarización y la variación de potencia con respecto a la intensidad de corriente de la CCM-1 alimentada con In-SR e In-E se muestran en la figura 19A y la figura 19B, respectivamente. Los valores de R_{int} fueron calculados como las pendientes del conjunto de puntos alineados de las curvas de polarización correspondientes; los valores fueron 4602 y 687 Ω para la CCM-1 cargada con In-SR e In-E, respectivamente (Tabla III).

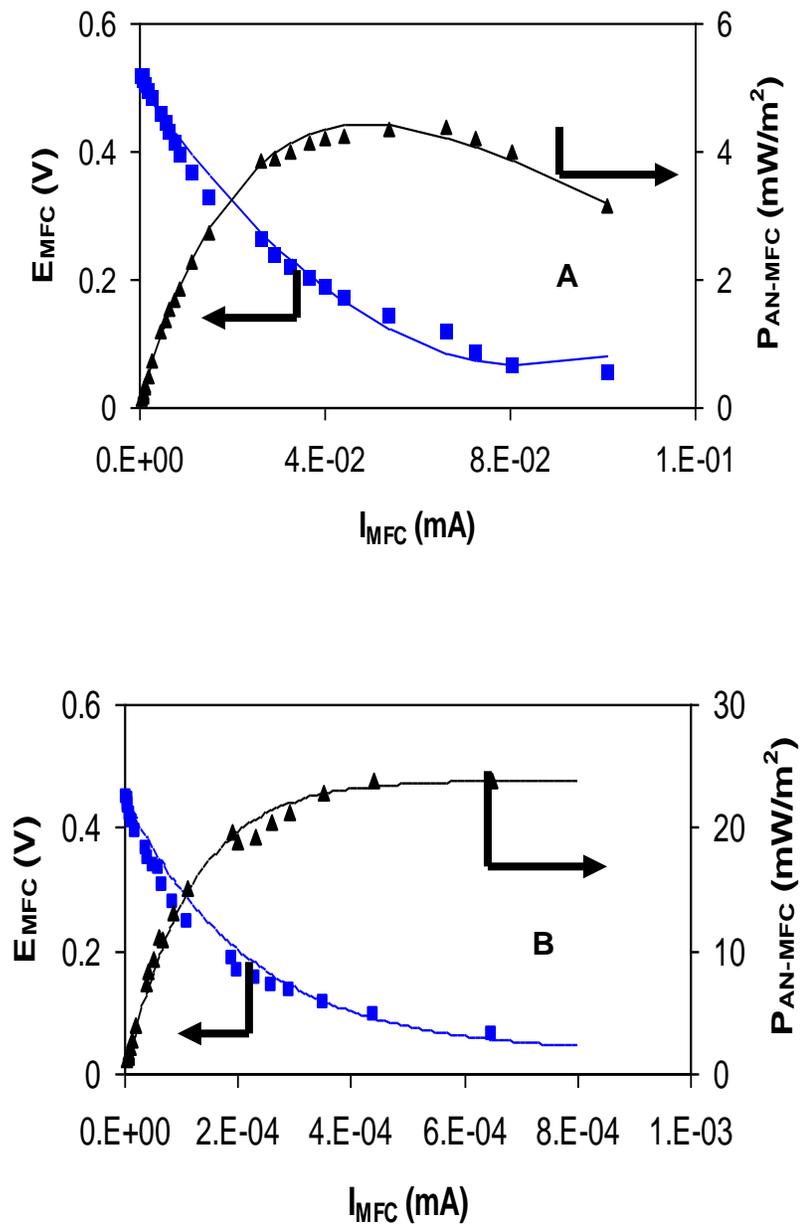


Figura 19. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana estándar: (A) inóculo sulfato-reductor, y (B) inóculo enriquecido

Tabla 3. Caracterización de la celda de combustible microbiana estándar cargada con inóculo sulfato-reductor e inóculo enriquecido

Parámetro	In-SR ^a	In-E ^b
R_{int}^c (Ω)	4602 \pm 40	687 \pm 8
P_{An-max}^d (mW/m^2)	4.3 \pm 0.7	23 \pm 0.3
P_{V-max}^e (mW/m^3)	52 \pm 14	285 \pm 29
$I_{CCM-max}^f$ (mA)	0.10 \pm 0.1	0.65 \pm 0.17
$E_{CCM-max}^g$ (V)	0.52 \pm 0.05	0.45 \pm 0.13
$P_{CCM-max}^h$ (mW)	0.008 \pm 0.002	0.04 \pm 0.01

Notas: ^aInóculo sulfato-reductor; ^bInóculo enriquecido; ^cResistencia Interna; ^dDensidad de potencia máxima; ^eMáxima potencia volumétrica, ^fMáxima intensidad de corriente; ^gVoltaje máximo; ^hMáxima potencia de salida.

Los valores máximos de P_V en la CCM-1 cargada con In-SR e I-E fueron de 52 y 285 mW/m^3 , respectivamente, y los valores máximos de P_{An} fueron de 4.3 y 23 mW/m^2 para la CCM-1 cargada con In-SR e In-E, respectivamente. Cuando la CCM-1 fue cargada con In-E, el voltaje fue de 0.45 V, este voltaje fue algo menor que el de la CCM-1 cargada con In-SR (0.52 V). Todas las otras variables de respuesta en la CCM-1 cargada con In-E fueron más altas que la CCM-1 cargada con In-SR (P_{V-max} 46% más alta y R_{int} 65% más baja).

Los resultados obtenidos son similares a trabajos anteriores donde reportan una mejoría en las características de las CCMs alimentadas con inóculo enriquecido por transferencias seriales en medios de cultivo con Fe(III)/acetato de sodio. Por ejemplo, Wang *et al.* (2010) encontró una mejoría en la potencia obtenida por una CCM alimentada con un inóculo enriquecido con Fe(III). Ellos llevaron a cabo un método de enriquecimiento por transferencias seriales usando una fase sólida de Fe(III) como el aceptor de electrones y acetato como la fuente de carbono que produjo un consorcio anodofílico estable que arrojó potencias más altas (10% más altas) que aquellas obtenidas a partir del inóculo original sin enriquecer o un inóculo de lodos activados, cuando éstos fueron probados en la CCM. Este inóculo enriquecido también redujo el tiempo lag para la generación de potencia y alcanzó una eficiencia coulombimétrica más alta que la biopelícula

original o el inóculo de lodos activados. Sathish-Kumar *et al.* (2012) comparó tres métodos de enriquecimiento, químico (Fe(III) como el aceptor terminal de electrones y acetato como la fuente de carbono), electroquímico e híbrido, partiendo de un inóculo de suelo salino-alcalino. En el método electroquímico llevado a cabo en una celda de electrolisis, el inóculo se sometió a un estrés eléctrico continuo mediante un electrodo polarizado a -150 mV contra un electrodo de calomel saturado (ECS). La caracterización de la CCM por curva de polarización mostró que el inóculo obtenido por el método químico obtuvo potencias más altas que el inóculo proveniente del método electroquímico (altos valores de $P_{AN-max} = 49 \text{ mW/m}^2$ y $P_{V-max} = 558 \text{ mW/m}^3$ obtenidos con el inóculo proveniente del método químico comparado con 33 mW/m^2 y 379 mW/m^3). También el inóculo del método químico presentó potencias 200% más altas que el inóculo original. El tiempo para obtener un inóculo enriquecido a partir del método de enriquecimiento químico fue de 3 semanas (3 transferencias seriales, similares al presente trabajo).

En el presente trabajo, los parámetros característicos de la CCM-1 con ambos inóculos fueron relativamente bajos. Esto podría estar relacionado con la arquitectura de la celda que tiene un espacio inter-electrodos de 7.8 cm; por lo tanto, los valores de R_{int} son altos y las densidades de potencia son bajas (Vazquez-Larios *et al.* 2011). La disminución significativa de R_{int} con la disminución de la distancia inter-electrodos es consistente con experimentos anteriores sobre el efecto de la separación de los electrodos sobre la resistencia interna de la CCM (Vazquez-Larios *et al.* 2011, Fan *et al.* 2007, Jang *et al.* 2004, Song *et al.* 2008, Liu *et al.* 2005). Los resultados de densidades de potencia reportadas en el presente trabajo se obtuvieron por curva de polarización y no por operación continua o por lote repetido mediante los cuales pudiera haberse alcanzado una aclimatación o enriquecimiento de la biopelícula. En el tiempo, relativamente corto en el que se lleva a cabo la curva de polarización, es inesperado un contacto cercano entre los microorganismos y el ánodo o que la formación de la biopelícula pudiera desarrollarse. Esto pudo haber tenido un efecto adverso sobre la transferencia de electrones entre los microorganismos y el

electrodo.

6.2.2 Determinación de la resistencia interna de la celda de combustible microbiana paralelepípeda con inóculo sulfato reductor e inóculo enriquecido

Las curvas de polarización y la variación de potencia con respecto a la intensidad de corriente de la CCM-2 cargada con In-SR y sus caras conectadas en serie y paralelo, se muestran en las figuras 20A y 20B, respectivamente. Las figuras 21A y 21B muestran la variación con respecto a la intensidad de corriente de la CCM-2 cargada con In-E y con sus caras conectadas en serie y paralelo, respectivamente.

