



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y
ARQUITECTURA**



**EVALUACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE LA
INDUSTRIA AZUCARERA PARA APLICACIONES EN
CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA**

TESIS DOCTORAL

Presenta

Yolanda Córdova Bautista

Director

Dr. Erik Ramírez Morales

Cunduacán, Tabasco

Agosto de 2018



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



DIRECCIÓN

OFICIO: DIR/DAIA/1510/2018
FECHA: 31 de Julio 2018
ASUNTO: Autorización de Impresión
Definitiva

C. M.C. YOLANDA CÓRDOVA BAUTISTA
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE.

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis denominado:

**“EVALUACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA AZUCARERA PARA
APLICACIONES EN CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA”**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería y en el cual el Dr. Erik Ramírez Morales ha sido el Director de Tesis.

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

DR. GERMÁN PÉREZ HERNÁNDEZ
DIRECTOR

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE
DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



DIRECCIÓN

C.c.p. Archivo

Dr.GPH/Dra.MAL/apl.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura



COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Cunduacán, Tabasco, a 12 de Julio de 2018

MEM/DCI/013/2018

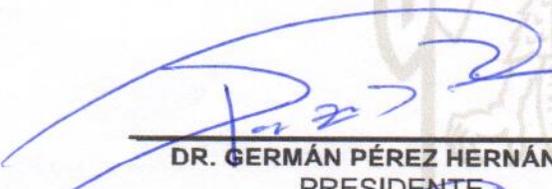
PARA: DR. GERMÁN PÉREZ HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE LA DAIA
DE: COMISIÓN SINODAL
ASUNTO: APROBACIÓN DE IMPRESIÓN TESIS DE DOCTORADO

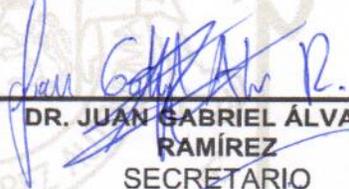
Una vez hecha la revisión detallada del Trabajo de Tesis denominado:

"EVALUACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA AZUCARERA PARA APLICACIONES EN CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA"

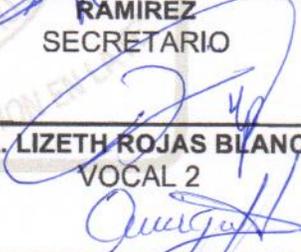
Desarrollado por la C. M.C. YOLANDA CÓRDOVA BAUTISTA del Doctorado en Ciencias en Ingeniería, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMISIÓN SINODAL

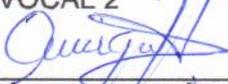

DR. GERMÁN PÉREZ HERNÁNDEZ
PRESIDENTE

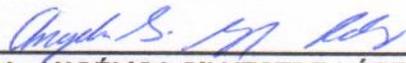

DR. JUAN GABRIEL ÁLVAREZ
RAMÍREZ
SECRETARIO


DR. ERIK RAMÍREZ MORALES
VOCAL 1


DRA. LIZETH ROJAS BLANCO
VOCAL 2


DRA. MARÍA DEL CARMEN FUENTES
ALBARRAN
VOCAL 3


DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ
RIVERA
VOCAL 4


DRA. ANGÉLICA SILVESTRE LÓPEZ RODRÍGUEZ
VOCAL 5

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto físicamente como digitalmente la tesis de grado denominada **"EVALUACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA AZUCARERA PARA APLICACIONES EN CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA"**, de la que soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes mencionado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Cunduacán, Tabasco, a los 02 días del mes de Agosto del año 2018.

AUTORIZO

M.C. YOLANDA CÓRDOVA BAUTISTA

Dedicatoria

Al diseñador del reciclado perfecto "Jehová".
Pues el atrae hacia arriba las gotas de agua; se filtran como lluvia para su neblina, de modo que las nubes destilan, gotean sobre la humanidad abundantemente (Job 36: 27-28, 1473 a. E. C.).

A mis hijos Ángel Gabriel Martínez Córdova y Karla Gabriela Martínez Córdova y a mi esposo Gabriel Martínez Pereyra.

Agradecimiento

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por darme la oportunidad de haber realizado este proyecto.

Al Dr. Erik Ramírez Morales le agradezco grandemente por aceptar la asesoría de este proyecto y permitirme formar parte de su grupo de tesis. Gracias por su apoyo y por animarme en los momentos difíciles.

Al Dr. German Pérez Hernández por permitirme trabajar en el Laboratorio de Instrumentación y Control, que fue parte fundamental para concluir el doctorado.

A la Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales compañera de trabajo y amiga por permitirme desarrollar el trabajo de doctorado en el Laboratorio de Biotecnología. Además, por darme ánimo en momentos críticos.

A mis hijos Ángel y Karla y a mi esposo por tomar parte del tiempo que les correspondía y por su comprensión.

A mis padres y mis hermanos por su comprensión.

A Johany Silvan, Francisco Cerino, María Alejandra Castellanos, Guillermo Ulises Vásquez y Darmeli Jiménez por su gran apoyo.

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE VARIABLES	IX
RESUMEN.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. OBJETIVOS.....	4
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 EFECTO DEL USO DE COMBUSTIBLES FÓSILES Y LA DEMANDA DE AGUA	6
2.2 SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS (SBE'S)	7
2.3 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LAS CCM'S	9
2.3.1 <i>Reacciones químicas en los compartimentos de una CCM</i>	10
2.4 BACTERIAS ELECTROQUÍMICAMENTE ACTIVAS	12
2.4.1 <i>Mecanismos de transferencia de electrones</i>	13
2.4.1.1 Transferencia directa de electrones (TDE)	14
2.4.1.2 Transferencia de electrones por un mediador (TME)	15
2.4.1.3 TME vía exógenos (Mediador redox artificial)	15
2.4.1.4 TME a través de metabolitos secundarios	15
2.4.1.5 TME a través de metabolitos primarios	16
2.5 IMPACTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN Y COMPONENTES SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA CCM	17
2.5.1 <i>Parámetros de diseño del sistema</i>	17
2.5.2 <i>Parámetros de operación</i>	18
2.5.3 <i>Resistencia externa y potencial redox</i>	18
2.5.4 <i>pH</i>	18
2.5.5 <i>Carga y concentración del sustrato</i>	19
2.5.6 <i>Parámetros biológicos</i>	19
2.5.7 <i>Ciclo del crecimiento microbiano</i>	21
2.6 RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD	23
2.6.1 <i>Pérdidas de voltaje en la CCM</i>	23
2.6.2 <i>Caracterización de las pérdidas de voltaje</i>	25
2.6.2.1 Pérdidas por activación	27
2.6.2.2 Pérdidas óhmicas	27
2.6.2.3 Pérdidas por concentración	28
2.7 DESEMPEÑO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIOLÓGICA.....	29
2.8 MODELADO EN LOS SISTEMAS DE CCM'S.....	31
2.8.1 <i>Modelos basados en mecanismos</i>	33
2.8.1.1 Modelos de consumo de sustrato y crecimiento bacteriano	33
2.8.1.2 Modelos electroquímicos.....	34
2.8.1.3 Modelos de biopelículas.....	35
2.8.2 <i>Modelos basados en la aplicación</i>	36
2.8.2.1 Modelo eléctrico	36
2.8.2.2 Modelos de aprendizaje y control.....	37
III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	40
3.1 ETAPA I: EVALUACIÓN DEL DESARROLLO POBLACIONAL DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS CON CAPACIDAD PARA REMOVER LA DQO	40

3.1.1	<i>Sitio para el muestreo de agua residual industrial</i>	40
3.1.2	<i>Evaluación de bacterias totales en muestras</i>	41
3.1.3	<i>Caracterización morfológica de bacterias</i>	42
3.1.4	<i>Pruebas bioquímicas y fisiológicas de cepas bacteriana</i>	44
3.1.5	<i>Identificación por secuencia de ADN</i>	44
3.1.6	<i>Crecimiento de Cepa BSC-2 a diferentes pH's</i>	45
3.2	ETAPA II. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE <i>B. SUBTILLIS</i> BSC-2 EN LA REMOCIÓN DE LA DQO	45
3.2.1	<i>Preparación de los microorganismos</i>	45
3.2.2	<i>Diseño experimental para evaluar la degradación de la materia orgánica en agua residual sintética</i>	46
3.2.3	<i>Establecimiento de unidades experimentales</i>	47
3.3	ETAPA III: EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ELECTROGÉNICA DE <i>B. SUBTILLIS</i> BSC-2	48
3.3.1	<i>Construcción de celda de combustible microbiana</i>	48
3.3.2	<i>Electrodos</i>	49
3.3.2.1	Ánodo	49
3.3.2.2	Cátodo	50
3.3.3	<i>Membrana intercambiadora de protones</i>	51
3.3.4	<i>Electrolitos</i>	52
3.3.4.1	Anolito	52
3.3.4.2	Catolito	52
3.3.5	<i>Diseño experimental</i>	53
3.3.6	<i>Cálculos y mediciones analíticas</i>	54
3.3.6.1	Determinación de la población de <i>B. Subtilis</i>	54
3.3.6.2	Determinación de Azúcares	54
3.3.6.3	Determinación de la DQO	55
3.3.6.4	Cálculo de la eficiencia Coulómbica	55
3.3.6.5	Cálculos de parámetros eléctricos	56
3.3.7	<i>Análisis de biopelícula electroactiva</i>	57
3.3.7.1	Microscopía de barrido electrónico	57
3.3.7.2	Cuantificación y cinética de formación de biopelícula	57
3.3.7.3	Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	58
3.3.7.4	Voltamperometría cíclica	58
3.3.8	<i>Modelos cinéticos para crecimiento microbiano y consumo de sustrato en tratamiento optimizado</i>	59
3.4	ETAPA IV: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA EN DOS CONFIGURACIONES DE CCM	61
3.4.1	<i>Remoción de la DQO y producción de electricidad en CCM-U y CCM-D</i>	61
3.4.2	<i>Construcción de dos configuraciones de CCM</i>	62
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE AISLADOS BACTERIANOS	65
4.1.1	<i>Caracterización fenotípica</i>	65
4.1.2	<i>Caracterización genotípica</i>	67
4.1.3	<i>Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i> BSC-2</i>	68
4.2	INFLUENCIA DEL PH Y EL TIEMPO EN LA REMOCIÓN DE LA DQO	69
4.2.1	<i>Superficie de respuesta para % de remoción de DQO</i>	70
4.3	GENERACIÓN DE VOLTAJE, CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO DE <i>B. SUBTILLIS</i>	72
4.3.1	<i>Relación entre el voltaje, consumo de sustrato y crecimiento de <i>B. subtilis</i> BSC-2</i>	74
4.4	EFFECTO DEL PH ANÓDICO Y LA RESISTENCIA EXTERNA SOBRE LA DENSIDAD DE POTENCIA	74
4.4.1	<i>Optimización mediante diseño factorial completo</i>	74
4.4.2	<i>Superficie de respuesta y contornos</i>	77
4.5	CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO DE <i>B. SUBTILLIS</i> EN CCM OPTIMIZADA	80

4.6	CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULA ELECTROACTIVA DE <i>B. SUBTILIS</i> BSC-2	82
4.6.1	<i>Cinética de la colonización de B. Subtilis BSC-2 sobre el ánodo</i>	83
4.7	ANÁLISIS FTIR DE BIOPELÍCULA DE <i>B. SUBTILIS</i> ADHERIDA SOBRE EL ÁNODO	84
4.8	ANÁLISIS VOLTAMPEROMÉTRICO	86
4.9	REMOCIÓN DE LA DQO Y EFICIENCIA COULÓMBICA EN DOS CONFIGURACIONES DE CCM	88
4.10	GENERACIÓN DE ELECTRICIDAD EN LAS CCM'S	89
4.11	COMPORTAMIENTO DEL PH Y LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	90
4.12	COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA INTERNA EN LA CCM-U Y EN LA CCM-D.....	92
V.	CONCLUSIONES	94
VI.	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	95
VII.	REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1. TIPOS DE SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS.	8
TABLA 2.2. ESPECIES DE BEA EN CCM'S.....	12
TABLA 2.3. MODELOS MATEMÁTICOS QUE DESCRIBEN LA DENSIDAD DE CORRIENTE.	35
TABLA 3.1. MORFOLOGÍA COLONIAL SEGÚN FORMA, ELEVACIÓN Y BORDE.....	42
TABLA 3.2. VARIABLES Y SUS NIVELES DEL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 3^2 PARA REMOCIÓN DE DQO.	47
TABLA 3.3. VARIABLES Y SUS NIVELES DEL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 3^2 PARA EL SISTEMA DE CCM.	54
TABLA 4.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CEPAS BACTERIANAS.	67
TABLA 4.2. ANOVA PARA EL MODELO CUADRÁTICO DEL % DE REMOCIÓN DE DQO.	69
TABLA 4.3. COEFICIENTES ESTIMADOS A PARTIR DE LA REGRESIÓN.....	70
TABLA 4.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN DE VARIABLES: CONSUMO DE SUSTRATO, CRECIMIENTO BACTERIANO Y VOLTAJE.	74
TABLA 4.5. DISEÑO FACTORIAL COMPLETO CON SUS NIVELES EXPERIMENTALES CODIFICADOS DE VARIABLES INDEPENDIENTES Y VALORES DE REPUESTA OBSERVADOS.	75
TABLA 4.6. RESULTADOS DEL ANOVA PARA EL MODELO CUADRÁTICO DE LA DENSIDAD DE POTENCIA.	75
TABLA 4.7. EFECTO DE LOS FACTORES PARA EL MODELO COMPLETO Y MODELO REDUCIDO.	76
TABLA 4.8. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN DE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS ADHERIDAS SOBRE EL ÁNODO.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. ESQUEMA DE CCM CON MEMBRANA PERMEABLE A PROTONES DE A) DOBLE CÁMARA Y B) UNA SOLA CÁMARA CON CÁTODO EXPUESTO AL AIRE.	9
FIGURA 2.2. TDE VÍA: A) CITOCROMOS UNIDOS A LA MEMBRANA Y B) NANOCABLES CONDUCTIVOS.....	14
FIGURA 2.3. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES POR UN MEDIADOR VÍA METABOLITOS SECUNDARIOS MICROBIANOS.	16
FIGURA 2.4. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES POR UN MEDIADOR VÍA METABOLITOS PRIMARIOS MICROBIANOS. A) A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DE LOS ACEPTORES TERMINALES DE ELECTRONES (USO DE RESPIRACIÓN ANAEROBIA) B) A TRAVÉS DE LA OXIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS REDUCIDOS DE LA FERMENTACIÓN.	17
FIGURA 2.5. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE UNA CÉLULA PROCARIOTA. A) ESTRUCTURA DEL ÁCIDO TEICOICO DE LAS GRAM (+). B) REPRESENTACIÓN DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS EN LAS GRAM(-).	21
FIGURA 2.6. CURVA TÍPICA DE CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN BACTERIANA. 1: FASE LATENTE, 2: FASE EXPONENCIAL, 3: FASE ESTACIONARIA Y 4: FASE DE MUERTE.	22
FIGURA 2.7. CURVA DE POLARIZACIÓN GENERAL PARA UNA CÉLULA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA QUE MUESTRA LAS REGIONES DOMINADAS POR DIFERENTES TIPOS DE PÉRDIDAS DE POTENCIAL (DOMÍNGUEZ ET AL., 2012).	26
FIGURA 2.8. CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS APLICADOS A LAS CCM'S.	32
FIGURA 2.9. MODELO BÁSICO DE CIRCUITO EQUIVALENTE DE UNA CCM. V_{CCM} , VOLTAJE DE LA CCM; V_{CA} , VOLTAJE A CIRCUITO ABIERTO; C_{DL} , CAPACITOR DE DOBLE CAPA; R_{OHM} , RESISTENCIA ÓHMICA; RACT, RESISTENCIAS POR ACTIVACIÓN; RCON, RESISTENCIAS POR CONCENTRACIÓN....	37
FIGURA 3.1. LOCALIZACIÓN DE SITIO DE MUESTREO DE AGUAS RESIDUALES DEL INGENIO SANTA ROSALÍA.	40
FIGURA 3.2. A) MUESTREO DE AGUAS RESIDUALES EN CANAL DE DESAGÜE DEL INGENIO; B) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SIEMBRA DE MICROORGANISMOS.	41
FIGURA 3.3. SIEMBRA DE MICROORGANISMOS EN PLACAS PETRI CON AGAR NUTRIENTE.....	41
FIGURA 3.4. A) BACTERIAS EXPRESADAS DESPUÉS DE LAS 72 HORAS DE LA SIEMBRA. B) PROCESO DE AISLAMIENTO Y C) CINCO CEPAS AISLADAS DE AGUAS RESIDUALES DEL INGENIO AZUCARERO.	42
FIGURA 3.5. ANÁLISIS DE LA TINCIÓN DE BACTERIAS EN UN MICROSCOPIO BINOCULAR BIOLÓGICO CON CÁMARA DIGITAL.	43
FIGURA 3.6. GALERÍA DEL SISTEMA API 20-E PARA LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA.	44
FIGURA 3.7. PREPARACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE UNIDADES EXPERIMENTALES PARA BIOENSAYO.....	47
FIGURA 3.8. ANÁLISIS DE DQO EN UNIDADES EXPERIMENTALES.	48