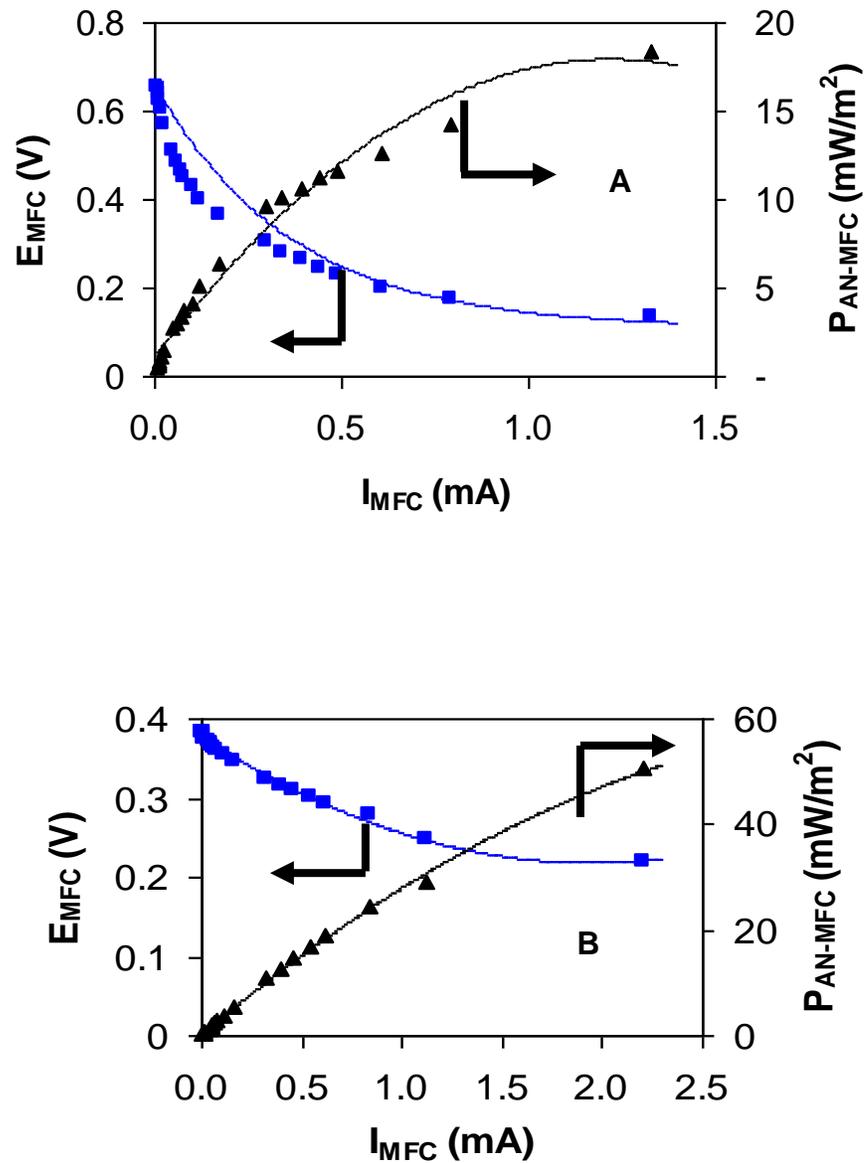


Figura 20. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con inóculo sulfato-reductor: (A) caras conectadas en serie y (B) caras conectadas en paralelo

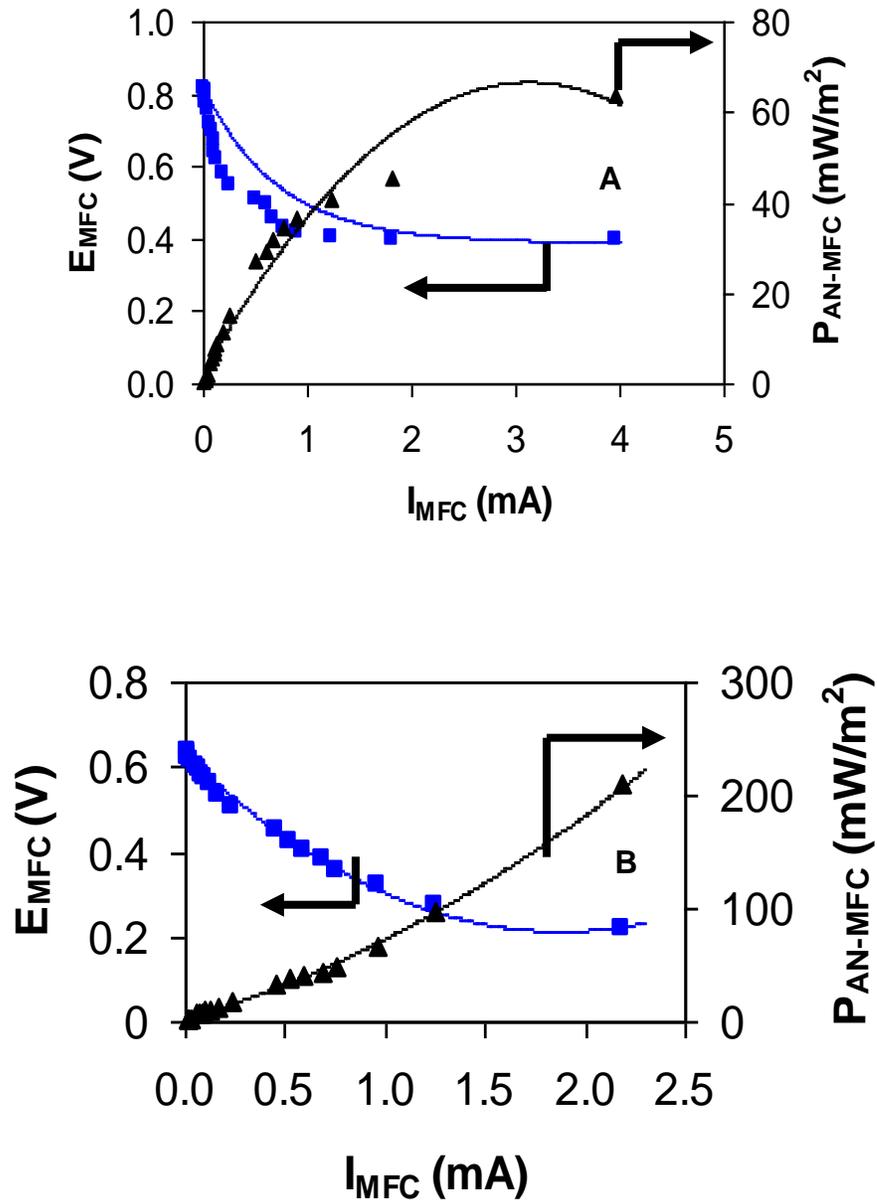


Figura 21. Curvas de polarización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con inóculo enriquecido: (A) caras conectadas en serie y (B) caras conectadas en paralelo

Los valores de R_{int} fueron de 400 y 84 Ω para la CCM-2 alimentado con In-SR y sus caras conectadas en serie y paralelo, respectivamente, y 292 y 80 Ω para la CCM-2 alimentada con In-E y con sus caras conectads en serie y paralelo, respectivamente (Tabla IV). La disminución en la R_{int} en este trabajo fue similar a lo reportado en literatura para CCM-s multicaras (2 o más caras) (Vazquez-Larios *et al.* 2010). El efecto del uso del In-E fue significativamente mejor.

La conexión de las caras en paralelo disminuye la R_{int} , presumiblemente por el incremento en el área transversal para el flujo de iones. Además, los cálculos usando la Ley de Ohm para la resistencia de las caras conectadas en paralelo son muy cercanos con los valores totales experimentales $84 \pm 5 \Omega$ y $80 \pm 8 \Omega$ para CCM-2 cargada con In-SR e In-E, respectivamente. Por lo tanto, por la ley de Ohm de resistencias en paralelo

$$1/R_{int\ total} = \Sigma (1/R_{int,j}), j = 1, \dots, 5 \quad (15)$$

Los valores de R_{int} de las 5 caras de la CCM-2 cargada con In-SR fueron 354 Ω , 425 Ω , 321 Ω , 373 Ω y 461 Ω ; por otro lado, los valores de R_{int} de las 5 caras de la CCM-2 cargada con In-E fueron 328 Ω , 419 Ω , 383 Ω , 434 Ω y 415 Ω . Cuando se sustituye la $R_{int,j}$ de cada cara en la Ec. (15) se obtiene $R_{int\ total} = 75 \pm 4 \Omega$ y $79 \pm 3 \Omega$ con In-SR e In-E, respectivamente. La R_{int} calculada va de acuerdo con los valores experimentales $84 \pm 5 \Omega$ y $80 \pm 8 \Omega$ (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de la celda de combustible microbiana paralelepípeda cargada con inóculo sulfato-reductor e inóculo enriquecido y conectada en serie y paralelo

Parámetro	Serie In-SR ^a	Paralelo In-SR	Serie In-E ^b	Paralelo In-E
R_{int}^c (Ω)	400 ± 40	84 ± 5	292 ± 22	80 ± 6
P_{An-max}^d (mW/m ²)	18 ± 5	50 ± 12	64 ± 18	209 ± 17
P_{V-max}^e (mW/m ³)	655 ± 109	1800 ± 480	1772 ± 500	5804 ± 800
$I_{CCM-max}^f$ (mA)	1.3 ± 0.33	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.55	3.4 ± 0.92
$E_{CCM-max}^g$ (V)	0.66 ± 0.17	0.34 ± 0.05	0.82 ± 0.16	0.64 ± 0.13

$P_{\text{CCM-max}}^h$ (mW)	0.19 ± 0.05	0.49 ± 0.12	0.49 ± 0.14	1.5 ± 0.36
-----------------------------	-----------------	-----------------	-----------------	----------------

Notas: ^aInóculo sulfato-reductor; ^bInóculo enriquecido; ^cResistencia Interna; ^dDensidad de potencia máxima; ^ePotencia volumétrica máxima, ^fIntensidad de corriente máxima; ^gVoltaje máximo; ^hPotencia de salida máxima.

La conexión en serie mostró una tendencia inversa a la conexión en paralelo por un orden de magnitud de mayor resistencia, debido a que hay una pérdida de energía en la conexión en serie que es causada por la conducción transversal-lateral de iones entre los electrodos. Este fenómeno es común cuando un conjunto de CCMs que comparten el mismo electrolito están conectadas en serie para incrementar el voltaje de salida (Wang *et al.* 2010).

Los valores máximos de P_V en la CCM-2 cargada con In-SR y las caras conectadas en serie y paralelo fueron de 655 y 1800 mW/m^3 , respectivamente. Los valores máximos de P_{An} para la CCM-2 con sus caras conectadas en serie y paralelo fueron de 18.4 y 50 mW/m^2 , respectivamente. Durante la conexión de las caras en serie, el voltaje fue de 0.66 V; este voltaje fue casi el doble del obtenido cuando las caras de la CCM-2 se conectaron en paralelo (0.34 v). Todas las demás variables de respuesta en la CCM-2 con las caras conectadas en paralelo fueron más altas que la CCM-2 con sus caras conectadas en serie (Tabla IV).

Los valores máximos de P_V en la CCM-2 cargada con In-E y las caras conectadas en serie y paralelo fueron de 1772 y 5804 mW/m^3 , respectivamente. Los valores máximos de P_{An} para la CCM-2 con sus caras conectadas en serie y paralelo fueron de 64 y 209 mW/m^2 , respectivamente. Cuando la CCM-2 cargada con In-E fue conectada en serie, el voltaje fue de 0.82 V; este voltaje fue más alto que cuando las caras de la CCM-2 se conectaron en paralelo (0.64). Todas las demás variables de respuesta en la CCM-2 con las caras conectadas en paralelo fueron más altas que la CCM-2 con sus caras conectadas en serie (Tabla IV). La conexión en paralelo de múltiples electrodos de la CCM-2 incrementa P_{V-max} comparada a la CCM-2 conectada en serie. Además, la CCM-2 pudo ser conectada en serie, formando un sistema apilado con la finalidad de incrementar el voltaje. Sin embargo, cuando esto se hace, el sistema sufre una inversión de voltaje, resultando una disminución drástica del voltaje apilado (Kim *et al.* 2011).

El In-E mejoró las características de ambos tipos de celdas usadas en esta investigación. Con referencia a la CCM-2 con sus caras conectadas en paralelo, el efecto del In-E fue excepcional en términos de incremento de P_{V-max} (Tabla IV), a pesar de que la R_{int} global fue similar con ambos inóculos (84 y 80 Ω para In-SR e In-E, respectivamente, Tabla 4).

6.3 Actividad 3. Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar alimentadas con influente sintético e inóculo sulfato reductor

6.3.1 Operación en lote de la celda de combustible microbiana estándar alimentada con influente sintético e inóculo sulfato reductor

En la Figura 22 se muestra el voltaje a lo largo de 7 días de operación de la CCM-1. La caracterización de la CCM-1 cargada con In-SR mostró un valor de R_{int} de 4602 Ω . El voltaje máximo a circuito abierto de la CCM1 fue de 0.411 ± 0.01 V. Por otro lado el voltaje promedio bajo una resistencia externa para la CCM-1 fue de 0.44 V. Cuando la CCM-1 fue operada bajo una R_{ext} el voltaje no varió significativamente, e incluso tendió a incrementar lo cual pudo deberse a la suficiente cantidad de sustrato que contenía la CCM-1.

La Tabla 5 muestra el desempeño de la CCM-1 durante los 7 días de operación. La potencia por unidad de área promedio fue de 22.4 mW/m². La potencia volumétrica promedio para la CCM-1 fue de 268.8 mW/m³.

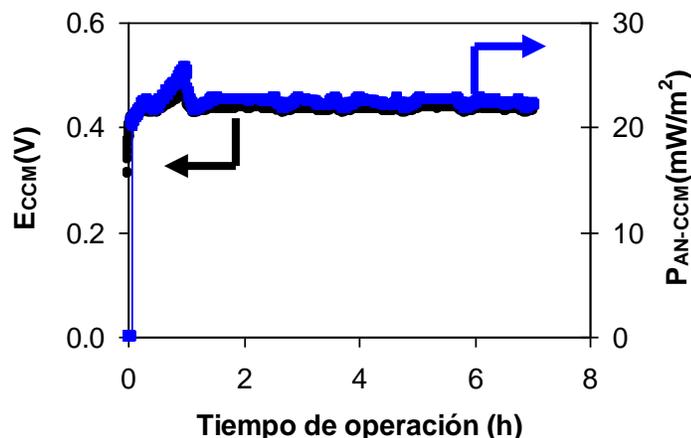


Figura 22. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana estándar operada durante 7 días alimentada con inóculo sulfato-reductor

6.3.2 Operación en lote de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con influente sintético e inóculo sulfato reductor

En la Figura 23 se muestra el voltaje a lo largo de 7 d de tiempo de operación de la CCM-2. La caracterización de la CCM-2 cargada con In-SR y sus caras conectadas en serie mostró un valor de R_{int} de 400Ω . El voltaje máximo a circuito abierto de la CCM-2 de 0.655 ± 0.03 V. Por otro lado el voltaje promedio bajo una resistencia externa para la CCM-2 fue de 0.63 V. Cuando la CCM-2 fue operada bajo una R_{ext} el voltaje permaneció constante y no hubo variación significativa con respecto al voltaje obtenido a circuito abierto

La Tabla 5 muestra el desempeño de la CCM-2 durante los 7 días de operación. La densidad potencia promedio fue de 90 mW/m^2 . La potencia volumétrica promedio para la CCM-2 fue de 3129 mW/m^3 .

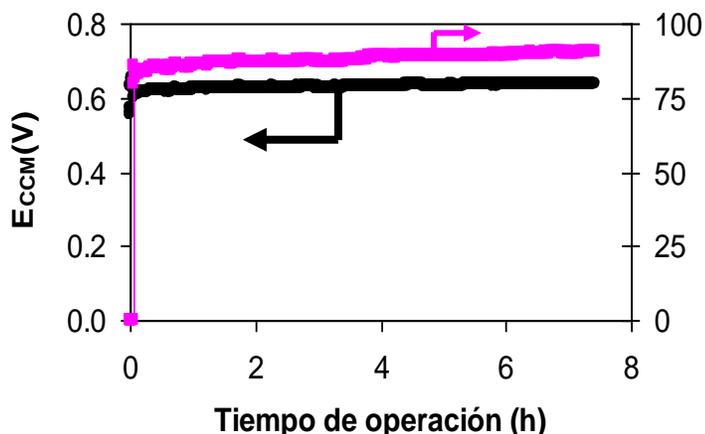


Figura 23. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana paralelepípeda operada durante 7 días

Tabla 5. Desempeño de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda operadas durante 7 días e inoculadas con sulfato-reductor

Parámetro	CCM-1 ^a In-SR ^c	CCM-2 ^b In-SR
R_{int}^d (Ω)	4602 ± 40	400 ± 8
$P_{An-prom}^e$ (mW/m^2)	22 ± 1.1	88 ± 1.6
P_{V-prom}^f (mW/m^3)	268 ± 13.4	3129 ± 57
$I_{CCM-prom}^g$ (mA)	0.09 ± 0.002	1.32 ± 0.012
$E_{CCM-prom}^h$ (V)	0.44 ± 0.01	0.63 ± 0.0057
$P_{CCM-prom}^i$ (mW)	0.04 ± 0.002	0.84 ± 0.015

Notas: ^aCelda de combustible microbiana estándar; ^bCelda de combustible microbiana paralelepípeda; ^cInóculo sulfato-reductor; ^dResistencia Interna; ^eDensidad de potencia promedio; ^fPotencia volumétrica promedio; ^gIntensidad de corriente promedio; ^hVoltaje promedio; ⁱPotencia de salida promedio.

6.4 Actividad 4. Enriquecimiento de bacterias electroquímicamente activas (BEAs).

6.4.1 Procedimiento de enriquecimiento de bacterias reductoras de Fe(III)

La figura 24 muestra los resultados del procedimiento de transferencias seriales para el enriquecimiento del inóculo. Una concentración de 11 mM de Fe(II) se

logró en el cuarto día de la etapa de inoculación, mientras que esta concentración, en las otras etapas, se alcanzó en el primer día o menos.