FIGURA 3.9. ESQUEMA DE LA CCM DE DOBLE CÁMARA. 1) CÁMARA ANÓDICA; 2) CÁMARA CATÓDICA; 3) MIP; 4) ÁNODO; 5) CÁTODO; 6) TOMA DE MUESTRA; 7) ENTRADA DE FLUIDO; 8) ENTRADA DE AIRE; 9) ENTRADA DE FLUIDO; 10) VENDEO ATMOSFÉRICO; 11) TABLERO DEL CIRCUITO; 12) RESISTENCIA EXTERNA; 13) MULTÍMETRO; 14) SALIDA DE FLUIDO.	49
FIGURA 3.10. LIMPIEZA E INSTALACIÓN DE ELECTRODO DE FIELTRO DE GRAFITO PARA CÁMARA ANÓDICA.	50
FIGURA 3.11. LIMPIEZA DE ELECTRODO DE TELA DE CARBÓN 40% PT, 0.3 MG/CM ² PARA CÁMARA ANÓDICA	50
FIGURA 3.12. PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA NAFION 117 PARA SU UTILIZACIÓN EN LA CCM.	51
FIGURA 3.13. PREPARACIÓN DE CATOLITO E INSTALACIÓN DE CÁMARA CATÓDICA.	53
FIGURA 3.14. REACCIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO FENOL-SULFÚRICO A) PARA LA CURVA PATRÓN DE AZÚCARES TOTALES Y B) AZÚCARES TOTALES DE UNIDADES EXPERIMENTALES.	55
FIGURA 3.15. ANÁLISIS DE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA DE ANOLITO.	59
FIGURA 3.16. ESQUEMA DE LA CELDA DE LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A) CCM-U CON CÁTODO EXPUESTO AL AIRE. B) CCM-D.	63
FIGURA 4.1. COLONIAS DE BACTERIAS ENCONTRADAS EN AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA AZUCARERA. A) CEPA BCC-1 Y B) CEPA BSC-2.	65
FIGURA 4.2. TINCIÓN DE GRAM (SUPERIOR) Y MICROGRAFÍAS SEM (INFERIOR), PARA A) CEPA BCC-1 Y B) CEPA BSC-2.....	66
FIGURA 4.3. POBLACIÓN DE <i>B. SUBTILIS</i> BSC-2 A PH'S DE 5, 6, 7 Y 8. BARRAS CON MISMA LETRA SON ESTADÍSTICAMENTE IGUALES.....	68
FIGURA 4.4. EFECTO DE LOS NIVELES DE CADA FACTOR EN LA REMOCIÓN DE LA DQO.	71
.....	73
FIGURA 4.5. COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> Y GENERACIÓN DE VOLTAJE. A) CURVA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO. B) VOLTAJE EN CIRCUITO ABIERTO. (BARRAS DE ERROR CON N=3).	73
.....	79
FIGURA 4.6. A) SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA DENSIDAD DE POTENCIA. B) GRÁFICO DE CONTORNO PARA DENSIDAD DE POTENCIA.	79
FIGURA 4.7. A) VALORES DE CRECIMIENTO DE <i>B. SUBTILIS</i> BSC-2 Y MODELO AJUSTADO POR ECUACIÓN 3.9. B) VALORES DE CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y MODELO AJUSTADO POR LA ECUACIÓN 3.11.	81
FIGURA 4.8. IMÁGENES SEM DE ÁNODO DE FIELTRO DE GRAFITO: A) ANTES DE LA OPERACIÓN DE LA CELDA. B) DESPUÉS DE 61 HORAS DE OPERACIÓN Y C) 70 HORAS DE OPERACIÓN.	82
FIGURA 4.9. TENDENCIA DE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS ADHERIDAS AL ÁNODO.....	84
FIGURA 4.10. ESPECTROS IR DE BIOPELÍCULA SOBRE EL ÁNODO A LA PRIMERA HORA Y 60 HORAS DESPUÉS DE LA OPERACIÓN DE LA CCM.....	85

FIGURA 4.11. VOLTAMPEROGRAMA CÍCLICO DE *B. SUBTILLIS* BSC-2. A) MEDIO SINTÉTICO ESTÉRIL FRESCO ANTES DE LA INOCULACIÓN. MEDIO ANÓDICO CON BIOMASA SUSPENDIDA Y SOBRENADANTE B) A LAS 40 HORAS, C) 64 HORAS Y D) 88 HORAS DE INICIO DE EXPERIMENTO... **88**

FIGURA 4.12. REMOCIÓN DE DQO Y EFICIENCIA COULÓMBICA (EC) PARA LA CCM-U Y CCM-D. **89**

FIGURA 4.13. VOLTAJE A CIRCUITO ABIERTO EN DOS CONFIGURACIONES DE CELDA (CCM-U Y CCM-D). FLECHAS INDICAN LA ADICIÓN DE SUSTRATO FRESCO. **90**
..... **92**
..... **92**

FIGURA 4.14. A) COMPORTAMIENTO DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA Y EL PH EN LA CCM-D. B) COMPORTAMIENTO DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA Y EL PH EN LA CCM-U. **92**

FIGURA 4.15. CURVA DE POLARIZACIÓN Y AJUSTE PARA CÁLCULO DE RESISTENCIA INTERNA EN: A) CCM-U Y B) CCM-U..... **93**

LISTA DE ABREVIATURAS

CCM	Celda de Combustible Microbiana
VCA	Voltaje a Circuito Abierto
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa
BEA	Bacterias Electroquímicamente Activas
SBE	Sistemas Bioelectroquímicos
CESM	Celda de electrosíntesis microbiana
CRM	Celda de Remediación Microbiana
CEM	Celda de Electrólisis Microbiana
CDM	Celda de desalinación microbiana
CCFM	Celda de combustible foto-microbiana
FADH ₂	Flavín Adenín Dinucleótido
FEM	Fuerza Electromotriz
MIP	Membrana Intercambiadora de Protones
DQO	Demanda Química de Oxígeno
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CCM-D	Celda de Combustible Microbiana de Doble Cámara
CCM-U	Celda de Combustible Microbiana de Una Cámara
Pb	Pares de bases
FT-IR	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier
EPS	Exopolisacáridos
CRS	Carga Eléctrica Real Debida al Sustrato
CTS	Carga Eléctrica Teórica Debida al Sustrato

LISTA DE VARIABLES

V	Voltaje
E_c	Potencial de Cátodo
E_a	Potencial de Ánodo
P	Potencia
DI	Densidad de Potencia
I	Intensidad de Corriente
DI	Densidad de Corriente
E_{cel}	Potencial de Celda
E_{term}	Potencial Termodinámico
η_{act}	Pérdida por activación debido a la lenta cinética de reacción
η_{ohm}	Pérdida óhmica de resistencias iónicas o electrónicas
η_c	pérdida por concentración
E_b	Potencial (ordenada al origen) de la ecuación de regresión
R_{int}	Resistencia interna
R_{ext}	Resistencia externa
η_{DQO}	Eficiencia en la remoción de DQO
η_{COUL}	Eficiencia Coulómbica
r	Tasa de Crecimiento Celular
X	Concentración de Células
μ	Tasa de Crecimiento Específico
X_0	Concentración celular inicial
$LogN$	Logaritmo Decimal de los Recuentos Microbianos

A	Logaritmo de los Recuentos Asintóticos iniciales
C	Logaritmo de los recuentos asintóticos de la fase log
M	Tiempo Requerido para la Máxima Velocidad de Crecimiento
B	Velocidad de crecimiento relativa al tiempo M
α	Coefficiente de transferencia de carga de la reacción anódica
F	Constante de Faraday
R	Constante de Gases Ideales
T	Temperatura
S_d	Concentración inicial de sustrato
K_{bio}	Conductividad de la Biopelícula
K_{sd}	Tasa de velocidad media para el aceptor de electrones
q_{max}	Tasa máxima de consumo de sustrato
$\mu_{e/m}$	Tasa de crecimiento para biomasa electrógena/metanógena
$K_{d,e/m}$	Tasa de disminución de la biomasa electrógena/metanógena
$c_{x,e/m}$	Concentración de biomasa electrógena/metanógena
S_t	Concentración de sustrato a un tiempo t
S_0	Concentración inicial de sustrato
k_0	Tasa de consumo del sustrato de orden cero
k_1	Tasa de consumo del sustrato de primer orden
k_2	Tasa de consumo del sustrato de segundo orden

RESUMEN

Los desechos orgánicos como las aguas residuales tienen el potencial de ser utilizados como materia prima para generar productos y energía de alto valor. Para mejorar el rendimiento es razonable usar las bacterias propias de estos entornos. En esta tesis se ha estudiado el potencial de las aguas residuales de la industria azucarera como combustible en las CCM's, así como la actividad electrogénica de los microorganismos presentes en estas aguas residuales. Este trabajo fue desarrollado en cinco etapas. En la primera etapa, se realizó el aislamiento y la clasificación de los microorganismos presentes en las aguas residuales. Solo dos microorganismos fueron encontrados *Bacillus cereus* BCC-1 y *Bacillus subtilis* BSC-2. Por cuestiones de bioseguridad sólo la cepa *B. subtilis* BSC-2 fue utilizada como bioelectrógeno. En la segunda etapa se evaluó la capacidad *B. subtilis* BSC-2 para degradar la demanda química de oxígeno (DQO) en agua residual sintética. Para esto se estableció un diseño experimental con arreglo de factores (3^2). Los factores fueron pH y tiempo de retención hidráulica (TRH). En la tercera etapa se evaluó la generación de potencia en la CCM utilizando *B. subtilis* BSC-2. En esta etapa el sistema fue estudiado mediante la aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y los factores considerados fueron el pH y la resistencia externa (R_{ext}). La máxima densidad de potencia de 402.55 ± 2.63 mW/m² fue observada a pH de 8.6 y resistencia de 220 Ω . En las condiciones de operación optimizadas fue caracterizada la biopelícula de *B. subtilis* BSC-2 que creció sobre el ánodo y esta fue caracterizada por espectroscopía de infrarrojo cercano (FTIR), microscopía de barrido electrónico (SEM) y por voltamperometría cíclica se elucidó el mecanismo de transferencia de electrones. También fue estudiada la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *B. subtilis* BSC-2. Mediante el ajuste de los datos de crecimiento al modelo de Gompertz la tasa específica de crecimiento (μ) fue de 0.19 1/h. Mientras que, con el ajuste de los datos de consumo de sustrato al modelo de primer orden, la tasa de consumo de sustrato (k) encontrada fue de 0.019 1/h. Finalmente, en la quinta etapa se estudió el efecto de dos configuraciones de CCM sobre la remoción de DQO, la eficiencia coulombica y la generación de voltaje. Los

mecanismos de remoción de DQO y EC siguen diferentes mecanismos tanto en una CCM de doble cámara (CCM-D) como en una CCM de una cámara (CCM-U).

El trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido comprobar, a escala de laboratorio, que las aguas residuales de la industria azucarera contienen microorganismos que pueden ser utilizados como bioelectrógenos en las CCM's y que de las aguas residuales de la industria azucarera se puede producir energía.

ABSTRACT

Organic wastes such as wastewater have potential to be used as raw material to generate high value products and energy. The performance of MFCs may be improved by autochthonous electricigens. This thesis describes an investigation about potential of the sugar industry wastewater as fuel in MFC. As well as electrochemical activity of microorganism isolated of the wastewater. The work was developed by five stages. In the first stage, the isolation and classification of the microorganisms was carried out. Only two bacterial strains were found: *Bacillus cereus* BCC-1 and *Bacillus subtilis* BCC-2. In the second stage, *B. subtilis* strain was evaluated to degrade the chemical oxygen demand (COD) in synthetic wastewater. A three level two factor full factorial design was used. The considered independent variables or factors were pH and hydraulic retention time (HRT). In third stage, the power generation of the MFC was evaluated using *B. subtilis* BSC-2 strain. Response Surface Methodology (RSM) was used for optimization, the independent variables were pH and external resistance (R_{ext}). The maximum power density was $402.55 \pm 2.63 \text{ mW} / \text{m}^2$ in pH of 8.6 and an external resistance of 220 Ω . Under optimized operating conditions the *B. subtilis* BSC-2 biofilm, which grew on the anode was characterized by near infrared spectroscopy (FTIR) and electronic scanning microscopy (SEM). Therefore, electron transfer mechanism was elucidated by cyclic voltammetry. On the other hand, the growth kinetics and substrate consumption of *B. subtilis* BSC-2 strain was studied.

By adjusting the growth data to the Gompertz model, the specific growth rate (μ) was 0.19 1 / h. While, with the adjustment of the substrate consumption data to the first-order model, the substrate consumption rate (k) was 0.019 1 / h. Finally, in the fifth stage, the effect of two CCM configurations on COD removal, coulomb efficiency and voltage generation was studied. The mechanisms for COD and EC removal follow different mechanisms in both a dual chamber CCM (CCM-D) and a single chamber CCM (CCM-U). The work has made it possible to verify on laboratory scale, that the wastewater from the sugar industry contains microorganisms that can be used as electricigens in the CCM's and that energy can be produced from the wastewater of the sugar industry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La demanda global de energía está aumentando debido al crecimiento de la población y el 87% de la energía utilizada es proveniente de los combustibles fósiles (Biresselioglu y Yelkenci, 2016). Por otro lado, la contaminación ambiental causada por la generación de residuos y el calentamiento global están asociados a la explotación de los combustibles fósiles. Por lo tanto, existe la necesidad de fuentes de energías alternativas ambientalmente sostenibles como la eólica, solar fotovoltaica, biomasa e hidroeléctrica.

Para lograr el desarrollo sostenible se requiere de tres pasos; 1) El cambio de fuentes de energías altamente contaminantes por energías renovables, 2) La optimización de los procedimientos para el tratamiento de las aguas residuales, así como 3) mejorar la eficiencia en las técnicas de recuperación de energía en la industria.

Las aguas residuales contienen entre 3 y 10 veces más energía que la necesaria para tratar aguas residuales. Así que si cada gramo de demanda química de oxígeno (DQO) contiene 14.7 kJ, el total de energía que se podría hacer disponible en todo el mundo para 7 mil millones de personas es alrededor de 2.2 a 4.4×10^{18} J/año. Esta cantidad de energía equivale a quemar alrededor de 52-104 millones de toneladas de petróleo en una central eléctrica (Gude, 2016). La población continúa creciendo y los impactos al medio ambiente también aumenta., entonces se necesita desarrollar tecnologías donde se puedan utilizar los residuos como combustible para la recuperación de energía.

Los sistemas bioelectroquímicos (SBE) representan una tecnología limpia emergente que puede generar simultáneamente electricidad (Celda de combustible microbiana-CCM), producir hidrógeno (Celda de electrólisis microbiana-CEM) y puede tratar aguas residuales mediante la oxidación de la materia orgánica y convertir la energía química en electricidad. A pesar de que las CCM's actualmente no son consideradas como una fuente de energía capaz de sustituir los combustibles fósiles, su capacidad de recuperación de energía eléctrica la hacen tema de interés. Ya que se ha demostrado su capacidad para generar electricidad mientras se tratan las aguas residuales (Martinucci et al., 2015).

En las CCM's los microorganismos electroquímicamente activos funcionan como catalizadores en la reacción bioelectroquímica. Estos pueden utilizar la materia orgánica presente en las aguas residuales para su ciclo biológico que comprende su metabolismo, el crecimiento y la reproducción. La producción de bioelectricidad en las CCM's tiene muchos beneficios, incluyendo limpieza, eficiencia, reciclado y no produce subproductos tóxicos. Por lo que se ha presentado como una excelente opción para la conversión completa de energía, presentado ventaja potencial sobre procesos convencionales de tratamiento de aguas (Mansoorian et al., 2013; He et al., 2015).

En México los programas para tratamiento de aguas municipales presentan una cobertura del 20 % y en Tabasco el 10 % (CONAGUA, 2014; PLED, 2013). Sin embargo, no existen programas destinados al tratamiento de aguas residuales industriales. Por tanto se sugiere que, para dar cumplimiento a ley de aguas nacionales es necesario desarrollar tecnologías para promover el aprovechamiento sustentable del recurso a través de su tratamiento y reutilización.

Con base en lo anterior el propósito de este trabajo es identificar los microorganismos potenciales que estén presentes en las aguas residuales de la industria azucarera para su aplicación en CCM's. Es decir, que generen electricidad y simultáneamente degraden la materia orgánica presente en las aguas residuales.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial de los microorganismos de las aguas residuales provenientes de la industria azucarera para aplicaciones en celda de combustible microbiana.

Objetivos específicos

1. Evaluar el desarrollo poblacional de microorganismos autóctonos con potencial para remover la demanda química de oxígeno (DQO), presente en agua residual sintética de la industria azucarera, variando pH y tiempo de retención hidráulica (trh).
2. Determinar y seleccionar los microorganismos potenciales inocuos para aplicaciones en CCM's con base en la generación de corriente, voltaje y porcentaje de remoción de materia orgánica.
3. Estudiar el mecanismo de transferencia de electrones del microorganismo electroquímicamente activo en la cámara anódica utilizando sacarosa como sustrato.
4. Comparar la eficiencia coulombica y el porcentaje de remoción de materia orgánica en una celda de combustible de doble cámara y de una sola cámara.

Hipótesis

Las aguas residuales provenientes de la industria azucarera contienen bacterias electrogénicas que son aptas para la producción de energía a través de las celdas de combustible microbianas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Efecto del uso de combustibles fósiles y la demanda de agua

En las últimas décadas el consumo de energía en el mundo ha aumentado como efecto del crecimiento en la población, esta energía es obtenida principalmente de las fuentes de energía convencionales (Rahimnejad et al., 2015). El 87 % de la demanda de energía a nivel global es obtenida de combustibles fósiles como el petróleo, carbón y gas natural (recursos no renovables) (Biresselioglu y Yelkenci, 2016). En México más del 95 % de la energía utilizada es obtenida de combustibles fósiles (Cancino et al., 2016). La contaminación ambiental y el calentamiento global están asociados a la explotación de tales combustibles fósiles, además el uso continuo de los mismos puede llevar a una crisis energética. Por tanto, existe una necesidad alarmante de utilizar fuentes de energía alternativas ambientalmente sostenibles. Tales como; la biomasa, eólica, solar e hidroeléctrica. Las energías renovables se encuentran aún poco implementadas debido, principalmente, a restricciones tecnológicas y políticas (Dumas et al., 2016). Sin embargo, las ventajas asociadas al uso de estos tipos de energía son principalmente porque ocasionan mínimo impacto al medio ambiente, los residuos que generan no son difíciles de tratar, además que no generan gases contaminantes como lo hacen los combustibles fósiles.

Por otro lado, debido a la urbanización e industrialización se están demandando grandes cantidades de agua y por ende la generación de aguas residuales con contaminantes orgánicos e inorgánicos va en aumento. Para tratar estas aguas residuales también se requiere del consumo de energía (Chouler y Di Lorenzo, 2015). Por lo tanto, es necesario hacer frente a dos principales problemas a escala global: I) la amenaza del cambio climático y sus efectos, que se han relacionado directamente con el uso indiscriminado de combustibles fósiles (Ryan et al., 2016), y (II) la disponibilidad de agua limpia de fácil acceso (Vörösmarty et al., 2010; Yang et al., 2016).

Gran parte de la energía contenida en los residuos podría ser recuperada, Meneses et al. (2016) mencionan que las aguas residuales contienen alta energía potencial que puede ser utilizada para el tratamiento de las mismas y Gude (2016) reporta

que las aguas residuales contienen de 3 a 10 veces más energía que la que se requiere para su tratamiento.

Actualmente se está utilizando la biomasa como fuente de energía, pero ésta es obtenida a través de la combustión y finalmente también se convierte en una fuente de contaminación del aire. Los contaminantes emitidos por la combustión de la biomasa son monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NOx) y óxidos de azufre (SOx). El CO, los compuestos orgánicos volátiles (COV) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) son productos de la combustión incompleta (Wielgosinski et al., 2017). No obstante, se puede capturar la energía de la biomasa sin combustión. Por ejemplo, los microorganismos pueden liberar electrones a partir de moléculas de la biomasa y generar energía en formas que pueden ser fácilmente utilizadas por la sociedad (Hamawand, 2015). Las diferentes formas para obtener energía de la materia orgánica a través de reacciones metabólicas son: Metanogénesis para producir CH₄, la fermentación para obtener etanol (biocombustible), hidrogenénesis para producir H₂, y la bioelectrogénesis que se fundamenta en la generación directa de energía eléctrica a través del uso de sistemas biológicos o partes de ellos (principalmente enzimas) en sistemas bioelectroquímicos. En estos últimos se convierten sustratos orgánicos hasta electrones exocelulares y protones, los cuales pueden ser recuperados de forma directa para producir energía eléctrica en dispositivos llamados celdas de combustibles microbianas (CCM's) (Logan et al., 2006; Zhang et al., 2015).

2.2 Sistemas bioelectroquímicos (SBE's)

Los SBE's son dispositivos capaces de utilizar el metabolismo biológico para facilitar la generación de energía eléctrica, combustibles o bioactivos (Elakkiya y Matheswaran, 2013; Han et al., 2014). Estos dispositivos son una prometedora alternativa para la producción de formas no convencionales de energía útil, a partir del tratamiento de aguas residuales o empleando una amplia gama de materiales orgánicos, así como para la producción de sustancias químicas. La clasificación de los SBE's se basa en el modo de operación y en el producto final obtenido en cada tipo de celda (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Tipos de sistemas bioelectroquímicos.

Tipos de SBE's	Descripción
Celda de electrosíntesis microbiana (CESM) o celda de remediación microbiana (CRM) (Mazurenko et al., 2016)	Su enfoque es la producción de metabolitos secundarios o remediar suelos contaminados y producir electricidad.
Celda de electrólisis microbiana (CEM) (Rago et al., 2016)	Estos sistemas requieren suministro de electricidad para llevar a cabo reacciones electroquímicas, en las que el principal producto es el H ₂ .
Celda de desalinación microbiana (CDM) (Liu et al., 2015)	Es una CCM modificada con la finalidad de reducir el contenido de sales, principalmente del agua de mar.
Celda de combustible foto-microbiana (CCFM) (Wu et al., 2014)	Son sistemas electroquímicos donde la energía solar es transformada en electricidad a través de las reacciones metabólicas de microorganismos fotosintéticos. Estos microorganismos proporcionan oxígeno al cátodo.
Celda de combustible microbiana (CCM) (Pandey et al., 2016)	Se basa en el uso de la actividad de microorganismos electroquímicamente activos para generar electricidad a partir de diferentes sustratos orgánicos.

Las celdas de combustible microbianas (CCM's), son dispositivos electroquímicos que convierten energía química en energía eléctrica, empleando microorganismos como biocatalizadores, y ofrecen la posibilidad de generar bioelectricidad a partir de residuos orgánicos y biomasa renovable (Logan y Rabaey, 2012; He et al., 2015). Estos sistemas presentan ventajas con respecto a las celdas de combustible convencionales, porque estas últimas requieren catalizadores costosos para promover la oxidación de los donadores de electrones, mientras que, en una celda de combustible microbiana, los microorganismos catalizan de manera natural la oxidación de los combustibles. Las celdas de combustible abióticas a menudo operan en altas temperaturas, pero las CCM's pueden operar a temperatura

ambiente y pudieran potencialmente ser diseñadas para funcionar en cualquier temperatura, dependiendo del grado de tolerancia bacteriana; desde intervalos moderados, es decir, temperaturas entre 15-35°C, temperaturas de entre 50 y 60°C que pueden ser toleradas por microorganismos termofílicos y bajas temperaturas (<15°C) donde los psicrófilos pueden crecer (Logan, 2008). Además, los combustibles para las celdas de combustible abióticas son altamente explosivos o tóxicos y tienen que ser altamente purificados para evitar envenenamiento de los catalizadores. Por el contrario, los microorganismos en CCM's pueden oxidar una gran diversidad de combustibles que son a menudo percibidos de bajo valor, tales como aguas residuales (Martinucci et al., 2015). Así, las CCM's son recursos atractivos que brindan una doble ventaja; la producción de bioelectricidad, mientras se reciclan residuos para proteger el ambiente.

2.3 Principios básicos de las CCM's

Una CCM convencional, consiste de dos compartimientos separados por una membrana permeable a los protones (Figura 2.1). El ánodo comúnmente se mantiene bajo condiciones anaerobias, mientras que el cátodo puede estar suspendido en soluciones aeróbicas o expuesto al aire (Rabaey y Verstraete, 2005; Logan et al., 2006).

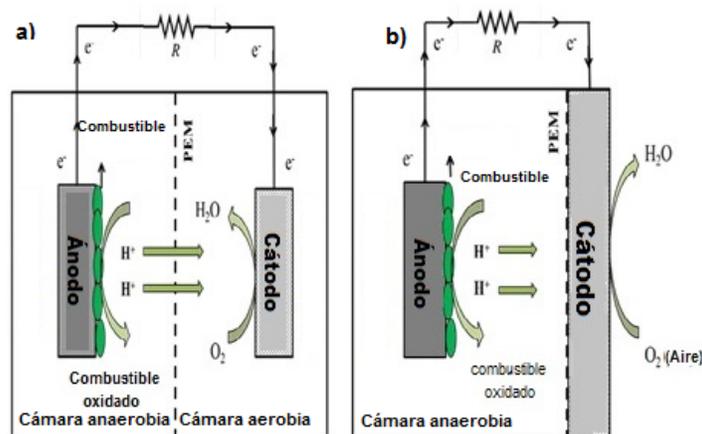


Figura 2.1. Esquema de CCM con membrana permeable a protones de a) doble cámara y b) una sola cámara con cátodo expuesto al aire.

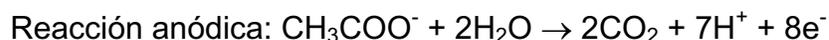
En el compartimiento anódico, los microorganismos degradan materia orgánica, generando electrones y protones durante su metabolismo, convirtiéndose el ánodo en el receptor de electrones. Los electrones fluyen del ánodo al cátodo a través de un circuito eléctrico externo que comúnmente incluye una resistencia, mientras que los protones, migran al cátodo a través de la membrana que separa ambos compartimientos. Por último, en el cátodo, un receptor final de electrones es reducido (comúnmente oxígeno). Debido a la diferencia de potencial entre los compartimientos catódico y anódico, el flujo de electrones genera potencia eléctrica (Pandey et al., 2016).

Dentro de la cámara anódica en condiciones anaerobias, el sustrato orgánico es oxidado por bacterias electrógenas que producen protones y electrones, éstos se transmiten al receptor terminal de electrones a través de una cadena transportadora de electrones. Los electrones pueden ser transportados desde la célula bacteriana a la superficie del ánodo sólido a través de algún mediador de electrones, por transferencia directa de electrones o por adherencia física de la célula bacteriana al ánodo mediante una matriz de exopolisacárido (Pirbadian et al., 2014; Baranitharan et al., 2015).

2.3.1 Reacciones químicas en los compartimientos de una CCM

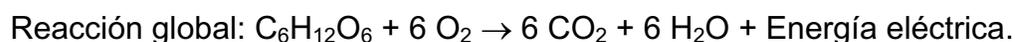
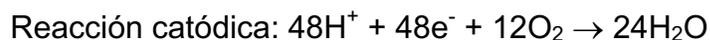
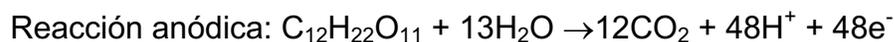
Las reacciones típicas que se llevan a cabo en una celda de combustible microbiana son las siguientes:

Si se utiliza Acetato como sustrato Orgánico modelo:



Termodinámicamente es capaz de generar un $\Delta G = - 583 \text{ kJ/mol}$

Si se utiliza sacarosa como sustrato orgánico modelo:



Termodinámicamente es capaz de generar un $\Delta G = - 2840 \text{ kJ/mol}$

La reacción global indica la descomposición del sustrato en dióxido de carbono y

agua más la generación de electricidad como subproducto.

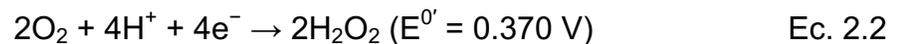
La comprensión del metabolismo bacteriano es una parte importante para entender los mecanismos de funcionamiento de la tecnología CCM. La producción de electricidad en una CCM depende fuertemente de la actividad bacteriana y la reacción de oxidación en la cámara anódica.

Dentro de las BEA's los electrones se eliminan del donante primario y se transfieren al aceptor terminal de electrones a través de una serie de proteínas y cofactores portadores de electrones, tales como NADH deshidrogenasa, ubiquinona o citocromos. La energía liberada durante el transporte de electrones permite a las bacterias enviar los protones al periplasma con el fin de regular la osmolaridad celular (Olyveira et al., 2013).

En la cámara catódica el oxígeno es preferido como aceptor final de electrones. Dos procesos pueden ocurrir durante la reducción catódica de oxígeno. La reacción deseada es la producción de agua a través de la reducción del oxígeno con 4 electrones.



El otro camino consiste de una reacción con dos electrones, con la producción de peróxido de hidrógeno:



Los potenciales estándar para las reacciones a pH 7 son 1.23 y 0.695 V, para la producción de agua y peróxido de hidrógeno, respectivamente. Pero en una CCM la producción de H_2O_2 no es favorable debido a que es un fuerte oxidante y puede dar como resultado una degradación del electrodo o de la membrana (Logan, 2008; Zhang et al., 2015). Por lo tanto, se deben utilizar materiales para electrodo que favorezcan la reducción de oxígeno en agua y no a peróxido de hidrógeno.

2.4 Bacterias electroquímicamente activas

Las bacterias son un grupo importante de organismos unicelulares que pertenecen a los procariotas miden entre 0.5 y 5 μm de longitud, son ubicuas en suelo y agua, y también habitan en simbiosis con otros organismos. En general, existen 40 millones de células bacterianas en un gramo de suelo y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo. Existen en varias formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las células bacterianas son básicamente simples ya que presentan pared celular, pero sin núcleo. Están compuestas de tres componentes; las estructuras externas (flagelo, pili y glicocalix), la envoltura celular (membrana plásmido y la pared celular de peptidoglicano), y las estructuras internas (citoplasma, cromosomas, nucleótido, plásmidos, ribosomas y gránulos de almacenamiento). La capacidad de una bacteria para crecer, sobrevivir y reproducirse depende de la funcionalidad de estos componentes bacterianos (Madigan et al., 2012; Wong, 2015).

En las CCM's las BEA's son capaces de utilizar al electrodo (ánodo) como aceptor final de electrones. Se han utilizado diversos tipos de especies (Tabla 2.2), la gran mayoría son bacterias Gram negativas y solo se encuentran reportadas cinco especies de bacterias Gram positivas.

Tabla 2.2. Especies de BEA en CCM's.

Especie	Gram	Referencia
<i>Shewanella</i>	-	Carmona et al., 2013, Kouzuma et al., 2014
<i>Geobacter</i>	-	Bond y Lovley, 2003
<i>Pseudomonas</i>	-	Jayapriya y Ramamurthy, 2012
<i>Acidiphilum</i>	-	Borole et al., 2008
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Fedorovich et al., 2009
<i>Aeromonas</i>	-	Pham et al., 2003; Chung y Okabe, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	+	Nimje et al., 2009
<i>Clostridium butyricum</i>	+	Park et al., 2001
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	-	Bond et al., 2002
<i>Desulfubulbus propionicus</i>	-	Holmes et al., 2004a

<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	-	Zhao et al., 2008
<i>Escherichia coli</i>	-	Zhang et al., 2006
<i>Enterobacter cloacace</i>	-	Nimje et al., 2011
<i>Geothrix fermentans</i>	-	Bond y Lovley, 2005
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i>	-	Holmes et al., 2004b
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	Zhan et al., 2008
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	Zuo et al., 2008
<i>Pichia anomala</i>	-	Prasad et el., 2007
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	-	Chaudhuri y Lovley, 2003
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	-	Xing et al., 2008
<i>Thermincola sp.</i>	-	Wrighton et al., 2008,
<i>Tolomonas osonensis</i>	-	Luo et al., 2013
<i>Corynebacterium sp.</i>	+	Liu et al., 2010
<i>Kocuria rhizophila</i>	+	Luo et al., 2015
<i>Lysinibacillus esphaericus</i>	+	He et al., 2014
<i>Citrobacter</i>	-	Xu y Liu, 2011
<i>Raoultella eléctrica</i>	-	Kimura et al., 2014
<i>Fontibacter ferrireducens sp.</i>	-	Zhang et al., 2013
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Bhuvaneswari et al., 2013

La mayoría de las BEA's anteriormente fueron estudiadas en un rango limitado de sustratos orgánicos y presentan variados mecanismos de transferencia de electrones. *Geobacter spp.* y *Shewanella spp.* han sido ampliamente estudiadas, ambas son capaces de transferir directamente los electrones al ánodo y también producen mediadores como flavinas o rivo flavinas que ayudan a transportar los electrones a la superficie del ánodo (Kumar et al., 2015).