La tabla 6 muestra la concentración inicial y final en el procedimiento de transferencias seriales. Se alcanzó una concentración de 43.7 mM de Fe(II) en la última transferencia, este valor es dos veces mayor que el obtenido en la etapa de inoculación. El incremento en el factor de enriquecimiento en las transferencias posteriores (Tabla 6) fue una evidencia que el procedimiento de enriquecimiento fue exitoso.

Nuestros resultados fueron similares a aquellos reportados por Hyun *et al.* 1999 quien aisló una bacteria reductora de Fe(III) de un ambiente natural. Las muestras de suelo fueron colectadas de diversos campos de arroz y enriquecidas con citrato férrico como fuente de Fe(III) bajo condiciones anaerobias. El cultivo final enriquecido mostró una alta actividad de reducción de Fe(III). El crecimiento bacteriano se acopló con la oxidación de lactato y piruvato a la reducción de Fe(III), la concentración final de Fe(II) fue de 192.3 mM y 231.9 mM, respectivamente, sus resultados fueron obtenidos después del cuarto día.

Tabla 6. Concentración de Fe⁺² y factor de enriquecimiento ϵ durante el procedimiento de transferencias seriales

Etapa	Inicial Fe⁺² (mM)	Final Fe⁺² (mM)	ϵ (mM/d)
Inoculación	2.4 ± 0.01	19.0 ± 0.8	5.5
Primera transferencia	4.3 ± 0.16	35.4 ± 3.6	31.1
Segunda transferencia	4.3 ± 0.16	36.3 ± 3.1	45.7
Tercera transferencia	4.3 ± 0.10	43.7 ± 2.3	56.3

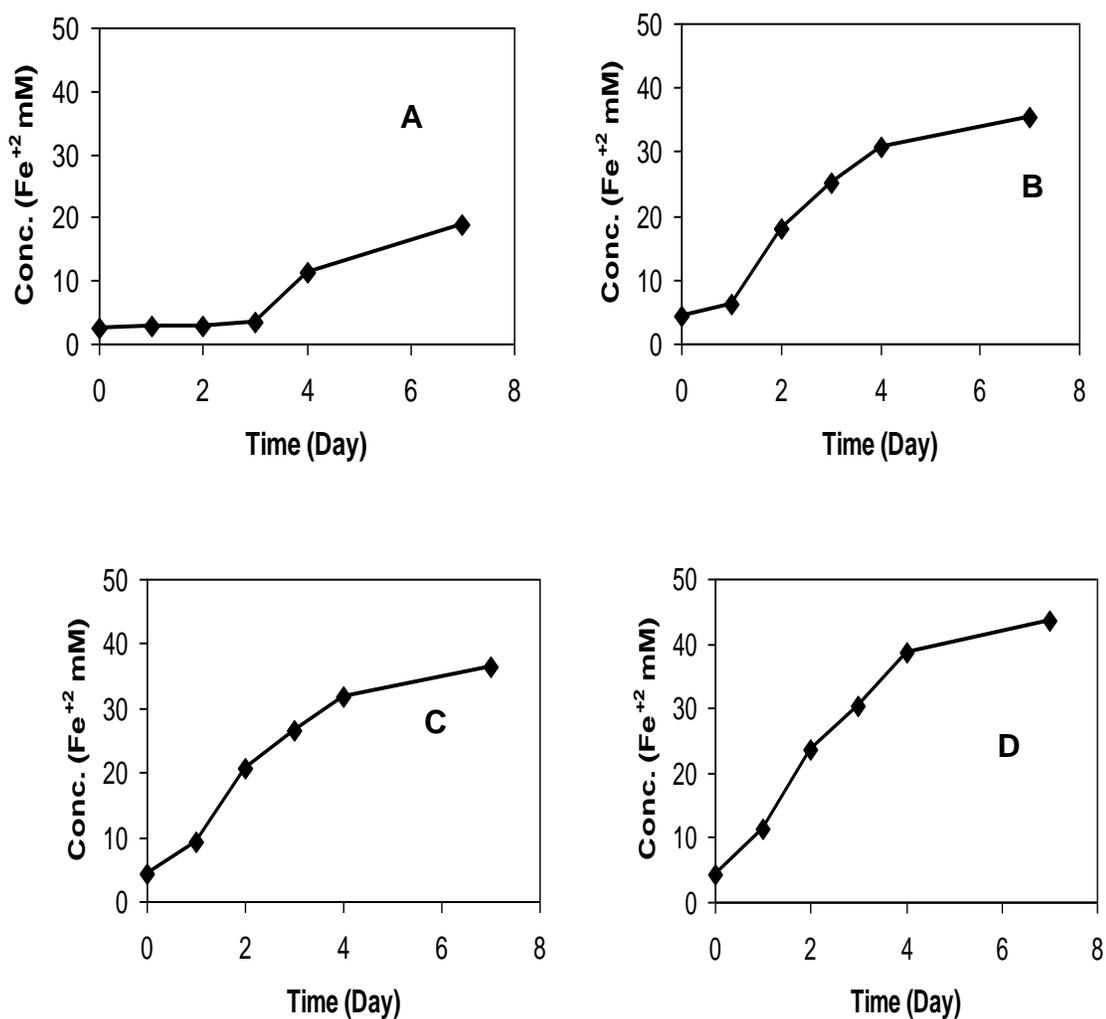


Figura 24. Procedimiento de transferencias seriales: (A) Inoculación, (B) Primera transferencia, (C) Segunda transferencia, (D) Tercera transferencia

6.5 Actividad 5. Operación de las celdas de combustible microbianas paralelepípeda y estándar alimentadas con influente sintético e inóculo enriquecido.

6.5.1 Operación en lote de la celda de combustible microbiana estándar alimentada con influente sintético e inóculo enriquecido

En la Figura 25 se muestra el voltaje a lo largo de 7 días de operación de la CCM-1. La caracterización de la CCM-1 cargada con In-E mostró un valor de R_{int} de 680 Ω . En la Figura 25 se muestra el voltaje máximo a circuito abierto de la CCM1 de

0.43 ± 0.01 V. Por otro lado el voltaje promedio bajo una resistencia externa para la CCM-1 fue de 0.44 V. Cuando la CCM-1 fue operada bajo una R_{ext} el voltaje no varió significativamente.

La Tabla 7 muestra el desempeño de la CCM-1 durante los 7 días de operación. La potencia promedio por unidad de área fue de 154.7 mW/m^2 . La potencia volumétrica promedio para la CCM-1 fue de 1856.8 mW/m^3 .

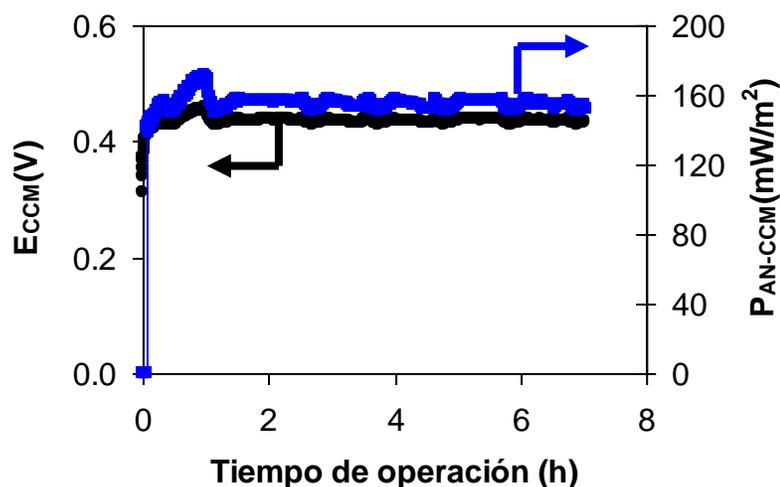


Figura 25. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana estándar operada durante 7 días alimentada con inóculo enriquecido

6.5.2 Operación en lote de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con influente sintético e inóculo enriquecido

En la Figura 26 se muestra el voltaje a lo largo de 7 d de tiempo de operación de la CCM-2. La caracterización de la CCM-2 cargada con In-SR y sus caras conectadas en serie mostró un valor de R_{int} de 560Ω . En la Figura 26 se muestra el voltaje máximo a circuito abierto de la CCM-2 de 0.955 ± 0.03 V. Por otro lado el voltaje máximo bajo una resistencia externa para la CCM-2 fue de 0.94 V. Cuando la CCM-2 fue operada bajo una R_{ext} el voltaje permaneció constante y no hubo variación significativa con respecto al voltaje obtenido a circuito abierto

La Tabla 7 muestra el desempeño de la CCM-2 durante los 7 d de operación. La densidad potencia fue de 164 mW/m^2 . La máxima potencia volumétrica para la CCM-2 fue de 5819 mW/m^3 .