2.4.1 Mecanismos de transferencia de electrones

Los electrodos son materiales sólidos que no pueden ser penetrados por las células bacterianas, por lo tanto los electrones generados por las BEA's se transfieren desde el interior de la célula hasta el exterior de la membrana. Esto es posible por la transferencia física de compuestos reducidos o por enzimas redox que están unidas a la membrana. Con el fin de permitir la transferencia de electrones al electrodo sólido (ánodo) las BEA's deben estar conectadas electrónicamente al

ánodo y lo hacen a través de diferentes mecanismos que a continuación se describen.

2.4.1.1 Transferencia directa de electrones (TDE)

La transferencia directa de electrones se produce cuando existe contacto físico entre una membrana bacteriana o apéndices bacterianos con el ánodo, sin que estén involucradas especies redox difusionales. Puesto que las células vivas generalmente se supone que son electrónicamente no conductoras. La transferencia directa de electrones requiere que los microorganismos posean unidades de proteínas que transfieran los electrones desde el interior de la célula hasta su exterior. La proteína redox como los Citocromos tipo C, que está en el exterior de la célula permiten la transferencia de electrones a un aceptor de electrones sólido (Yuan et al., 2011). Se ha demostrado que, especies de *Geobacter* y de *Shewanella* transfieren los electrones al ánodo mediante apéndices extracelulares (pili molecular), también denominados nanocables (Figura 2.2) (Reguera et al., 2005; Carmona et al., 2013; Kouzuma et al., 2014).

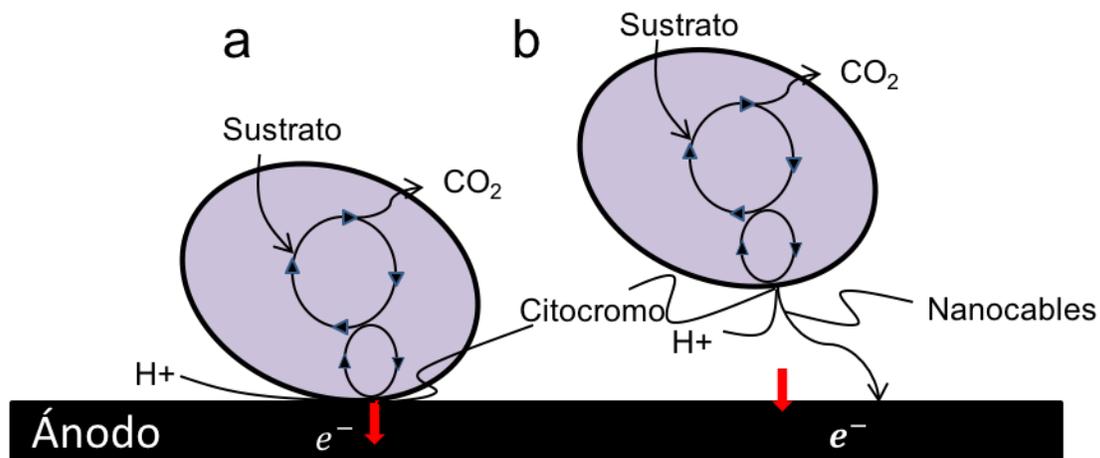


Figura 2.2. TDE vía: a) Citocromos unidos a la membrana y b) nanocables conductivos.

2.4.1.2 Transferencia de electrones por un mediador (TME)

Aunque se cree que la TDE es la única opción para una generación de energía eficiente, actualmente se están considerando los mecanismos de TME. En función de la naturaleza de la mediación de las especies redox, los mecanismos de TME se pueden dividir en tres grupos:

2.4.1.3 TME vía exógenos (Mediador redox artificial)

Estos mediadores parecen tener la capacidad de mejorar la generación de corriente eléctrica. Pero una gran desventaja de su uso, es la baja densidad de corriente y la necesidad de la adición del mediador repetida veces, lo cual es costoso y además suelen ser inestables. Por otra parte estos mediadores artificiales pueden generar problemas medioambientales debido a su toxicidad. Sin embargo en estudios reportados se han utilizado algunos compuestos, tales como fenazinas, fenotiazinas, índoles, ácidos húmicos y quinonas (Jayapriya et al., 2012; Han et al., 2014).

2.4.1.4 TME a través de metabolitos secundarios

Comúnmente los microorganismos crecen en condiciones en las que los aceptores de electrones solubles no están disponibles y donde los aceptores sólidos no se encuentran en alcance directo. Entonces, el microorganismo puede (I) utilizar compuestos mediadores de electrones disponibles en el ambiente (exógeno) como los ácidos húmicos o quelatos de metal, o (II) puede incluso él mismo, producir compuestos mediadores de electrones de bajo peso molecular, a través de vías metabólicas secundarias (Yong et al., 2014) (Figura 2.3),

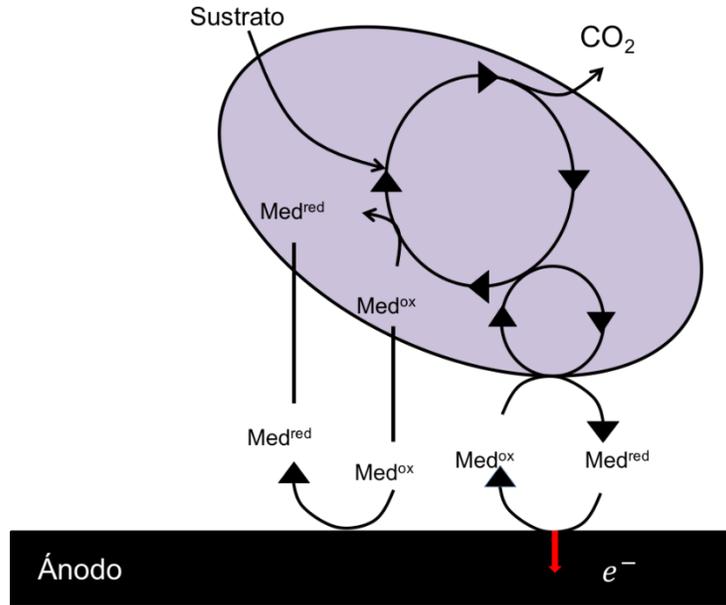


Figura 2.3. Transferencia de electrones por un mediador vía metabolitos secundarios microbianos.

Para aplicaciones en CCMs, los metabolitos secundarios (mediadores redox endógenos) son especialmente de gran interés, ya que su síntesis hace que la transferencia de electrones sea independiente de la presencia de mediadores redox exógenos. El mediador actúa como un aceptor terminal de electrones reversible, que transfiere los electrones de la célula bacteriana ya sea a un oxidante sólido (ánodo MFC) o dentro de una biopelícula, donde es re-oxidado y está de nuevo disponible para los siguientes procesos redox.

2.4.1.5 TME a través de metabolitos primarios

En contraste con la producción de los metabolitos secundarios, la reducción de metabolitos primarios está estrechamente asociada con la degradación oxidativa del sustrato. Para ser utilizado como un reductor, el metabolito tiene que cumplir ciertos requisitos. Su potencial redox debe ser tan negativo como sea posible y estar disponible para la oxidación electroquímica en el sistema de CCM. Dos importantes vías metabólicas anaerobias pueden conducir a la formación de metabolitos reducidos y que son adecuados para el funcionamiento de la CCM: la respiración anaerobia y la fermentación (Guo et al., 2015; Qin et al., 2016) (Figura 2.4).

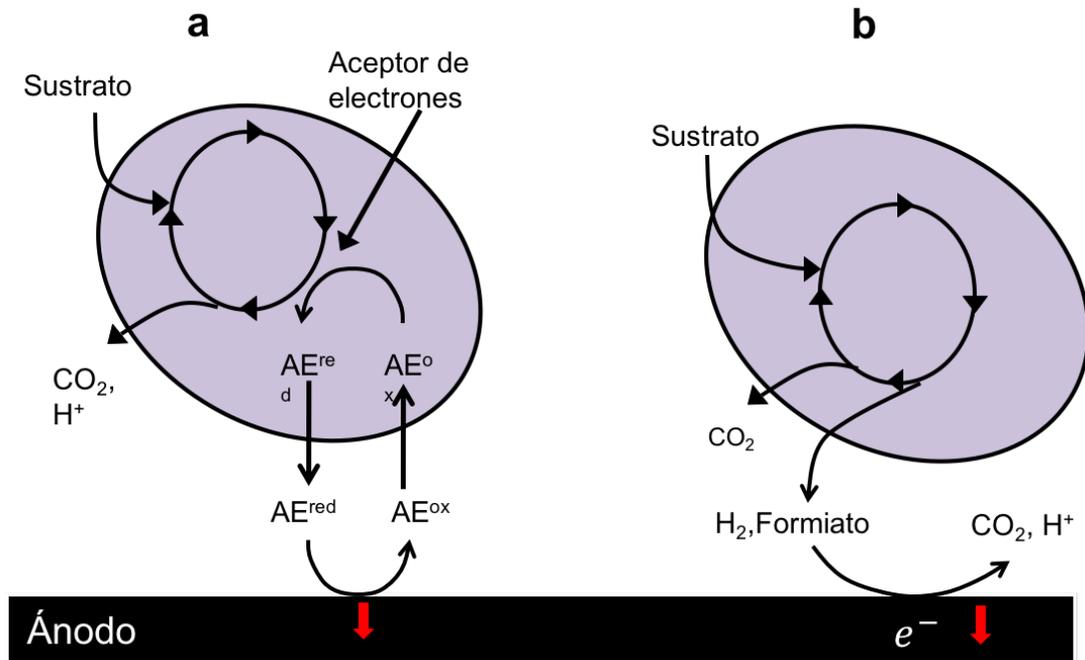


Figura 2.4. Transferencia de electrones por un mediador vía metabolitos primarios microbianos. a) a través de la reducción de los aceptores terminales de electrones (uso de respiración anaerobia) b) a través de la oxidación de los productos reducidos de la fermentación.

2.5 Impacto de las condiciones de operación y componentes sobre el rendimiento de la CCM

El rendimiento de las CCM's está regulado por los parámetros físicos, químicos, biológicos y electroquímicos. Sin embargo, tres parámetros en particular contribuyen directamente a la eficiencia de las CCM: (1) los parámetros de operación, (2) los parámetros de diseño del sistema, y (3) los parámetros biológicos. Por lo tanto, el logro de buenas condiciones en estas tres categorías, se traduciría en un terreno fértil para lograr el rendimiento ideal del sistema (Borole et al., 2011).

2.5.1 Parámetros de diseño del sistema

La formación de una biopelícula electroactiva es esencial para el funcionamiento de una CCM. El tipo de material del electrodo puede afectar la formación de biopelículas en condiciones de circuito abierto (ausencia de un receptor de electrones) sin embargo, en circuito cerrado la actividad electroactiva de la

biopelícula se favorece (Sevda et al., 2014). Existe una variedad de materiales para electrodos, por ejemplo, papel, esponja, tela, fieltro, fibra y espuma hecha de grafito o de carbono. Estos materiales pueden producir salidas de tensión similares, pero el rendimiento electroquímico puede variar, así como la formación de la biopelícula sobre los electrodos. Pero, los materiales para electrodos con mayor área de superficie accesible para los microorganismos pueden resultar en una mayor densidad de corriente (Schiliro et al., 2016).

2.5.2 Parámetros de operación

En los sistemas por lotes, se ha demostrado que la resistencia externa, el potencial redox, el pH, la concentración de sustrato, la temperatura, la presencia de oxígeno, y la fuerza iónica afectan la producción de corriente. No obstante en un sistema continuo la operación en el ánodo presenta una mayor complejidad, ya que se consideran parámetros adicionales como la velocidad de flujo, la carga del sustrato, velocidad espacial, la tasa de corte y los cambios hidrodinámicos relacionados. Cada uno de estos parámetros influyen en el rendimiento electroquímico de la biopelícula sobre el electrodo en la cámara anódica (Walter et al., 2016).

2.5.3 Resistencia externa y potencial redox

Las biopelículas electroactivas pueden responder a estímulos electroquímicos externos, como la resistencia al flujo de electrones. Pero el proceso puede ser controlado mediante la optimización del crecimiento de la estructura de la biopelícula y manteniendo un equilibrio en la utilización de la fuente de carbono.

2.5.4 pH

En el microambiente anódico el pH es un factor importante en el funcionamiento eficiente de la CCM. Éste no solo asegura el crecimiento y la reproducción de los microorganismos para la generación de electrones, sino que influye en el movimiento eficiente de protones a través de la MIP. Recientes investigaciones han demostrado que la máxima corriente en una CCM fue obtenida a pH anódico en un

rango de 7-8. Pero la corriente disminuye cuando el pH sobre pasa valores por encima de 9 o valores por debajo de 6 (Jia et al., 2014).

2.5.5 Carga y concentración del sustrato

Puesto que la transferencia de electrones hacia el ánodo por BEA es el resultado de metabolismo primario, la relación entre la concentración de sustrato y la generación de corriente sigue la ecuación de Monod. Los aumentos en la carga o concentración del sustrato pueden conducir a un aumento de la corriente. Sin embargo la presencia de un exceso de sustrato y la ausencia de una baja resistencia podría provocar el desvío de los electrones para la formación de productos del metabolismo y no para producción de corriente.

2.5.6 Parámetros biológicos

El parámetro biológico más importante que afecta la actividad de la biopelícula electroactiva es la fuente del inóculo y el tipo de catalizador microbiano (consorcio o cultivo puro. Varias fuentes de carbono pueden ser utilizadas en una CCM, los principales combustibles metabólicos son los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos simples o de alto peso molecular que están presentes en la aguas residuales. Diversos estudios reportan el efecto de las fuentes de carbono en el rendimiento de CCM. Por ejemplo Kim et al. (2000) estudiaron el efecto del uso de glucosa como combustible usando *Proteus vulgaris* como biocatalizador. En promedio una carga de 1000 mg/l d de glucosa en una CCM de doble cámara generó 4310 mW/m² de potencia máxima con un 81% de eficiencia coulombica (Pandey et al., 2016). Es importante mencionar que el crecimiento del microorganismo puede variar dependiendo de sus requerimientos nutricionales o del sustrato.

La generación de electrones en las bacterias parte del hecho de la existencia de cadenas transportadoras, es decir, ciclos de oxidación-reducción alternante en los acarreadores de electrones, que para este caso son NADH y FADH₂ (Madigan et al., 2012). También se ha encontrado que este flujo está asociado a sustancias solubles. La bacteria *E. Coli* al ser sometida a un proceso de activación

electroquímico fue inducida a la producción de tres compuestos claves transportadores de electrones, estos son: etil 2-aminoacetimidato, metil 4-etoxybutanoato, 3-isobutilhexahidropirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona, rivo flavinas y flavonoides (Deng et al., 2010). Este hallazgo permite especular acerca de la posibilidad de que cualquier microorganismo pueda ser empleado en las celdas de combustible microbianas. Aunque, en un principio presenten una actividad baja o nula, todo depende del estímulo inicial apropiado. Este argumento ya había sido expuesto por Potter en 1911, quien mencionara por primera vez la posibilidad de generar electricidad mediante celdas de combustible empleando *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, cepas conocidas como no electroactivas (Nandy et al., 2016).

Cabe aclarar que dicha modificación electroquímica consiste en aplicar una diferencia de potencial a la celda de unos cuantos milivoltios. Esto causa en las bacterias Gram positivas un fenómeno electrostático ocasionado por la carga negativa debida a la presencia de ácidos teicoicos en la pared celular (Figura 2.5 a). La función de tal ácido es enlazar las moléculas de peptidoglicano a la membrana plasmática, mediante los enlaces fosfodiéster en las unidades monoméricas del ácido.

En el caso de las células Gram negativas, la carga se debe a la naturaleza de los lipopolisacáridos de la membrana externa (Figura 2.5 b) (Madigan et al., 2012). Pero sea Gram positivo o Gram negativo, el crecimiento del microorganismo no es indefinido, ya que consumen el sustrato o la fuente de carbono. Por lo tanto es importante conocer el ciclo de crecimiento del microorganismo en la cámara anódica para saber la relación existente entre la fase del crecimiento del microorganismo y la generación de voltaje.

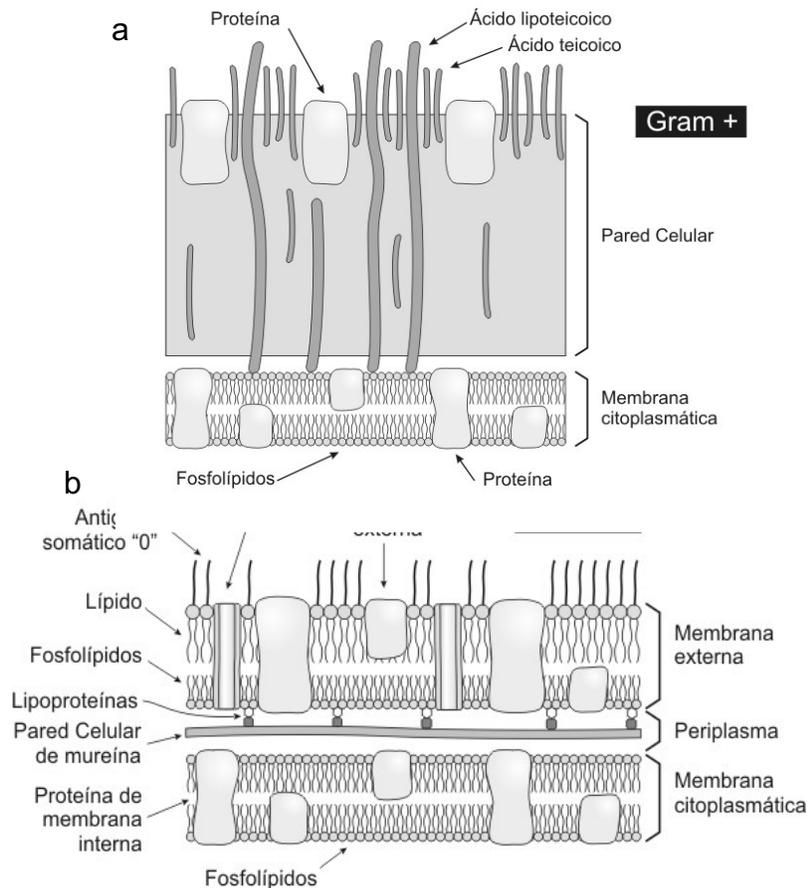


Figura 2.5. Estructura de la pared celular de una célula procariota. a) Estructura del ácido teicoico de las Gram (+). b) representación de los lipopolisacáridos en las Gram(-).

2.5.7 Ciclo del crecimiento microbiano

La parte fundamental del funcionamiento de las CCM's son los microorganismos, por lo tanto, conocer el ciclo de crecimiento de los mismos es importante para establecer los parámetros de operación.

La velocidad de crecimiento de un microorganismo es el cambio de número de células o masa celular por unidad de tiempo. Durante este ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina tiempo de generación. Por tanto, el tiempo de generación es el requerido para duplicarse una población de células. La curva de crecimiento puede dividirse en varias fases: fase

de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Estas se muestran en la Figura 2.6 (Madigan et al., 2012).

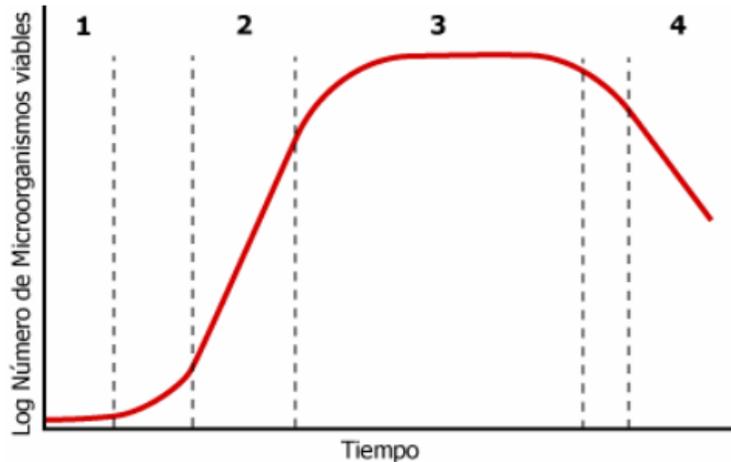


Figura 2.6. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana. 1: fase latente, 2: fase exponencial, 3: fase estacionaria y 4: fase de muerte.

Fase lag o de latencia

Es un periodo de ajuste fisiológico y cuando la célula sintetiza enzimas nuevas, cofactores e intermediarios metabólicos esenciales, los depósitos intracelulares de nutrientes están estabilizados.

Fase exponencial

La fase exponencial de crecimiento es consecuencia de que cada célula se divide para formar dos y así sucesivamente. El periodo de tiempo de esta fase puede ser breve o prolongado en función de los recursos disponibles y de otros factores externos (temperatura, composición del medio de cultivo) así como por las características genéticas del organismo.

Fase estacionaria

En la fase estacionaria no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria, muchas funciones celulares continúan, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos.

Fase de muerte

Si continúa la incubación después de que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero finalmente mueren.

2.6 Rendimiento en la producción de electricidad

En el campo de las CCM's, es adecuado evaluar en términos de reacción la fuerza electromotriz total (FEM), definida como la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo.

La FEM de una celda se calcula como:

$$FEM = E_c - E_a \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde E_c es el potencial (V) de cátodo y E_a (V) es el potencial del ánodo.

La FEM de la celda es un valor termodinámico que no toma en cuenta las pérdidas internas. El voltaje a circuito abierto (VCA) es el voltaje de la celda en ausencia de corriente. En teoría el VCA debe acercarse a la FEM de la celda. Sin embargo, en la práctica el VCA es sustancialmente menor que la FEM de la celda debido a diversas pérdidas potenciales. Esta pérdida de energía es conocida como sobrepotencial o la diferencia entre el potencial en condiciones de equilibrio y el potencial real (Srikanth y Venkata, 2012). Esto indica que la principal aplicación de los cálculos termodinámicos es identificar el tamaño y la naturaleza de las pérdidas de energía, que se mencionan en la siguiente sección.

2.6.1 Pérdidas de voltaje en la CCM

La generación de electricidad es el resultado de cuatro pasos los cuales deben ocurrir en serie. El primer paso es la transferencia de los reactantes y productos de la parte líquida hacia el electrodo que contiene una biopelícula y viceversa. En el segundo paso se lleva a cabo la liberación de electrones debido al metabolismo

microbiano (cinéticas). Los microorganismos requieren energía para su crecimiento y mantenimiento, por lo tanto, la biopelícula anódica deberá tomar parte de la energía disponible por el sustrato orgánico disminuyéndose el voltaje. El tercer paso, la transferencia de electrones de las células microbianas hacia el electrodo y viceversa y, el cuarto paso, la transferencia de cargas a través de los electrodos, el electrólito y la membrana de intercambio de protones. Algunos de estos pasos pueden limitar la transferencia de electrones causando pérdidas de voltajes en la CCM. Para maximizar el voltaje en la CCM el potencial del ánodo y cátodo deberá mantenerse como negativo y positivo, respectivamente. Esto también dependerá del sustrato utilizado.

Cuando el potencial del ánodo llega a ser muy bajo, los procesos competitivos tales como la fermentación y la metanogénesis acetoclástica se pueden favorecer (Jung y Regan, 2011). Cuando otros aceptores de electrones sobre el electrodo están presentes en la cámara anódica, el dador orgánico de electrones se puede oxidar usando diferentes vías metabólicas reduciéndose la transferencia de electrones. En particular, los nitratos y los sulfatos que se encuentran en las aguas residuales es probable que puedan desviar los electrones del ánodo, ya que sus potenciales redox de estos contaminantes los hace más favorecedores como aceptores de electrones en vez del ánodo. La presencia de oxígeno en el compartimiento anódico disminuye los electrones generados en la cámara debido a la oxidación aerobia, éste entra al compartimiento anódico por difusión a través del cátodo hacia la membrana (Rahimnejad et al., 2015).

El metano es el producto final de los procesos anaerobios, se le considera como uno de los principales compuestos que pueden interferir en rendimiento de la CCM. Los microorganismos metanogénicos y los microorganismos electroquímicamente activos compiten por la fuente de carbono presente en las aguas residuales. Recientemente se ha demostrado que en la producción de metano se consumen entre un 15% y 50% los productos fermentables que aportan electrones a las CCM's (Nikhil et al., 2015)

Para controlar los diferentes procesos biológicos competitivos dentro de las CCM's, se requieren de diversas estrategias de operación con el fin de evitar el crecimiento de otros microorganismos que son electroactivos.

2.6.2 Caracterización de las pérdidas de voltaje

La fuerza electromotriz define termodinámicamente la cantidad de electrones transferidos en una reacción bioelectroquímica, es decir, la diferencia de potencial generada por esta reacción. El VCA es el voltaje máximo que puede ser medido bajo una resistencia infinita, es decir, que el ánodo y cátodo no son conectados entre sí a través de una resistencia externa. Existe una serie de limitaciones por parte de las comunidades bacterianas que catalizan la reacción anódica, que reduce la diferencia de potencial total que se puede alcanzar en una CCM. A circuito abierto el voltaje de la celda sería igual al voltaje teórico, pero lo que en realidad se obtiene es un voltaje más pequeño que el voltaje termodinámico. Esto indica que existe ciertas pérdidas que afectan el funcionamiento de la CCM, incluso cuando no circula corriente a través de la carga. Este fenómeno recibe el nombre de “crossover” o “pérdidas por tensión”; en electroquímica se utiliza el término de “sobrepotencial” o “polarización” (He et al., 2015).

El voltaje máximo alcanzado en las CCM's se encuentra en un rango de 0.3 a 0.7 V. Aunque la FEM representa el límite superior para el voltaje total, el voltaje real siempre será menor en la práctica debido a una serie de pérdidas de voltaje ya sea de naturaleza electroquímica y/o biológica. Estas pérdidas de voltaje aumentan proporcionalmente con la corriente y pueden tener un efecto adverso en el rendimiento de la celda. Esta pérdida de voltaje resultaría en una menor potencia de salida de acuerdo a la ecuación 2.4.

$$P = VI \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde P es la densidad de potencia (W/m^2), V es el voltaje (V) e I es la densidad de corriente (mA/m^2). Para permitir la comparación entre los dos sistemas, la corriente y la potencia son usualmente normalizadas de acuerdo a las características de la CCM, tales como el área superficial proyectada del ánodo o

cátodo o en su defecto por el volumen neto de la cámara anódica y catódica. Manteniendo un voltaje alto con una corriente alta es esencial para una mejor operación de la CCM. Para determinar estas condiciones se traza una curva de polarización que representa el voltaje de la celda en función de la corriente (Figura 2.7).

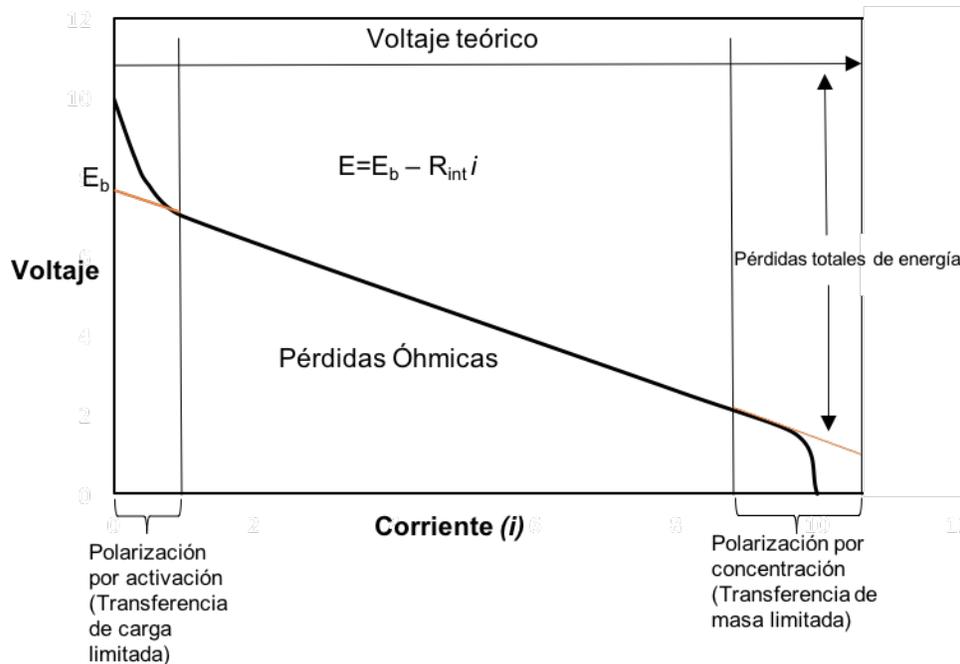


Figura 2.7. curva de polarización general para una célula de combustible microbiana que muestra las regiones dominadas por diferentes tipos de pérdidas de potencial (Dominguez et al., 2012).

El voltaje de las CCM's está determinado por el potencial termodinámico teórico (E_{term}) menos las pérdidas de voltajes o sobre-potenciales que ocurren en la celda cuando la corriente eléctrica es producida. Las sobretensiones de los electrodos son en general dependientes de la corriente y se pueden clasificar como sigue: (I) las pérdidas por activación; (II) pérdidas por metabolismo bacteriano; y (III) por transporte de masa o pérdidas por concentración. Estas pérdidas irreversibles en las CCM's son presentadas por la ecuación 2.4 (Gude, 2016):

$$E_{cel} = E_{term} - [(\eta_{act} + \eta_{ohm} + \eta_c)_{cátodo} + (\eta_{act} + \eta_{ohm} + \eta_c)_{ánodo}] \quad \text{Ec. 2.4.}$$

Donde η_{act} es la pérdida por activación debido a la lenta cinética de reacción, η_{ohm} es la pérdida óhmica de resistencias iónicas o electrónicas y η_c es la pérdida por concentración debido a las limitaciones del transporte masa. Las pérdidas por activación y concentración se producen en las cámaras anódica y catódica mientras que las pérdidas óhmicas se producen en toda la celda. Cada una de estas pérdidas tiene efectos diferentes, pero acumulativos sobre el voltaje de la CCM.

2.6.2.1 Pérdidas por activación

Las pérdidas por activación se producen debido a las pérdidas de energía al iniciar la óxido-reducción. Estas pérdidas por activación son dominantes en la menor densidad de corriente. En las CCM's las pérdidas por activación son básicamente representativas de una pérdida de tensión total debido al metabolismo bacteriano en el consumo de materia orgánica. Esta pérdida se puede reducir mediante el aumento de la zona de superficie del electrodo, con la adición de mediadores para facilitar la eficiencia de la transferencia de electrones y con el enriquecimiento de biopelículas electrógenas en el ánodo y con las condiciones operativas adecuadas (Gude, 2016; Logan, 2008).

2.6.2.2 Pérdidas óhmicas

Las pérdidas óhmicas (o polarización óhmica) son universales en cualquier tipo de celda electroquímica. En una CCM, las pérdidas óhmicas incluyen tanto la resistencia al flujo de electrones a través de los electrodos, las interconexiones, la resistencia al flujo de iones a través de la MIP, el anolito y el catolito (Larminie y Dicks, 2013). Para reducir las pérdidas óhmicas, es necesario el uso de electrodos de alta conductividad y reducir al mínimo la separación entre ellos. Al reducir la distancia, los protones podrían viajar antes de que se combinen con el oxígeno y los electrones. Se ha demostrado que el aumento de la zona de superficie de la membrana en relación con el volumen total de la CCM mejora el flujo de protones y se reducen las pérdidas óhmicas. También las pérdidas óhmicas se pueden reducir con el aumento de conductividad de la solución al máximo tolerado por la bacteria (Nimje et al., 2011).

2.6.2.3 Pérdidas por concentración

Las pérdidas por concentración (o polarización de la concentración) se producen cuando la tasa de transporte de masa de una especie hacia o desde el electrodo limitan la producción de corriente. Cuando existen altas densidades de corriente, hay limitación de la transferencia de masa de especies químicas por difusión a la superficie del electrodo. En el ánodo las pérdidas por concentración son causados por una descarga limitada de especies oxidadas a la superficie del electrodo o un suministro limitado de especies reducidas hacia el electrodo. Esto aumenta la relación entre la especie oxidada y reducida que puede producir un aumento en el potencial de electrodo. En el lado del cátodo se puede producir lo inverso, provocando una caída en el potencial de cátodo. Mediante el registro de curvas de polarización, la aparición de pérdidas por concentración puede ser determinadas (Nikhil et al., 2015).

En una CCM el voltaje de la celda es normalmente una función lineal de la corriente (región intermedia de la Figura 2.7) y se puede describir simplemente como:

$$E_{cel} = E_b - IR_{int} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde R_{int} es la resistencia interna total de una CCM, la cual puede ser fácilmente obtenida de la pendiente (Figura 2.7). La intersección de la sección lineal de la curva con el eje del voltaje E_b , es referido como la extrapolación lineal del VCA, esto es la extrapolación de la parte lineal de la curva de polarización. El valor de E_b debería ser cercano al valor del VCA, pero menor que éste. La resistencia calculada usando este método es referido como resistencia interna en lugar de resistencia óhmica, porque las pérdidas por activación y concentración afectan la pendiente de la curva de polarización y la influencia ha sido considerada en el cálculo de la resistencia interna usando este método (Lefebvre et al., 2013).