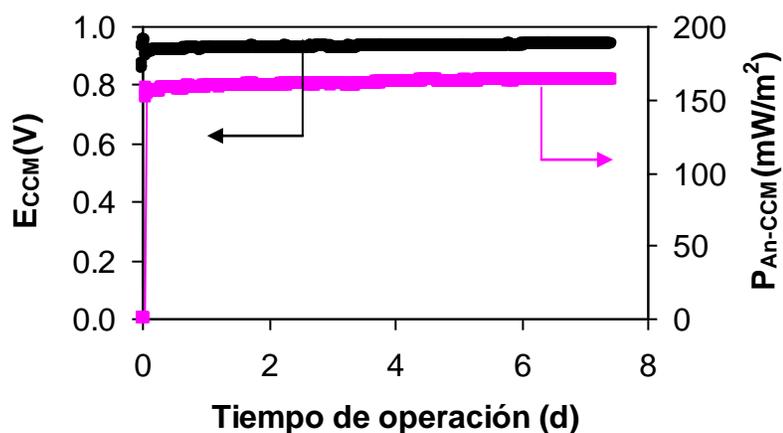


Figura 26. Voltaje y densidad de potencia de la celda de combustible microbiana paralelepípeda operada durante 7 días alimentada con inóculo enriquecido

Tabla 7. Desempeño de las celdas de combustible microbianas estándar y paralelepípeda operadas durante 7 días e inoculadas con enriquecido

Parámetro	CCM-1 ^a	CCM-2 ^b
	In-E ^c	In-E
R_{int}^d (Ω)	680 ± 40	560 ± 8
$P_{An-prom}^e$ (mW/m^2)	154 ± 1.1	161 ± 1.6
P_{V-prom}^f (mW/m^3)	1856 ± 13.4	5722 ± 57
$I_{CCM-prom}^g$ (mA)	0.62 ± 0.002	1.64 ± 0.012
$E_{CCM-prom}^h$ (V)	0.44 ± 0.01	0.93 ± 0.0057
$P_{CCM-prom}^i$ (mW)	0.28 ± 0.002	1.55 ± 0.015

Notas: ^aCelda de combustible microbiana estándar; ^bCelda de combustible microbiana paralelepípeda; ^cInóculo enriquecido; ^dResistencia Interna; ^eDensidad de potencia promedio; ^fPotencia volumétrica promedio, ^gIntensidad de corriente promedio; ^hVoltaje promedio; ⁱPotencia de salida promedio.

6.6 Actividad 6. Diseño y construcción de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.

6.6.1 Diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo

El diseño de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo (CCM-3) está basado en un sistema de doble cámara, donde la cámara anódica se

encuentra separada de la cámara catódica por una membrana de intercambio protónico. Esta celda será de estructura cúbica hecha de plexiglás con dimensiones de (3 x 3 x 3) cm donde los electrodos estarán conformados por grafito granular. La figura 27 muestra el diseño de esta CCM.

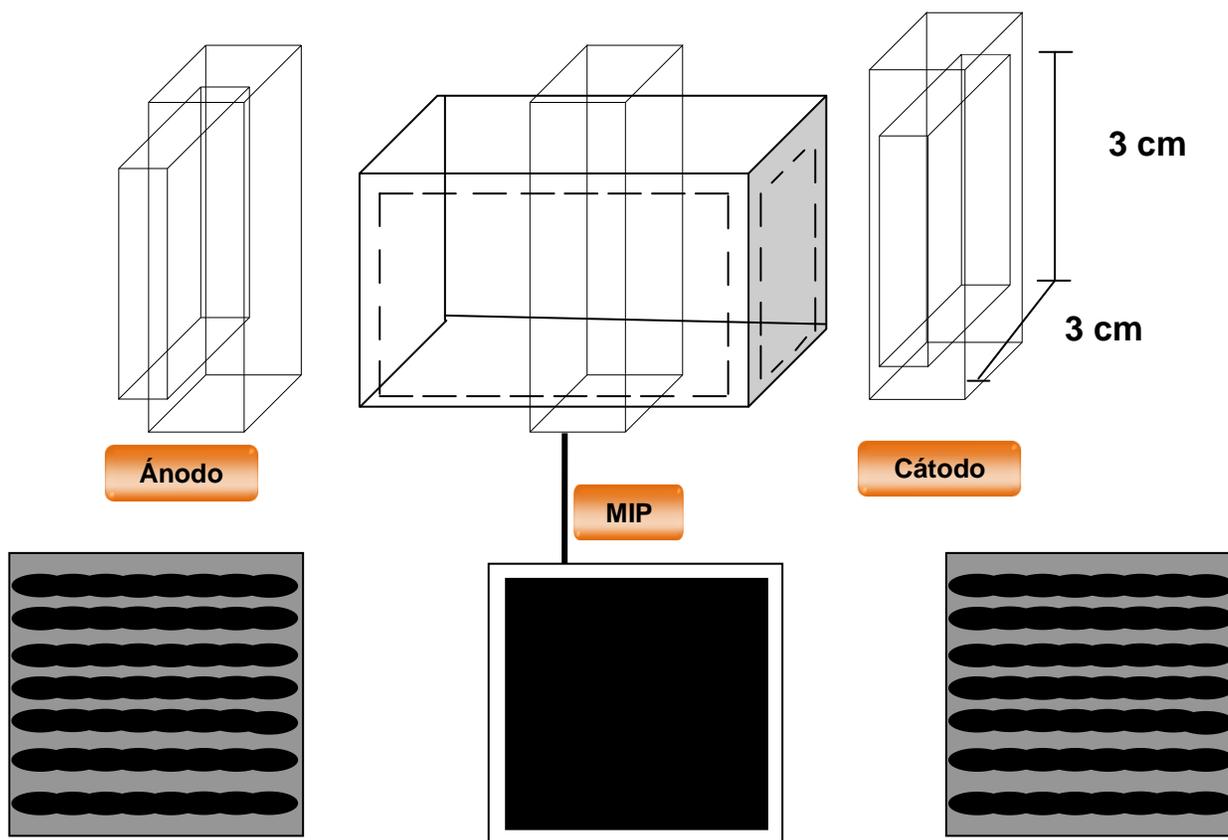


Figura 27. Celda de combustible microbiana equipada con biocátodo.

6.7 Actividad 7: Evaluación del desempeño de una celda de combustible microbiana equipada con biocátodo en la remoción simultánea de nitratos y compuestos clorados modelo.

6.7.1 Caracterización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo

La celda de combustible microbiana equipada con biocátodo (CCM-3) se caracterizó empleando, en la cámara anódica, inóculo enriquecido y en la cámara

catódica inóculo desnitrificante con 10 mg/L de tetracloruro de carbono. La curva de polarización y la variación de potencia con respecto a la intensidad de corriente de la CCM equipada con biocátodo se muestran en la figura 28. El valor de R_{int} fue calculado como la pendiente del conjunto de puntos alineados de la curva de polarización; el valor fue 1Ω (Tabla 8). La potencia máxima por unidad de área fue de 1.2 mW/m^2 y una potencia volumétrica máxima de 950 mW/m^3 .

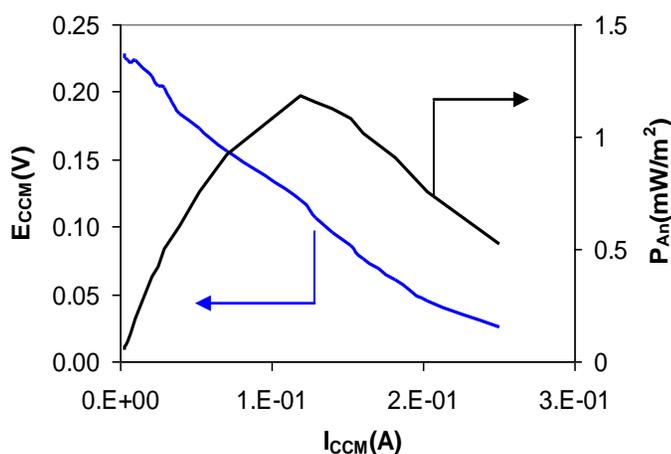


Figura 28. Curva de polarización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo

El voltaje máximo a circuito abierto fue de 0.261 V, mientras que el valor de voltaje máximo alcanzado bajo una resistencia externa fue de 0.228 V.

Se hicieron ensayos de cromatografía para cuantificar la concentración inicial y final de tetracloruro de carbono que contenía nuestra muestra así como también los metabolitos detectados durante la degradación del compuesto tóxico. La concentración inicial y final de tetracloruro de carbono fue de 10 y 0.002 mg/L, respectivamente. La muestra final, después de la caracterización de la CCM, presentaba una concentración de 0.16 mg/L de cloroformo y 0.02 mg/L de diclorometano.

Tabla 8. Caracterización de la celda de combustible microbiana equipada con biocátodo

Parámetro	CCM-3 ^a
R_{int}^b (Ω)	1 ± 0.005
P_{An-max}^c (mW/m^2)	1.2 ± 0.39
P_{V-max}^d (mW/m^3)	950 ± 319
$I_{CCM-max}^e$ (mA)	0.25 ± 0.08
$E_{CCM-max}^f$ (V)	0.228 ± 0.07
$P_{CCM-max}^g$ (mW)	0.04 ± 0.005

Notas: ^aCelda de combustible microbiana equipada con biocátodo; ^bResistencia Interna; ^cDensidad de potencia máxima; ^dPotencia volumétrica máxima, ^eIntensidad de corriente máxima; ^fVoltaje máximo; ^gPotencia de salida máxima.

6.8 Actividad 8: Implementación de las técnicas de biología molecular para la caracterización de consorcios microbianos

La tabla 9 muestra la composición de la población bacteriana obtenida de la biopelícula de la CCM-2 cargada con In-SR e In-E. *Clostridiales bacterium* estuvo presente en ambos inóculos. Los principales clones amplificados a partir de la biopelícula de la CCM-2 cargada con In-SR fueron *Clostridia* (42%), 98% de identidad con *Clostridiales bacterium*; δ -*Proteobacteria* (16%), 99% de identidad con *Desulfovibrio desulfuricans*; *Firmicutes* (16%), 96% de identidad con *Alkaliphilus oremlandii*, y una bacteria no cultivable (26%) 93% de identidad con *uncultured bacterium*.

Hubo una diferencia significativa en la composición de la comunidad entre ambos inóculos. *Clostridia* predominó en la comunidad de la biopelícula de la CCM-2 cargada con In-SR, mientras que la biopelícula de la celda cargada con In-E, los microorganismos predominantes pertenecen a la clase *Deferribacteres*. Esta diferencia se reflejó en el valor relativamente alto del índice de divergencia (0.75, Tabla 10).

Tabla 9. Diversidad bacteriana de la biopelícula de la celda de combustible microbiana paralelepípeda alimentada con diferentes inóculos

Inóculo	Clones	Identity (%)	Abundancia (%)	Clase
Sulfato-reductor	<i>Desulfovibrio</i>			
	<i>desulfuricans</i> (1)	100	16	<i>δ-Proteobacteria</i>
	<i>Clostriales</i>			
	<i>Bacteria</i> (3)	99	42	<i>Clostridia</i>
	<i>Alkaliphilus</i>			
	<i>oremlandii</i> (1)	96	16	<i>Firmicutes</i>
	<i>Uncultured</i>			<i>Uncultured</i>
Enriquecido	<i>bacteriua</i> (2)	93	26	<i>bacterium</i>
	<i>Geovibrio</i>			
	<i>ferrireducens</i> (1)	97	25	<i>Deferribacteres</i>
	<i>Geovibrio</i>			
	<i>Thiophilus</i> (1)	97	25	<i>Deferribacteres</i>
	<i>Denitrovibrio</i>			
	<i>acetiphilus</i> (1)	97	25	<i>Deferribacteres</i>
<i>Clostridiales</i>				
	<i>bacterium</i> (1)	98	25	<i>Clostridia</i>

Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Fung *et al.* 2006, quien enriqueció bacterias electroquímicamente activas en una CCM usando glucosa y glutamato (condiciones copiotróficas); su población enriquecida consistió de *γ-Proteobacteria* (36.5%), seguida por *Firmicutes* (27%) y *δ-Proteobacteria* (15%). Logan y Reagan 2006 observaron que las comunidades bacterianas que se desarrollaron en la CCM mostraron gran diversidad que van desde *δ-Proteobacteria*, que predomina en CCM de sedimentos hasta comunidades compuestas de *α-*, *β-*, *γ-* or *δ-Proteobacteria*, *Firmicutes* y clonas no caracterizadas en otro tipo de CCMs. Por otra parte *Geovibrio ferrireducens*, *Geovibrio thiophilus* and *Denitrovibrio acetiphilus* se sabe que contienen citocromos tipo c (Janssen *et al.* 2002). La evidencia actual sugiere que una serie

de citocromos tipo c asociados a la membrana interna, el periplasma y la membrana externa pueden interactuar para transferir electrones a la superficie de la membrana externa.

La población bacteriana en las biopelículas anódicas de nuestra celda no fue tan rica como las encontradas en otro tipo de inóculos. Por ejemplo, la diversidad dada por el índice de Shannon-Weaver fue de 1.27 y 1.38 y la equidad de especies dada por el índice de equidad de Pielou fue de 0.66 y 0.71, para el In-SR e In-E, respectivamente (Tabla 10). Estos resultados significan que la diversidad del inóculo fue relativamente baja y la equidad fue de baja a moderada, respectivamente.

Tabla 10. Índices ecológicos de los inóculos

Inóculo	Shanon-Weaver	Índice de Pielou	Δ_P^a
SR ^b	1.27	0.66	
E ^c	1.38	0.71	0.75

Notes: ^a Índice de divergencia de Poggi; compara la diferencia entre dos comunidades microbianas basadas en riqueza; ^bInóculo sulfato-reductor; ^cInóculo enriquecido

7. Conclusion

La CCM-2 cuyas principales características fueron el ensamblaje o arreglo tipo “sandwich” del cátodo-membrana-ánodo y la extensión del área superficial de los electrodos (mayor ξ) mostrando un rendimiento significativamente mayor que la celda donde los electrodos estaban separados (celda estándar). Los experimentos de caracterización mostraron que la CCM-2 permitió una reducción significativa en la resistencia interna de la celda comparada con celda estándar. La mejora en P_V se debió al efecto combinado en el incremento de ξ y la disminución de R_{int} .

La R_{int} de la CCM-2 alimentada con ambos inóculos fue significativamente menor que la R_{int} de la CCM-1, estos resultados se deben a los cambios en la arquitectura y la disminución de la distancia inter-electrodos.

Nuestros resultados confirman las ventajas del arreglo tipo “sandwich” de CMA sobre los electrodos separados, y demuestran la conveniencia de la conexión de las caras en paralelo de la CCM-2 con la finalidad de disminuir aún más la resistencia interna de la CCM-2 e incrementar P_V . Además, el procedimiento de enriquecimiento fue exitoso e indica la presencia de bacterias reductoras de Fe(III)

La celda de combustible microbiana equipada con biocátodo fue capaz de remover tetracloruro de carbono a una concentración de 10 mg/L

Por otra parte, se demostró la exitosa aplicación de técnicas de biología molecular para analizar la diversidad microbiana, el análisis directo del 16S DNA mostró baja riqueza de especies y una equidad de baja a moderada. La comunidad microbiana anclada en la CCM-2 consistió principalmente de *Clostridiales bacterium* y *Desulfovibrio desulfuricans*, éste último es un miembro de la δ -subdivisión of Proteobacteria. Estas bacterias son conocidas por su capacidad de transferir electrones y son definidas como “exoelectrógenos”. *Geovibrio ferrireducens*, *Geovibrio thiophilus*, y *Denitrovibrio acetiphilus* se sabe que contienen citocromos tipo c, la evidencia actual sugiere que una serie de citocromos tipo c asociados con la membrana interna, el periplasma y la membrana externa, pueden interactuar para transferir electrones al exterior de la membrana externa.

8. Referencias

- Aelterman P., Rabaey K., Pham H.T., Boon N., Verstraete W. Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* 2006 40:3388–3394
- Alzate-Gaviria L., Fuentes-Albarrán C., Álvarez-Gallegos A., Sebastian PJ. Generación de electricidad a través de una celda de combustible microbiana. *Interciencia* 2008;33(7): 510-517.
- Angenent L.; Karim K.; Al-Dahhan M.; Wrenn B.; Domínguez-Espinosa R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 2004 22(9): 477-485.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th edn., American Public Association 1989; Washington DC, USA.
- Aulenta F, Reale P, Canosa A, Rossetti S, Panero S, Majone M. Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene. *Biosensors and Bioelectronics* 2010;25(7):1796-802
- Bender, K. S.; Shang, C.; Chakraborty, R.; Belchik, S. M.; Coates, J. D.; Achenbach, L. A. Identification, characterization, and classification of genes encoding perchlorate reductase. *J. Bacteriol.* 2005, 187 (15), 5090–5096.
- Biffinger J., M. Ribbens, B. Ringeisen, J. Pietron, S. Finkel, K. Nealson, Characterization of electrochemically active bacteria utilizing a high-throughput voltage-based screening assay, *Biotechnol. Bioeng.* 102 2009 436–444.
- Bond D.; Holmes D.; Tender L.; Lovley D. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms that Harvest Energy from Marine Sediments. *Science.* 295 (18): 483-485.
- Bond D.; Lovley D. (2002). Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environ. Microbiol.* 4 (2): 115–124.
- Bond D.R.; Lovley D.R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl Environ Microbiol.* 69 (3): 1548–1555.
- Bond D.R.; Lovley D.R. (2005). Evidence for Involvement of an Electron Shuttle in Electricity Generation by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol.* 71 (4): 2186–2189.
- Bulter JE, F.H. Kaufmann, M.V. Coppi, C. Nunez, and D.R. Lovley, "MacA, a diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*", *J. Bacteriol.*, 2004 186, 4042-4045.
- Cao X, Huang X, Liang P, Boon N, Fan M, Zhang L, Zhang X. A completely anoxic microbial fuel cell using a photobiocathode for cathodic carbon dioxide reduction. *Energy Environ Sci* 2009 2:498–501
- Carmona-Martínez, A.; Solorza-Feria, O.; García-Mena, J.; Poggi-Varaldo, H. (2007). Caracterización de una celda de combustible microbiana (CCM) mediante una curva de polarización. *Proceedings of the VI Congreso de la Sociedad Mexicana del Hidrógeno y las Terceras Jornadas Iberoamericanas de Pilas de Combustible e Hidrógeno. full paper 015.* Ciudad de Chihuahua, México del 26 al 28 de septiembre de 2007.
- Chang I.S.; Moon H. Jang J.K.; Kim B.H. (2005). Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosens Bioelectron.* 20: 1856-1859.
- Chang IS, Moon H, Bretschger O, Jang JK, Park GI, Nealson KH, Kim BH. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006;16(2):163-177.
- Chaudhuri S.K.; Lovley D.R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotech.* 21 (10): 1229-1232.
- Cheng S. and Logan B. (2007). Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 9: 492-496.