Los parámetros que contribuyen a la resistencia interna de una CCM, pueden describirse como sigue, reescribiendo la ecuación 2.5, se tiene:

$$E_{cel} = E_b - (R_a + R_c + R_m + R_e)I \quad \text{Ec. 2.6}$$

R_a y R_c son las resistencias causadas por reacciones bioelectroquímicas en el ánodo y la reducción de oxígeno en el cátodo, respectivamente. R_m y R_e son las resistencias de la membrana y electrólito (catolito y anolito), respectivamente.

2.7 Desempeño de una celda de combustible microbiológica.

A continuación, se presentan las principales variables para determinar el desempeño de la operación de una CCM y su expresión matemática, en un sistema batch o fed-batch (Logan et al., 2006).

En una CCM el voltaje (V_{CCM}) es medido a través de una resistencia externa (R_{ext}), mientras que la corriente I_{CCM} se calcula mediante la Ley de Ohm:

$$I_{CCM} = \frac{V_{CCM}}{R_{ext}} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde I_{CCM} es la corriente generada en Amperes y R_{ext} es la resistencia externa en ohm. Usualmente, el valor elegido de R_{ext} para la operación de la celda es la resistencia interna (R_i) de la CCM, puesto que con dicho valor la potencia generada en la CCM es máxima. Este resultado se conoce como Teorema de Jacobi para fuerzas electromotrices.

El desempeño de una CCM se puede medir en función de la densidad de potencia (DP), la potencia volumétrica (PV), eficiencia en la remoción de DQO (η_{DQO}) y la eficiencia coulombimétrica (η_{COUL}). La potencia es calculada (P_{CCM}) mediante el producto de la corriente y el voltaje, según la Ecuación 2.8.

$$P_{CCM} = I_{CCM}V_{CCM} \quad \text{o} \quad P_{CCM} = \frac{V_{CCM}^2}{R_{ext}} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Una forma de obtener un índice que permita comparar la corriente y la potencia generada por una CCM consiste en normalizar estas magnitudes respecto al área

efectiva del ánodo o al volumen de la celda, resultando en densidades de potencia (DP), densidad de corriente (DI) y potencia volumétrica (PV).

$$DP = \frac{V_{CCM}^2}{AR_{ext}} \quad \text{Ec. 2.9}$$

$$DI = \frac{I_{CCM}}{A} \quad \text{Ec. 2.10}$$

Siendo A, el área superficial del ánodo en m².

Con el fin de realizar los cálculos de ingeniería para el tamaño y costo de reactores la potencia puede ser normalizada respecto al volumen de la celda:

$$PV = \frac{V_{CCM}^2}{VR_{ext}} \quad \text{Ec. 2.11}$$

Así mismo, la corriente en función del volumen de la CCM:

$$I_v = \frac{V_{CCM}}{AR_{ext}} \quad \text{Ec. 2.12}$$

La η_{DQO} es una variable ampliamente utilizada para cuantificar la remoción de materia orgánica en un sistema (Zhang et al., 2015). Ésta es cuantificada mediante la Demanda Química de Oxígeno inicial y final de la fuente de combustible cuando el sistema se opera en lote. Y cuando se opera en modo continuo se utilizan las DQO del afluente y del efluente. Esta eficiencia a la remoción es calculada mediante la ecuación 2.13.

$$\eta_{DQO} = \frac{DQO_{inicial} - DQO_{final}}{DQO_{inicial}} \times 100 = \frac{DQO_{afuente} - DQO_{efluente}}{DQO_{afuente}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.13}$$

La Eficiencia Coulómbica, es un parámetro que permite obtener la fracción de energía eléctrica que se puede generar en la CCM a partir de un sustrato determinado. Su medición es importante porque posibilita comparar el desempeño de diferentes CCM's y puede ser calculada mediante la Ecuación 2.14.

$$\eta_{\text{Coul}} (\%) = \frac{CRS}{CTS} \times 100 \quad \text{Ec. 2.14}$$

Donde CRS es la carga eléctrica real debida al sustrato que se convierte en energía eléctrica:

$$CRS = \int_{t=0}^{t=t} I_{CCM} dt \quad \text{Ec. 2.15}$$

y CTS es la carga eléctrica teórica debida al sustrato:

$$CTS = \frac{F b_{DQO} (DQO_i - DQO_f) V}{M_{DQO}} \quad \text{Ec. 2.16}$$

Donde, F es la constante de Faraday 96 485.33 Coulombs / mol e⁻; b_{DQO} son los moles de e⁻ generados por la DQO (4 moles de e⁻ cuando la base de expresión de la DQO es oxígeno molecular O₂); DQO_i es la DQO inicial (g/L); DQO_f es la DQO final (g/L); V es el Volumen de la CCM (L); M_{DQO} es el peso molecular de la DQO (32 g O₂/mol DQO).

Estas variables de respuesta ayudan a determinar el desempeño real de una CCM y contribuyen a identificar cuáles pérdidas irreversibles son las importantes en la CCM y así implementar las modificaciones y mejoras requeridas.

2.8 Modelado en los sistemas de CCM's

La CCM es un sistema híbrido y complejo que involucra un numero de reacciones bioelectroquímicas acopladas, el rendimiento de las mismas es afectado por factores físico-químicos y biológicos (por ejemplo: la comunidad microbiana, la configuración de CCM, el material de los electrodos, área de superficie del electrodo, naturaleza del sustrato donante de electrones, el pH, la conductividad, etc.). Diversos estudios han sido conducidos para optimizar los factores antes mencionados. El modelado matemático puede ser una plataforma útil para investigar el efecto de los factores de operación en el desempeño de la CCM (Ortiz-

Martínez et al., 2015; Recio-Garrido et al., 2016; Martínez-Conesa et al., 2016). Xia et al (2018) Clasifica a los modelos de CCM's en dos grupos principales; modelos de predicción basado en el mecanismo y modelos basados en la aplicación (Figura 2.8). Los modelos basados en el mecanismo son enfocados a los procesos de reacción que incluyen la tasa de utilización de sustrato, la generación de voltaje y corriente, la formación y disminución de la biopelícula, entre otros. Los modelos basados en aplicaciones incluyen los modelos eléctricos y modelos de control y aprendizaje o modelos con enfoque estadístico. Los modelos eléctricos son aplicados para evaluar los parámetros eléctricos de salida en una CCM. Los modelos de control y aprendizaje se utilizan principalmente para optimizar la potencia de salida y la eficiencia coulombica sin tener en cuenta los procesos de reacción globales. Los parámetros del modelo se pueden obtener mediante el análisis de datos experimentales. En este trabajo se emplearon dos modelos basados en mecanismos de la cinética de crecimiento bacteriano y consumo de sustrato.

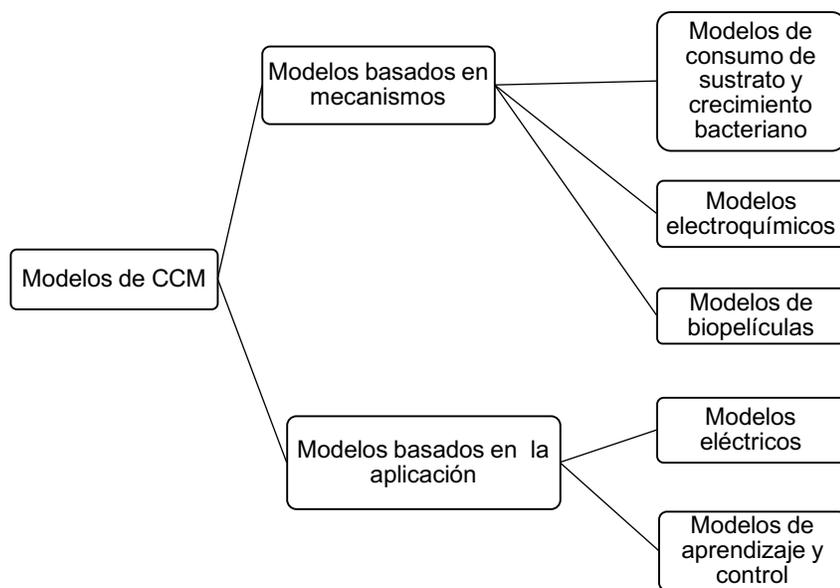


Figura 2.8. Clasificación de los modelos aplicados a las CCM's.

2.8.1 Modelos basados en mecanismos

Los modelos mecanísticos se clasifican principalmente por los dominios donde ocurren las reacciones bioelectroquímicas dentro de la CCM. Entre ellos se incluyen la tasa de utilización de sustrato y el crecimiento bacteriano, la expresión de voltaje y corriente, la formación y disminución de la biopelícula, entre otros.

2.8.1.1 Modelos de consumo de sustrato y crecimiento bacteriano

Para describir un proceso microbiano dos tipos de modelos pueden ser desarrollados, modelos estructurados y no estructurados. Los modelos estructurados toman en cuenta aspectos básicos de la estructura celular, su función y composición, estos pueden ser complejos y de poco uso industrial. En los modelos no estructurados la biomasa se considera como una entidad descrita sólo por su concentración (Solano-Cornejo & Vidaurre-Ruiz, 2017; Miroliaei et al., 2015).

Los modelos antes mencionados pueden ser modelos primarios o secundarios. Los modelos primarios describen matemáticamente la curva de crecimiento generada por los microorganismos bajo condiciones ambientales definidas. Mientras los modelos secundarios describen el efecto de las condiciones ambientales sobre los parámetros obtenidos de los modelos primarios.

En este trabajo se utilizaron dos modelos primarios para describir la cinética microbiana: el modelo maltusiano comúnmente conocido como ley exponencial (Ecuación 2.17) (Bouguettoucha et al., 2011) y el modelo de Gompertz (ecuación 2.20) que ha sido extensamente aplicado para describir la asimetría sigmoidea del crecimiento microbiano debido a su exactitud estadística comparada con otras funciones sigmoideas (Liu et al., 2017).

En sistema batch el modelo Maltusiano bajo condiciones ideales de crecimiento, la concentración de biomasa aumenta exponencialmente con el tiempo. Por lo tanto, la tasa global de formación de biomasa es proporcional a la biomasa misma. Esto lleva a una reacción autocatalítica, que se describe por una ecuación de primer orden.

$$rX = \mu X \quad \text{Ec. 2.17}$$

Donde rX es la tasa de crecimiento celular (kg células/m³ h), X es la concentración de células (Kg células/m³) y μ es una constante cinética del crecimiento (1/h), llamada tasa de crecimiento específico. La ecuación 2.17 es equivalente a la ecuación 2.18

$$\frac{dX}{dt} = \mu X(t) \quad \text{Ec. 2.18}$$

La solución a esta ecuación diferencial de primer orden es:

$$X(t) = X_0 \exp(\mu t) \quad \text{Ec. 2.19}$$

Donde X_0 es la concentración celular inicial al tiempo $t = 0$.

La ecuación de Gompertz es una función doble exponencial basada en 4 parámetros que describen una curva sigmoidea asimétrica.

$$\text{Log}N = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad \text{Ec. 2.20}$$

Donde:

Log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (log (UFC/mL) al tiempo t; A es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al logaritmo de los niveles iniciales de bacterias) (log (UFC/mL); C es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos log de crecimiento) (log (UFC/mL); M es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h); B es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo M (1/h). De estos parámetros se deriva la velocidad específica de crecimiento ($\mu = B(C/e)$, $e = 2.7182$) [Log(UFC/mL) /h].

2.8.1.2 Modelos electroquímicos

Los modelos electroquímicos evalúan y caracterizan los parámetros eléctricos y el rendimiento de las CCM's. Estos modelos se basan en la teoría básica de electroquímica y en fórmulas específicas para el voltaje de salida, la densidad de

corriente y el equilibrio de electrones. Los modelos que describen la densidad de corriente son: modelo de Bulter-Volmer, modelo de Bulter-Volmer-Monod, ley de Ohm y modelo de Tafel-Monod (Tabla 2.3). El modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales dependerá de las condiciones de operación y del mecanismo de transferencia de electrones.

Tabla 2.3. Modelos matemáticos que describen la densidad de corriente.

Nombre del modelo	Ecuación del mecanismo	Referencia
Butler-Volmer	$i = i_0 \left(\exp \left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta_a \right) - \exp \left(\frac{-1(1-\alpha)nF}{RT} \eta_a \right) \right)$	Ec. 2.21 Kazemi et al., 2016.
Butler-Volmer-Monod	$i = i_l \left(\frac{\exp \left(\frac{1-e^{-f.\eta}}{k_1.e^{-(1-\alpha)f.\eta}+k_2.e^{-f.\eta}+1} \right)}{\left(\frac{S_d}{\frac{KM}{K_1.e^{-(1-\alpha)f.\eta}+k_2.e^{-f.\eta}+S_d}} \right)} \right)$	Ec. 2.22 Hamelers et al., 2011.
Ley de Ohm	$i = -K_{bio} \frac{\partial U}{\partial z}$	Ec. 2.23 Xia et al., 2018
Tafel-Monod	$i = \frac{8F}{3600} \frac{S_d}{K_{S_d}+S_d} x q_{max} \exp \left(\frac{\alpha F}{RT} \eta_a \right)$	Ec. 2.24 Yao et al., 2016.

2.8.1.3 Modelos de biopelículas

La formación de una biopelícula sobre el ánodo es benéfica para la transferencia de electrones. Jayasinghe et al. (2014) mencionan que el grosor y la porosidad de la biopelícula tiene efecto sobre la generación de energía en las CCM. Los modelos matemáticos que consideran la formación de biopelículas permiten estimar el grosor de la misma considerando las condiciones de operación del sistema y el mecanismo de transferencia de electrones.

Cai et al. (2018) propusieron un modelo matemático suponiendo que el crecimiento de la biomasa está limitado por la concentración máxima de biomasa alcanzable. El crecimiento de la biopelícula se describe con un parámetro de retención de biomasa $\propto (h^{-1})$ como se muestra en la siguiente ecuación 2.25.

$$\alpha_i = \begin{cases} \frac{\mu_e c_{xe} - K_{de} c_{xe} + \mu_m c_{xm} - K_{dm} c_{xm}}{c_{xe} + c_{xm}}, & \text{si } (c_{xe} + c_{xm} > c_{x_{max,i}}) \\ 0, & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad \text{Ec. 2.25}$$

Donde, μ_e es la tasa de crecimiento específico de exoelectrógenos; c_{xe} es la concentración de biomasa exoelectrógenos; K_{de} tasa de caída de la biomasa exoelectrógena. μ_m , tasa de crecimiento específica de metanógenos; c_{xm} es la concentración de biomasa metanógena; K_{dm} tasa de caída de la biomasa metanógena.

2.8.2 Modelos basados en la aplicación

Como dispositivo que suministra energía, se espera que una CCM genere la potencia máxima para lograr la utilización efectiva de energía. Aunque los modelos basados en mecanismos optimicen las condiciones de operación para mejorar la potencia, la complejidad multidisciplinaria limita en muchas ocasiones la aplicación práctica de estos modelos.

Actualmente el diseño ingenieril propone modelos basados en la aplicación práctica y específica. Estos son de dos tipos: 1) modelos de CCM's que se describen mediante un modelo de circuito equivalente con componentes eléctricos y 2) modelos de control y aprendizaje, en éstos se establece una serie de experimentos de CCM's para optimizar los parámetros de operación y maximizar la potencia de salida a través de algoritmos de optimización.

2.8.2.1 Modelo eléctrico

En los modelos eléctricos de las CCM's, el modelo de circuito equivalente y la curva de potencia se describen mediante los parámetros eléctricos clásicos, como la corriente, el voltaje y la resistencia interna. Kashyap et al. (2014) menciona que el modelo de circuito equivalente con sus elementos electrónicos describe las características de la CCM de manera efectiva, es decir se pueden conocer las resistencias internas que afectan el rendimiento del dispositivo. Este circuito equivalente convencional consiste en elementos electrónicos en serie, que se

muestran en la figura 2.9. Una herramienta efectiva es la espectroscopía de impedancia electroquímica (IES), con ésta se pueden evaluar las resistencias internas de una CCM.

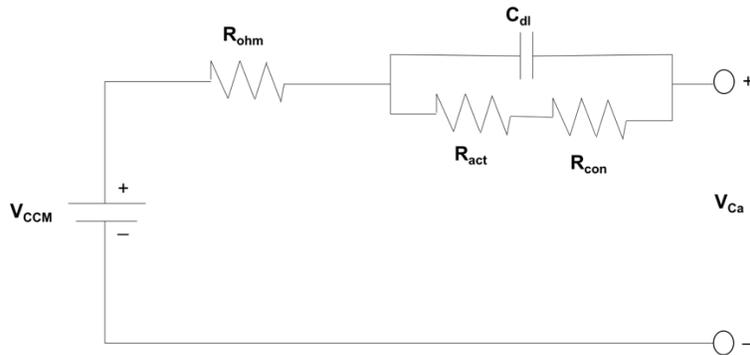


Figura 2.9. Modelo básico de circuito equivalente de una CCM. V_{CCM} , Voltaje de la CCM; V_{Ca} , voltaje a circuito abierto; C_{dl} , capacitor de doble capa; R_{ohm} , resistencia óhmica; R_{act} , resistencias por activación; R_{con} , resistencias por concentración.

2.8.2.2 Modelos de aprendizaje y control

Para la aplicación del modelado no paramétrico, se requiere del establecimiento de diseños experimentales. Dependiendo del tipo de diseño estadístico se obtiene el modelo y se necesita de gran cantidad de datos para el modelado ya que el propósito es predecir el rendimiento de la CCM. Xia et al. (2018) mencionan que los modelos utilizados para optimizar los parámetros de operación y predecir el rendimiento de una CCM han sido el diseño uniforme (DU), máquinas de vectores de relevancia (RVM), máquinas de vectores de soporte (RVM) y la metodología de superficie de respuesta (MSR). Esta última se basa en un conjunto secuencial de experimentos diseñados para lograr la respuesta óptima y es una herramienta de optimización que se ha aplicado a muchos procesos químicos ya que asegura el escalamiento del proceso. El efecto de las variables de operación sobre la variable de rendimiento de la CCM se analiza mediante regresión múltiple, usando un modelo polinómico de segundo grado (Myers et al., 2016) (Ecuación 2.26). Son pocos los modelos empíricos utilizados en el sistema de CCM's, al respecto, Martínez-Conesa et al. (2016) utilizaron la MSR en un diseño experimental 4 x 3 para predecir la generación de potencia en una CCM de doble cámara usando agua

residual real. Pero recomiendan desarrollar más modelos de CCM's para problemas específicos y aplicación práctica en la producción simultánea de energía y tratamiento de aguas residuales.

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i X_i + \sum_{i=1}^n A_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j, i,j=1}^n A_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Ec. 2.26}$$

Dónde Y, es la variable respuesta; A_0 , es el valor de la respuesta ajustada al punto central del diseño; A_i , A_{ii} y A_{ij} son los términos de la regresión (lineal, de interacción y cuadrático); n, es el número de variables independientes y ε , es el error aleatorio.

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Etapa I: Evaluación del desarrollo poblacional de microorganismos autóctonos con capacidad para remover la DQO

3.1.1 Sitio para el muestreo de agua residual industrial

Las muestras de aguas residuales fueron colectadas del Ingenio Santa Rosalía ubicado en la R/a Santa Rosalía de Cárdenas, Tabasco ($18^{\circ} 05'46.5''$ N y $93^{\circ}21'45.9''$ W) (Figura 3.1). Las muestras fueron tomadas de 10 puntos y de cada uno se colectó 1 L de agua residual, ésta fue colocada en frascos de vidrio estériles de 2 L previamente identificados con fecha de muestreo, número de muestra, y nombre del responsable, posteriormente se formó una muestra compuesta. El proceso fue realizado de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-AA-003 citada en la NOM-001 (SEMARNAT, 1996a) (Figura 3.2). Las muestras fueron transportadas en una hielera al laboratorio de Biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Después fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

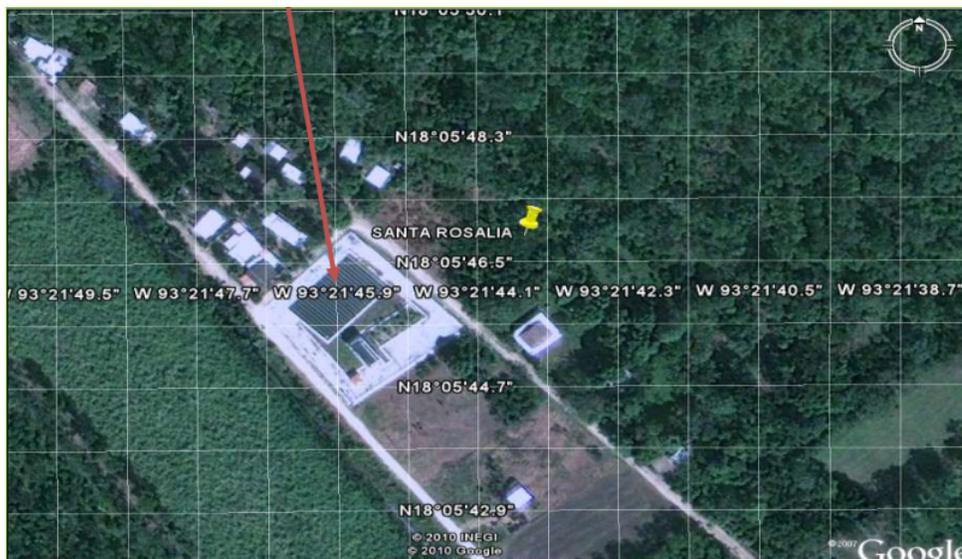


Figura 3.1. Localización de sitio de muestreo de aguas residuales del Ingenio Santa Rosalía.



Figura 3.2. a) Muestreo de aguas residuales en canal de desagüe del ingenio; b) preparación de la muestra para siembra de microorganismos.

3.1.2 Evaluación de bacterias totales en muestras

Las bacterias provenientes de las muestras se sembraron en medio Agar nutriente (AN) que contiene 8 g de extracto de carne por cada litro de agua destilada. Este fue esterilizado a calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 min a 1.3 Kg/cm² (Subba, 1999) y el material de vidrio utilizado se esterilizó durante 4 h a calor seco a 180 °C en Horno ECOSHEL 9023^a. El cultivo de microorganismos se realizó con el método de siembra por extensión en placa (Figura 3.3) (Madigan et al., 2012). Las placas fueron incubadas a 28 °C y durante 72 horas.

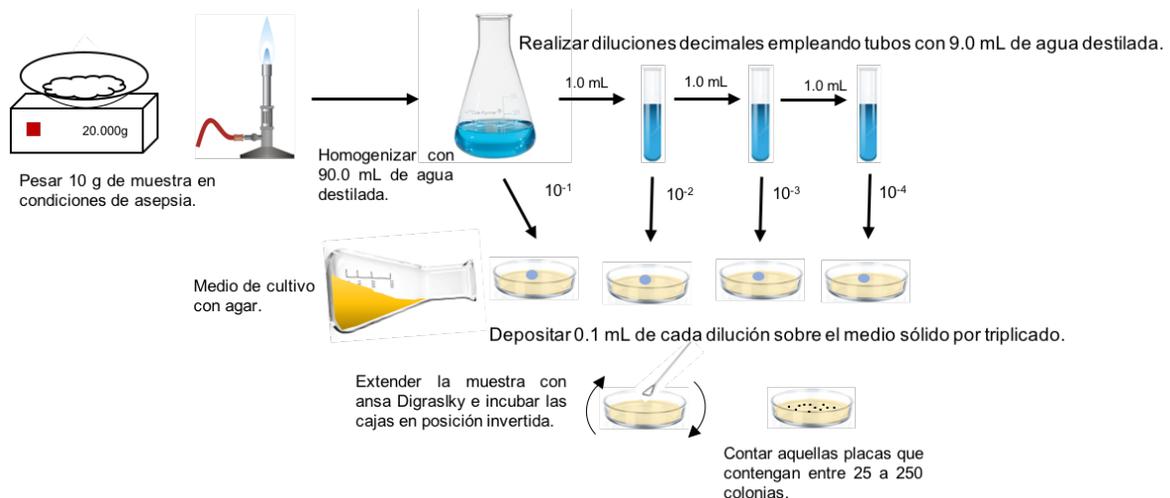


Figura 3.3. Siembra de microorganismos en placas Petri con agar nutriente.

3.1.3 Caracterización morfológica de bacterias

Caracterización a nivel colonia: Para diferenciar las cepas de bacterias se realizó la caracterización macroscópica teniendo en cuenta características como: color, tamaño y consistencia (Tabla 3.1) (Kumar, 2015). Posteriormente fueron aisladas para ser utilizadas en el diseño experimental (Figura 3.4 a, b y c).

Tabla 3.1. Morfología colonial según forma, elevación y borde.

Elevación	 Plano	 convexa	 elevada	 umbeliforme	 umbilicada
Borde	 Entero	 filamentosos	 ondulado	 aserrado	 Lobulado
Forma	 puntiforme	 circular	 filamentosas	 irregular	 rizoide



Figura 3.4. a) Bacterias expresadas después de las 72 horas de la siembra. b) Proceso de aislamiento y c) Cinco cepas aisladas de aguas residuales del ingenio azucarero.

Tinción de Gram: Las cepas aisladas se caracterizaron a través de la tinción de Gram, empleando el procedimiento propuesto por Madigan et al. (2012) en el que a través de la reacción a la tinción se puede diferenciar a las bacterias Gram positivas o Gram negativas.

De la cepa aislada se tomó un frotis y se colocó sobre un porta objeto, el frotis fue fijado a la llama, después se adicionó la solución de cristal violeta y se mantuvo

sobre el frotis durante 1 minuto (Resultado: todas las células se tiñen de color violeta). Posteriormente se adicionó la solución yodo-yodurada de lugol y se mantuvo sobre el frotis durante 1 minuto (Resultado: todas las células permanecen de color violeta). Después se realizó la decoloración con alcohol y se mantuvo sobre el frotis durante 20 segundos (Resultado: las células Gram positivas permanecen de color violeta y las Gram negativas se decoloran). Finalmente se agregó la solución de safranina y se mantuvo sobre el frotis durante 2 minutos (Resultado: las células Gram positivas se ven de color violeta y las Gram negativas de color rosa). La tinción de las células bacterianas se observó en microscopio óptico iniciando con objetivo de 10X. Finalmente sobre el porta objetos se colocó una gota de aceite de inmersión para examinar con objetivo de 100X (Figura 3.5).



Figura 3.5. Análisis de la tinción de bacterias en un microscopio binocular biológico con cámara digital.

Morfología celular: La morfología celular de las cepas aisladas se analizó por microscopía electrónica de barrido, la preparación de las muestras consistió en suspender cada cepa en agua destilada estéril y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, repitiendo este procedimiento cinco veces para lograr una limpieza adecuada de las bacterias, consecutivamente el contenido de cada tubo se filtró en papel filtro de 0.2 μm , el filtrado se fijó con $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ (glutaraldehído) y se deshidrató con diluciones progresivas de etanol al 30, 50, 70, 90 y 100%, se colocaron sobre cinta de carbono de doble cara en un portamuestra, se metalizaron con una capa ultradelgada de oro y se observaron en condiciones de alto vacío en un microscopio

electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LA (Holmes et al., 2004a). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el Software InTouchScope™.

3.1.4 Pruebas bioquímicas y fisiológicas de cepas bacteriana

La caracterización fenotípica de cada cepa bacteriana fue realizada mediante el sistema de galerías comerciales API 20E y 50 CH (Biomérieux-Francia, 2017) (Figura 3.6). estas galerías constan de microtubos que contienen sustratos deshidratados. Antes de iniciar las pruebas cada aislado fue precultivado en caldo nutritivo bajo condiciones aerobias a 30 °C (Subba, 2009) y las pruebas se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las pruebas fueron las siguientes: catalasa, oxidasa, reducción de nitratos, ureasa y ensayos de asimilación de Manosa, sorbitol, arabinosa, ramnosa, ribosa, glucosa y sacaraosa.



Figura 3.6. Galería del Sistema API 20-E para la identificación fenotípica.

3.1.5 Identificación por secuencia de ADN

El ADN genómico de cada cepa se aisló usando el kit de extracción ZR-Fungal/Bacterial DNA Miniprep (D605). Para la amplificación del fragmento correspondiente al gen 16s del RNA (V3-V5) se utilizaron los cebadores 16sV3-V5F-TACGGRAGGCAGCAG- y 16sV3-V5R-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT. Cada reacción de PCR contenía 200 μ M de Desoxiribonucleótido trifosfato, 0.2 μ M de cada cebador (Mytaq Pol-Bioline). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (BIORAD) usando las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 94 °C; 35 ciclos, cada uno de los cuales constaba de tres fases: un paso de desnaturalización de 30 segundos

a 94 °C, anillamiento de 30 segundos a 55 °C, elongación de 60 segundos a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 °C. Una vez terminado el proceso de amplificación se tomaron 2 µL de cada reacción y el producto resultante fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % (Sigma A9539) teñido con Midori Green Advanced (Nippon Europe Genetics) y se visualizó mediante luz UV. Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega). La secuenciación de los productos PCR fue desarrollada por Macrogen In. Corea en Seul, Corea del Sur usando un secuenciador capilar automatizado ABI3730 XL (Applied Biosystem).

Las secuencias se analizaron en el secuenciador del software GeneCodes Versión 5.4. Éstas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta de búsqueda local BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.1.6 Crecimiento de Cepa BSC-2 a diferentes pH's

La capacidad adaptativa de la cepa se evaluó por triplicado en placas que contenían agar nutriente con pH de 5, 6, 7 y 8. Antes de esterilizar el medio el pH fue ajustado con HCl (1M) o NaOH (1M). De una placa que contenía la cepa aislada se adiciono 1 mL de agua destilada estéril y con un asa de platino fue desprendida. Después ésta se adicionó a un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, la suspensión se diluyó en series y de la sexta dilución se tomó 0.1 mL que fue colocado en la placa Petri que contenía agar nutriente (Le et al., 2015).

3.2 Etapa II. Evaluación de la eficiencia de *B. subtilis* BSC-2 en la remoción de la DQO

3.2.1 Preparación de los microorganismos

El aumento de la biomasa bacteriana de cada cepa fue obtenida a través de la fermentación en medio líquido a condiciones aerobias, para esto en ambiente axénico se tomó una placa Petri que contenía a la cepa aislada y con el asa bacteriológica se extrajo la biomasa, después se colocó en el caldo nutritivo que contenía por cada litro de agua, 8 g de extracto de carne. La fermentación se

mantuvo por dos días a temperatura de 37 °C. Posteriormente la biomasa celular se separó del caldo por centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos. Después fueron lavadas con solución buffer de fosfato de 50 mM a pH de 7.0. La biomasa lavada se suspendió en 10 mL de solución buffer de 50 mM para después ser inoculada en los tratamientos.

3.2.2 Diseño experimental para evaluar la degradación de la materia orgánica en agua residual sintética

La optimización de los factores pH y TRH se realizó mediante el establecimiento de un diseño factorial completo de tres niveles (3x3). Las gráficas de superficie de respuesta y de contorno fueron usadas para estudiar la interacción entre los factores y su efecto sobre la variable respuesta. Las variables independientes fueron el pH (X_1) y el TRH (X_2). Los niveles de los factores fueron codificados como bajo, medio y alto (-1, 0 y +1, respectivamente). Un total de 9 tratamientos fueron requeridos para analizar la interacción de cada nivel sobre la variable respuesta (Tabla 3.2). La variable respuesta o dependiente fue el % de remoción de DQO (Y) y el promedio de tres replicas fue analizado mediante el análisis de regresión múltiple usando el siguiente modelo polinomial de segundo grado (Ec. 3.1) (Myers et al., 2016).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j}^k \beta_{ij} X_i X_j + e_i \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde, Y es la variable respuesta, X_i y X_j son las variables independientes ($i = 1$ hasta j), β_0 es el coeficiente constante, β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes del término lineal, cuadrático y de interacción respectivamente y e_i es el error. El diseño experimental fue analizado mediante el software MINITAB® Release 14.12.0.

Tabla 3.2. Variables y sus niveles del diseño factorial completo 3^2 para remoción de DQO.

Variables independientes		
Niveles	pH	TRH
Bajo (-1)	6.5	10
Medio (0)	7	20
Alto (+1)	8	30

Variable dependiente: % de remoción de DQO

El porcentaje de remoción de la DQO fue calculado con la siguiente ecuación 3.2.

$$\% \text{ remoción} = \left(\frac{DQO_o - DQO_f}{DQO_o} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde DQO_o y DQO_f son la concentración (mg/L) de la demanda química de oxígeno inicial y final respectivamente.

3.2.3 Establecimiento de unidades experimentales

Cada unidad experimental constó de un matraz Erlenmeyer de capacidad nominal de 500 mL que contenía 250 mL de agua residual sintética con concentración de DQO de 3000 mg/L. (Pradeep, et al., 2014). Ésta contenía por cada litro de agua: sacarosa (2.50 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0.125 g), K_2HPO_4 (0.065 g), KH_2PO_4 (0.050 g), $(NH_4)HCO_3$ (0.50 g), $NaHCO_3$ (4 g), $KHCO_3$ (4 g) y extracto de levadura (0.025 g), posteriormente se reguló el pH según el arreglo experimental, después se esterilizaron en autoclave a $121^\circ C$ en 15 lbf in^2 y una vez estériles se les adicionó 10 mL de inóculo que contenía el consorcio de microorganismos (Figura 3.7).