- Cheng S.; Liu H.; Logan B. (2006-B). Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environ. Sci. Tech.* 40: 2426-2432.
- Cheng S.; Liu H.; Logan. (2006-A). Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells. *Environ. Sci. Tech.* 40: 346-369.
- Cheng S.; Liu H.; Logan B. (2006). Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochem. Commun.* 8: 489-494.
- Cheung H.; Gu J. (2003). Reduction of chromate (CrO_4^{2-}) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere.* 52: 1523-1529.
- Clark, J. J. J. Toxicology of Perchlorate. In Perchlorate in the Environment; Urbansky, E. T., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2000; pp 15-30.
- Clauwaert P., D. Van Der Ha, N. Boon, K. Verbeken, M. Verhaege, K. Rabaey, and W. Verstraete, *Environ. Sci. Technol.*, 2007a 41, 7564-7569.
- Clauwaert P., K. Rabaey, P. Aelterman, L. De Schamphelaire, T. H. Ham, P. Boechy, N. Boon, and W. Verstraete, "Biological denitrification in microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, 2007b 41(9), 3354-3360.
- Coates, J. D.; Achenbach, L. A. Microbial perchlorate reduction: Rocket-fuelled metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2 (7), 569-580.
- Das D.; Veziroglu T.N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy.* 26: 13-28.
- De Schamphelaire L., P. Boeckx, W. Verstraete, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010 87, 1675-1687.
- Deng Q, Li X, Zuo J, Liang A, Logan BE. Power generation using activated carbon fiber felt cathode in an upflow microbial fuel cell. *Journal of Power Sources* 2009;195(4): 1130-1135.
- Fan YZ, Hu HQ, Liu H. Enhanced coulombic efficiency and power cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration. *Journal of Power Sources* 2007;171(2): 348-354.
- Feng Y, Yang Q, Wang X, Logan BE. Treatment of graphite fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells. *Journal Power Sources* 2010;195(7):1841-1844.
- Freguia S., K. Rabaey, Z.G. Yuan, J. Keller, *Water Res.* 2008 42, 1387.
- Fung CY, Lee J, Chang IS, Kim BH. Bacterial communities in microbial fuel cells enriched with high concentrations of glucose and glutamate. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006;16(9):1481-1484.
- Du Z.; Li H.; Gu T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25: 464-482.
- Dunn S. (2002). Hydrogen futures: toward a sustainable energy system, *Int. J. Hydrogen Energy.* 27: 235-264.
- Elam C.; Gregoire C.; Sandrock G.; Luzzic A.; Lindbladd P.; Hagen E.F. (2003). Realizing the hydrogen future: the International Energy Agency's efforts to advance hydrogen energy technologies, *Int. J. Hydrogen Energy.* 28: 601-607.
- Gorm H., C. Cruzet, A.C.M. Bourg, H. Cristensen, *Environ. Sci. Technol.* 1994 28: 1698-1705.
- Gregory K.B.; Bond D.R.; Lovley D.R. (2004). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ Microbiol.* 6: 596-604.
- Gregory K.B.; Bond D.R.; Lovley D.R. (2005). Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environ Sci Tech.* 39: 8943-8947.
- Halliday D.; Resnick R.; Walker J. (2005). *Fundamentals of Physics.* 7th Edition. ISBN: 978-0-471-21643-8.
- Hatzinger, P. B. Perchlorate biodegradation for water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39 (11), 239A-247A.
- He Z.; Angenent L. (2006). Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis.* 18 (19-20): 2009-2015.

- Heilman J.; Logan B. (2006). Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Internat. J. Hydrogen Energy*. In press.
- Holmes D. E.; Nicoll J.; Bond D.; Lovley D. (2005). Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (10): 6023-6030.
- Huang L.P., B.E. Logan, Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 2008 655–664.
- Hyun MS, Kim BH, Chang IS, Park HS, Kim HJ, Kim GT, Kim M, Park DH. Isolation and identification of an anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1. *Journal of Microbiology* 1999;37(4): 206-212.
- Jang JK, Pham TH, Chang IS, Kang KH, Moon H, Cho KS, Kim BH. Construction and operation of a novel mediator-and membrane-less microbial fuel cell. *Process Biochemistry* 2004;39(8): 1007-1012.
- Janssen PH, Liesack W, Schink B. *Geovibrio thiophilus* sp. nov., a novel sulfur-reducing bacterium belonging to the phylum Deferribacteres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002;52(4):1341-134
- Jeremiase A.W., H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, 2009 Article in press.
- Kengen, S. W.; Rikken, G. B.; Hagen, W. R.; Van Ginkel, C. G.; Stams, A. J. M. Purification and characterization of (per)chlorate reductase from the chlorate-respiring strain GR-1. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 6706–6711.
- Kim Y, Hatzell MC, Hutchinson AJ, Logan BE. Capturing power at higher voltages from arrays of microbial fuel cells without voltage reversal. *Energy and Environmental Science* 2011;4(11):4662-4667
- Kim J.; Min B.; Logan B. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 23-30.
- Kim BH, Ikeda T, Park HS, Kim HJ, Hyun MS, Kano K, Takagi K, Tatsumi H. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnology Techniques* 1999b;13(7):475-478.
- Kim BH, Kim HJ, Hyun MS, Park DH. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Journal Microbiology Biotechnology* 1999c;9(2):127-131.
- Kim Y, Hatzell MC, Hutchinson AJ, Logan BE. Capturing power at higher voltages from arrays of microbial fuel cells without voltage reversal. *Energy and Environmental Science* 2011;4(11):4662-4667
- Kim BH, Park DH, Shin PK, Chang IS, Kim HJ. Mediator-less biofuel cell 1999, United States Patent.
- Lay J.J.; Fan K.S.; Chang J.; Ku Ch. H. (2003). Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *Int. J. Hydrogen Energy.* 28: 1361-1367.
- Lefebvre O., All-Mamun A., and H.Y. Ng, “A microbial fuel cell equipped with a biocathode for organic removal and denitrification”, *Water Sci. Technol* 2008
- Li B.; Logan B. (2004). Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces.* 36: 81-90.
- Liang, P.; Huang, X.; Fan, M.-F.; Cao, X.-X.; Wang C. (2007). Composition and distribution of internal resistance in three types of microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77:551-558
- Liang P., M. Pham, X. Cao, and X. Huang, “Evaluation of applied cathode potential to enhance biocathode in microbial fuel cells”, *Inter. Sci.*, 2008 DOI 10.1002/jctb.2114.
- Liu H, and B. Logan, “Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane”, *Environ. Sci. Technol.*, 2004 38, 4040-4046.
- Liu H.; Cheng S.; Logan B.E. (2005 A). Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol.* 39: 658-662.

- Liu H.; Shaoan C. Logan B. (2005b). Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5488-5493.
- Lloyd JR, Sole VA, Van Praagh CVG, Lovley DR. Direct and Fe(III)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(9):3743-3749.
- Logan B. E.; Hamelers B.; Rozendal R.; Shroder U.; Keller J.; Freguia S.; Aelterman P.; Verstraete W.; Rabaey K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ Sci Tech.* 40: 5181-5192.
- Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science and Technology* 2006;40(17): 5181-5192.
- Logan BE, Regan JM. Microbial challenges and applications. *Environmental Science and Technology* 2006;40(17):5172-5180.
- Logan B, "Extracting hydrogen electricity from and renewable resources", *Environ. Sci. Technol.*, 2004 161 A-167^a.
- Logan, B. E}. Treatment of perchlorate- and nitratecontaminated water in an autotrophic, gas phase, packed bed bioreactor. *Water Res.* 2002, 36, 3647–3653.
- Lopez-Lopez, E. Exposito, J. Anton, F. Rodriguez-Valera, A. Aldaz, *Biotechnol.Bioeng.* 1999 63, 79.
- Lovely DR, Phillips EJP. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediment. *Applied Environmental and Microbiology* 1986;51(4):683-689.
- Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Reviewers* 1991;55(2):259-287.
- Lovley DR, J.D. Costes, E.L. Blunt Harris, E.J.P. Phillips, and J.C. Woosward, "Humic substances as electron acceptors for microbial respiration", *Nature*, 1995 382: 445-447.
- Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci* 105(10):3968–3973.
- Martin E, Savadogo O, Guiot SR, Tartakovsky B. The influence of operational conditions of the performance of a microbial fuel cell seeded with mesophilic anaerobic sludge. *Biochemical Engineering Journal* 2010;51(3):132-139.
- Min B.; Cheng S.; Logan B. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res.* 39: 1675-1686.
- Mulder CPH, Bazeley-White E, Dimitrakopoulos PG, Scherer-Lorenzen AHM, Schmid B. Species evenness and productivity in experimental plant communities 2004;104:50-63.
- Myers CR, Myers JM. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* 1992;174(11):3429-3438.
- Nealson KH, Safarini DA. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology and regulation. *Annual Review of Microbiology* 1994;48:311-343
- Nerenberg, R.; Rittmann, B. E.; Najm, I. Perchlorate reduction in a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *J. Am. Water Works Assoc.* 2002, 94 (11), 103–114.
- Nevin KP, Lovley DR. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of soluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(5):2248-2251
- Newman DK, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* 2000;405(6782):94-97
- Niessen J.; Harnisch F.; Rosenbaum M.; Schröder U.; Scholz F. (2006). Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochem. Commun.* 8: 896-873.
- Niessen J.; Schröder U.; Rosenbaum M.; Scholz F. (2004b). Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 6: 571-575.

- Niessen J.; Schröder U.; Scholz F. (2004a). Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation - a bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochem. Commun.* 6: 955-958.
- Oh S.; Logan B. (2006). Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 162-169.
- Oh S.; Logan B. (2007). Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation. *Journal of Power Sources.* 167: 11-17.
- Park D.H.; Zeikus G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 1292-1297.
- Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.S., Kim, G.T., Kim, M., Chang, I.S., Park, Y.K. and Chang, H.I. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe* 2000 7, 297-306.
- Poggi-Varaldo H.M.; Valdés L.; Esparza-García F.; Fernández-Villagómez G. (1997). Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. *Wat Sci Tech.* 35 (2-3):197-204.
- Poggi-Varaldo, H.M., Carmona-Martínez, A., Vázquez-Larios, A.L., Solorza-Feria, O. (2009). Effect of inoculum type on the performance of a microbial fuel cell fed with spent organic extracts from hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes *J. New Materials Electrochemical Systems.* Accepted for publication
- Poggi-Varaldo HM, Barcenas-Torres JD, Moreno-Medina CU, Garcia-Mena J, Garibay-Orijel C, Rios-Leal E, Rinderknecht-Seijas N. Influence of discontinuing feeding degradable cosubstrate of the performance of a fluidized bed bioreactor treating a mixture of trichlorophenol and phenol. *Journal of Environmental Management* 2012; In Press doi:10.1016/j.jenvman.2012.03.015.
- Rabaey K.; Lissens G.; Siciliano S.D.; Verstraete W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol Lett.* 25 (18): 1531-1535.
- Rabaey K.; Van de Sompel K.; Maignien L.; Boon N.; Aelterman P.; Clauwaert P.; De Schamphelaire L.; The Pham H.; Vermeulen J.; Verhaege M.; Lens P.; Verstraete W. (2006). Microbial Fuel Cells for sulfide removal. *Environ. Sci. Tech.* 40: 5218-5224.
- Rabaey K.; Verstraete W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23 (6): 291-298.
- Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005a) Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ Sci Technol* 39:8077-8082
- Rabaey, K.; Boon, N.; Hofte, M.; Verstraete, W. (2005) Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3401-3408.
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 2005 435: 1098-1101.
- Reguera G, Nevin KP, Nicoll JS, Covalla SF, Woodard TL. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol* 2007 72: 7345-7348.
- Reimers C.; Tender L.; Fertig S.; Wang W. (2001). Harvesting energy from the marine sediment water interface. *Environ. Sci. Tech.* 35: 192-195.
- Richardson, D. J. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 2000 146, 551-571.
- Rismani-Yazdi H, Carver SM, Christy AD, Tuovinen OH. Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. *Journal of Power Sources* 2008;180(2): 683-694.
- Rodríguez-Castellanos. (2005). Diseño, construcción y estudio del desempeño de un electrolizador con membrana de intercambio catiónico. Tesis de Licenciatura (Ingeniero Químico Industrial). Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. Instituto Politécnico Nacional.

- Rosenbaum M.; Zhao F.; Quaas M.; Wulff H.; Schröder U.; Scholz F. (2007) Evaluation of Catalytic Properties of Tungsten Carbide for the Anode of Microbial Fuel Cells. *Appl. Catal., B. Environ.* 74: 262-270.
- Rozendal R.; Hamelers H.; Buisman C. (2006). Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5206-5211.
- Rozendal R.; Hamelers H.; Molenkamp R.; Buisman C. (2007). Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Res.* 41: 1984-1994.
- Sathish-Kumar K, Solorza-Feria O, Tapia-Ramírez J, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varaldo HM. Comparison of a chemical and electrochemical enrichment methods of a saline inoculum for microbial fuel cell. 9th International Symposium on New Materials and Nano-materials for Electrochemical Systems. XII International Congress of the Mexican Hydrogen Society Merida, Yuc., Mexico 9-13/07/2012 ISBN 978-607-8182-01-5.
- Schröder U. (2007). Anodic Electron Transfer Mechanisms in Microbial Fuel Cells and their Energy Efficiency. *Physical. Chemistry Chemical Physics.* 9: 2619-2629.
- Schröder U.; Nießen J.; Scholz F. (2003). A Generation of Microbial Fuel Cells with Current Outputs Boosted by More Than One Order of Magnitude. *Angew. Chem.* 115: 2986-2989.
- Shanon CE. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 1948;27:379-423
- Song T, Xu Y, Ye Y, Chen Y, Shen S, Chem J. Electricity generation from terephthalic acid using a microbial fuel cell *Journal of Chemical Technology Biotechnology* 2008;84(3): 356-360.
- Sparling R.; Risbey D.; Poggi-Varaldo H. (1997). Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. *Int. J. Hydrogen Energy.* 22 (6): 563-566.
- Standard Methods: Clesceri L. S.; Greenberg A. E.; Trussell R. R. (1989). Standard Methods for the examination of water and wastewater. Seventeenth edition. American Public Health Association.
- Strycharz, S. M.; Woodard, T. L.; Johnson, J. P.; Nevin, K. P.; Sanford, R. A.; Löffler, F. E.; Lovley, D. R. Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74 (19), 5943–5947.
- Tandukar M, Huber SJ, Onodera T, Pavlostathis SG. Biological chromium(VI) reduction in the cathode of a microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* 2009 43:8159–8165
- Tender L.; Reimers C.; Stecher H.; Holmes D.; Bond D.; Lowly D.; Piobello K.; Fertig S.; Lovley D. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotech.* 20: 821-825.
- Torres, C. I.; Marcus, A. K.; Lee, H. S.; Parameswaran, P.; Krajmalnik-Brown, R.; Rittmann, B. E. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009, in press; DOI:, 10.1111/j.1574-6976.2009. 00191.x.
- Tran H.T., D.H. Kim, S.J. Oh, K. Rasool, D.H. Park, R.H. Zhang, and D.H. Ahn, *Water Sci. Technol.*, 2009 1803-1808.
- Turik CE, Tisa IS, Caccavo FJ. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied Environmental and Microbiology* 2002;68(5):2436-2444.
- Valdez-Vazquez I.; Ríos-Leal E.; Carmona-Martínez A.; Muñoz-Páez K.; Poggi-Varaldo H. (2006b). Improvement of Biohydrogen Production from Solid Wastes by Intermittent Venting and Gas Flushing of Batch Reactors Headspace. *Environ. Sci. Tech.* 40: 3409-3415.
- Valdez-Vazquez I.; Ríos-Leal E.; Esparza-García F.; Cecchi F.; Poggi-Varaldo H.M. (2005 b). Semi-continuous solid substrate anaerobic digestors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrogen Energy.* 30: 1383-1391.
- Valdez-Vazquez I.; Ríos-Leal E.; Muñoz-Páez K.; Carmona-Martínez A.; Poggi-Varaldo H. (2006a). Effect of Inhibition Treatment, Type of Inocula, and Incubation Temperature on Batch H₂ Production From Organic Solid Waste. *Biotech. Bioeng.* 95: 3 342-349.

- Valdez-Vazquez I.; Sparling R.; Risbey D.; Rinderknecht-Seijas N.; Poggi-Varaldo H.M. (2005 a). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 1383-1391.
- Vazquez-Larios AL, Vazquez-Huerta G, Esparza-Garcia F, Rios-Leal E, Solorza-Feria O, Poggi-Varaldo HM. A new design improves performance of a single chamber microbial fuel cell *Journal of New Materials Electrochemistry Systems* 2010;13(3): 219-226}
- Vázquez-Larios AL, Solorza-Feria O, Vazquez-Huerta G, Esparza-Garcia F, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varaldo HM. 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. *International Journal of Hydrogen and Energy* 2011;36(1):6199-6209
- Wang A, Sun D, Ren N, Liu C, Liu W, Logan BE, Wu WM. A rapid strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells. *Biosource. Technology* 2010;101(2010):5733-5735
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991;173(2):697-703.
- Wünschiers R. and Lindblad P. (2002), Hydrogen in education: a biological approach, *Int. J. Hydrogen Energy*. 27: 1131-1140.
- D. Xing, Y. Zuo, S. Cheng, J. Regan, B.E. Logan. *Environ. Sci. Technol.* 2008 42:4146–4151.
- Yang Y.; Tada C. Tsukahara K., Sawayama S. (2004b). Methanogenic community and performance of fixed- and fluidized-bed reactors with reticular polyurethane foam with different pore sizes. *Mater. Sci. Eng., C* 24: 803.813.
- Yang Y.; Tada C.; Miah M.; Tsukahara K.; Yagishita T.; Sawayama S. (2004a). Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Mater. Sci. Eng., C* 24: 413.419.
- You S.J. , N.Q. Ren, Q.L. Zhao, J.Y. Wang, and F.L. Yang, *Fuell Cells*, 2009 1-9.