Figura 3.7. Preparación y establecimiento de unidades experimentales para bioensayo.

Una vez montado el experimento se tomaron muestras cada hora para determinar el crecimiento bacteriano siguiendo el aumento de la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro GENESYS 20, Spectronic USA. La densidad óptica es convertible a la concentración celular como unidades formadoras de colonias (UFC/mL): $UFC/mL = (DO_{600} - 0.0112)/6 \times 10^7$ (Anexo A).

La demanda química de Oxígeno (DQO) en mg/L se determinó de acuerdo a las rutinas analíticas propuestas por la NMX-AA-030/1 (SCFI, 2012). En este análisis las muestras y las soluciones para la curva de calibración (Anexo B) se digitaron en termorreactor a 150 °C por dos horas. Después fueron llevadas al espectrofotómetro UV-vis para obtener las lecturas de absorbancia a 600 nm (Figura 3.8).



Figura 3.8. Análisis de DQO en unidades experimentales.

3.3 Etapa III: Evaluación de capacidad electrogénica de *B. subtilis* BSC-2

3.3.1 Construcción de celda de combustible microbiana

Por triplicado se construyó una CCM de doble cámara modificada a partir de Logan (2008) operada en modo batch (Figura 3.9). Las cámaras fueron construidas a partir de botes de polipropileno (PP5) de 900 mL de capacidad. Ambas cámaras se unieron por medio de un puente de PVC-C conectado a una tuerca unión del mismo material, esta contenía una membrana de intercambio de protones Nafion 117 de 1cm de diámetro. Para evitar fuga en ambas cámaras se utilizaron tuercas de PVC-C con empaques de caucho de 1.3 cm de diámetro. El ánodo se mantuvo en condiciones anaerobias y el cátodo en condiciones aerobias, para proveer oxígeno disuelto al

electrodo. Los electrodos fueron conectados mediante un alambre de aleación cobre-aluminio a través de una resistencia para cerrar el circuito.

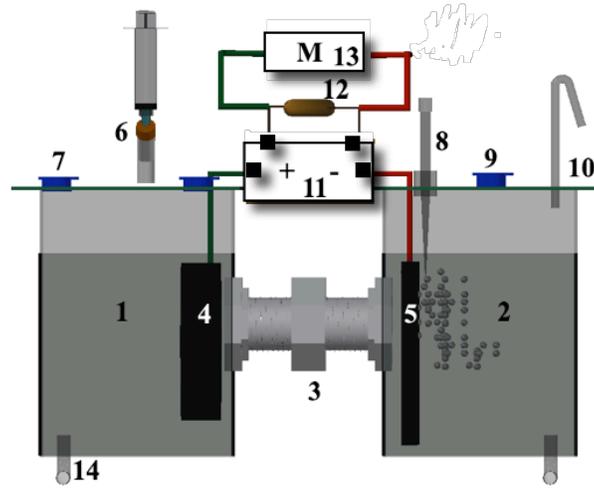


Figura 3.9. Esquema de la CCM de doble cámara. 1) Cámara anódica; 2) Cámara catódica; 3) MIP; 4) Ánodo; 5) Cátodo; 6) toma de muestra; 7) Entrada de fluido; 8) Entrada de aire; 9) Entrada de fluido; 10) Venteo atmosférico; 11) Tablero del circuito; 12) Resistencia externa; 13) Multímetro; 14) Salida de fluido.

3.3.2 Electrodo

3.3.2.1 Ánodo

El ánodo fue fieltro de grafito (Fuel Cell, Inc., USA) de 8 cm de diámetro por 1 cm de espesor. Para remover residuos orgánicos e inorgánicos éste fue sumergido en una solución de H_2SO_4 1M por 24 h y después en una solución de NaOH 1M por 3 h (Liu et al., 2010). Finalmente se lavó con agua desionizada estéril varias veces hasta alcanzar un pH neutro (Figura 3.10). Este fue sujetado mediante un alambre de aleación cobre-aluminio y se colocó dentro del compartimiento anódico en la celda. Después fue sujetado por un caimán que fue cubierto con un material epóxico para evitar su corrosión. A este electrodo no se le aplicó ningún catalizador, ya que esa función la llevaron a cabo los microorganismos de *B. Subtilis* suministrados en el compartimiento anódico de la CCM.



Figura 3.10. Limpieza e instalación de electrodo de fieltro de grafito para cámara anódica.

3.3.2.2 Cátodo

El cátodo fue de tela de carbón de 5 x 5 cm (40% Pt, 0.3 mg/cm²) (Fuel Cell, Inc., USA). Antes de su uso se retiraron las impurezas manteniéndolo sumergido en acetona por 24 horas, después fue lavado con abundante agua desionizada estéril (Madani et al., 2015) (Figura 3.11). Un alambre de aleación cobre-aluminio fue adherido al electrodo con resina epóxica conductiva y posteriormente fue colocado dentro del compartimiento catódico en la CCM. Después fue sujetado por un caimán que fue cubierto con una resina epóxica no conductiva para evitar su corrosión.

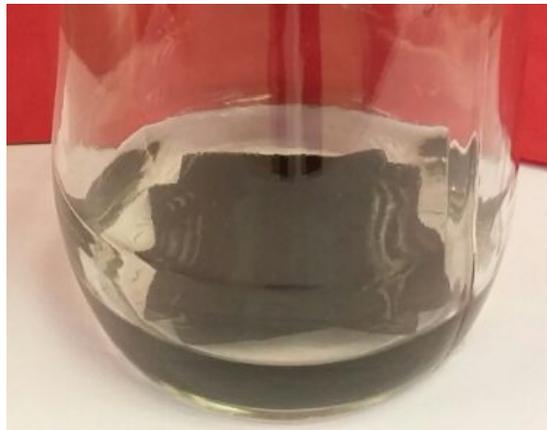


Figura 3.11. Limpieza de electrodo de tela de carbón 40% Pt, 0.3 mg/cm² para cámara anódica

3.3.3 Membrana intercambiadora de protones

La MIP Nafion 117 (Fuel Cell inc., USA) es una película de 183 micras de espesor, reforzada a base de un copolímero de PTFE (teflón)/Ácido perfluorosulfónico. Su estructura molecular permitió la absorción de agua, una vez húmeda condujo selectivamente iones de carga positiva bloqueando los iones de carga negativa.

Para usar la MIP fue necesario activar los canales sulfónicos (Mansoorian et al., 2013) (Figura 3.12). Ésta fue sometida a un baño ultrasónico (BRANSON 2510) en acetona durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se enjuagó con agua desionizada, y después se colocó en una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, a punto de ebullición durante 30 minutos. Después se enjuagó con agua desionizada, y posteriormente se llevó a temperatura de ebullición en agua desionizada, esto se realizó dos veces (cambiando el agua desionizada para la segunda ebullición). Posteriormente la membrana se pasó a una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de concentración 1 M y se llevó a calentamiento a $80^{\circ}C$ por una hora. Después, la membrana se mantuvo en esa misma solución durante 24 horas, finalmente se enjuagó. Una vez realizado este procedimiento, la membrana se ensambló en la celda de combustible microbiana, colocándola en el centro del tubo que conecta ambos compartimientos.



Figura 3.12. Preparación de la membrana Nafion 117 para su utilización en la CCM.

3.3.4 Electrolitos

3.3.4.1 Anolito

El anolito de la CCM se esterilizó en autoclave marca FELISA a 121 °C durante 20 minutos a 1.3 Kg/cm². Este consistió de 700 mL de agua residual sintética de la industria azucarera [Contenido por litro: sacarosa; 2.50 g, (NH₄)₂SO₄; 0.125 g, K₂HPO₄; 0.065 g, KH₂PO₄; 0.050 g, (NH₄)HCO₃; 0.50 g, NaHCO₃; 4 g, KHCO₃; 4 g, extracto de levadura; 0.025 g] (Pradeep, et al., 2014) y 150 mL de solución búfer 50 mM de K₂HPO₄. El pH fue ajustado con soluciones de NaOH 2M y H₂SO₄ 1M según el diseño experimental que posteriormente se indica.

En condiciones asépticas 1 mL de solución que contenía la cepa *B. Subtilis* (Apartado 3.2.1) fue inoculado en la cámara anódica. La densidad óptica inicial alcanzada en la cámara fue de 0.006 de absorbancia (600nm de DO) que corresponden a 37x10³ UFC/mL. Finalmente, la cámara se selló y para facilitar la toma de muestra se colocó en la superficie de la cámara una pipeta Pasteur adaptada con venoclisis como se muestra en la Figura 3.9.

3.3.4.2 Catolito

El catolito consistió de 600 mL de solución buffer 82 mM (pH 6.3) propuesta por Madani et al. (2015). Éste se mantuvo aireado continuamente mediante un compresor con el fin de mantener oxígeno disuelto en la cámara. Y para evitar contaminación por microorganismos hacia la cámara, el compresor fue conectado a un filtro microporo (0.22 µm) (Figura 3.13).



Figura 3.13. Preparación de catolito e instalación de cámara catódica.

3.3.5 Diseño experimental

El pH y la resistencia externa son factores que pueden afectar el rendimiento de la CCM, ya que no solo aseguran el crecimiento del microorganismo sino también el movimiento de protones. En este estudio, para encontrar los valores adecuados de pH y resistencia externa se usó un diseño factorial completo de tres niveles. Los gráficos de superficie de respuesta se usaron para estudiar la interacción de los factores entre las variables. Las variables independientes fueron el pH anódico (X_1) y la resistencia externa (X_2). Para las dos variables independientes se codificaron tres niveles bajo, medio y alto (-1, 0 y +1, respectivamente). Un total de 9 tratamientos fueron requeridos para analizar la interacción de cada nivel sobre la variable de respuesta (Tabla 3.3). La variable de respuesta evaluada fue la densidad de potencia (Y) y se analizó mediante análisis de regresión factorial múltiple utilizando el modelo de segundo grado de la ecuación 3.3, que se describe como sigue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + e_i \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde, Y es la densidad de potencia e indica el efecto cuantitativo de las variables independientes X_1 y X_2 . β_0 es el intercepto mientras, β_1 - β_{22} representan los coeficientes de regresión del sistema. Los efectos principales X_1 y X_2 representan el valor promedio de cambiar el factor uno a la vez, $X_1 X_2$ representan los términos

de interacción y los términos polinomiales X_1^2 y X_2^2 son usados para evaluar la no linealidad y e_i es el error aleatorio. Para identificar los términos significativos, en el modelo completo se descartaron los términos que tuvieron un valor de $p > 0.05$ y después se generó el modelo reducido. El diseño estadístico experimental fue analizado mediante el software MINITAB® Release 14.12.0.

Tabla 3.3. Variables y sus niveles del diseño factorial completo 3^2 para el sistema de CCM.

Variables independientes		
Valor codificado	pH	Resistencia (Ω)
bajo (-1)	7	47
Medio (0)	8	100
Alto (+1)	9	220
Variable dependiente: densidad de potencia (mW/m^2)		

3.3.6 Cálculos y mediciones analíticas

3.3.6.1 Determinación de la población de *B. Subtilis*

El crecimiento bacteriano fue determinado siguiendo el aumento de la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro GENESYS 20, Spectronic USA. La densidad óptica obtenida es convertible a la concentración celular como unidades formadoras de colonias (UFC/mL): $UFC/mL = (DO_{600} - 0.0112)/6 \times 10^7$. En el Anexo A se muestra la curva patrón con la que se estimó la población de *B subtilis* en UFC/mL.

3.3.6.2 Determinación de Azúcares

La fuente donadora de electrones en las CCM's es el combustible o el sustrato orgánico y este influye en el rendimiento de las CCM's.

En la cámara anódica, la concentración de azúcares fue determinada mediante el método fenol-ácido sulfúrico usando sacarosa como estándar (Dubios et al., 1956) (Figura 3.14).

Las muestras preparadas fueron leídas en absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro marca GENESYS 20 Spectronic y simultáneamente fue preparada una curva patrón (Anexo C).

La preparación de la muestra fue la siguiente:

1. 1 mL de cada muestra se colocó en tubos de ensaye de 20 x 150 mm marca KIMAX.
2. Posteriormente 0.6 ml de solución de fenol cristal al 5% se agregaron al tubo que contenía la muestra.
3. Seguidamente se le adicionaron 3.5 mL de H₂SO₄ concentrado.
4. Las muestras se dejaron reaccionar durante 20 min y después fueron leídas en espectrofotómetro a 490 nm.

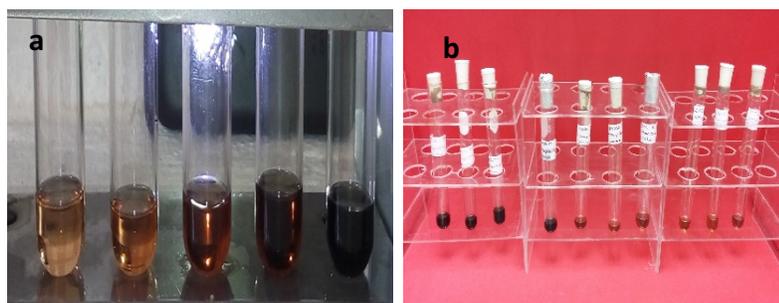


Figura 3.14. Reacción de azúcares por el método fenol-sulfúrico a) Para la curva patrón de azúcares totales y b) Azúcares totales de unidades experimentales.

3.3.6.3 Determinación de la DQO

En la cámara anódica, la DQO (mg/L) fue analizada mediante el método colorimétrico por reflujó cerrado como se menciona en los métodos estándar establecidos por la NMX-AA-030/1 (SCFI, 2012). Las muestras líquidas fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue usado para la medición de la DQO. La eficiencia en la remoción de la DQO fue calculada mediante la ecuación 3.2, mencionada en el apartado 3.2.3.

3.3.6.4 Cálculo de la eficiencia Coulómbica

La eficiencia coulómbica se define como la fracción de electrones recuperados como electricidad que se obtienen a partir de la remoción de un sustrato determinado. Ésta fue calculada con la siguiente ecuación 3.4. (Logan et al., 2006).

$$EC = \frac{\int_0^t I dt}{\eta v F (DQO_i - DQO_f)} \quad \text{Ec. 3.4}$$

La eficiencia coulombica se obtuvo determinando el área bajo la curva de la gráfica de corriente eléctrica en función del tiempo de operación de la CCM. En este trabajo el área bajo la curva se calculó aplicando el método del trapecio (Anexo C).

3.3.6.5 Cálculos de parámetros eléctricos

El potencial de celda (E en volts) del sistema fue medido usando un multímetro digital (aplavvc97).

La densidad de corriente se determinó a través de la fórmula propuesta por Logan et al. (2006):

$$DI = \frac{I}{A} \quad \text{Ec. 3.5}$$

Dónde, DI es la densidad de corriente, I es la Intensidad de corriente que fue calculada a partir de la ley de ohm ($I = V_{CCM}/R_{ext}$).

La intensidad de corriente se calculó con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{V}{R_{ext}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

Dónde, V es el voltaje y R_{ext} resistencia externa, A es área del ánodo (en este estudio fue de 0.0126 m^2).

La densidad de potencia se obtuvo a través de la fórmula propuesta por Logan et al. (2006):

$$DP = \frac{P}{A} \quad \text{Ec. 3.7}$$

Dónde, DP es densidad de potencia, P es potencia ($P = IV$) y A es área del ánodo. Con base en la curva de polarización la resistencia interna (R_i) de la CCM fue estimada mediante ecuación (3.8) obtenida del ajuste lineal de las pérdidas óhmicas (Logan, 2008):

$$V_{CCM} = V_{VCA} - IR_i \quad \text{Ec. 3.8}$$

Dónde, V_{VCA} es voltaje a circuito abierto e I es la corriente obtenida bajo la resistencia.

3.3.7 Análisis de biopelícula electroactiva

3.3.7.1 Microscopía de barrido electrónico

Con el propósito de detectar la formación de una biopelícula sobre el electrodo se realizó lo siguiente: Las muestras para SEM fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Baranitharan et al. (2015) modificado en este trabajo. Partes del electrodo de fieltro (0.5 x 0.5 cm) se extrajeron de la cámara anódica y se lavó con agua destilada estéril, inmediatamente se fijó con $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ (glutaraldehído) al 2%. Después las muestras se sometieron a deshidratación en serie usando concentraciones crecientes de etanol (10, 20, 30, 50, 75, 90 y 100 %) durante 30 minutos para cada concentración de etanol y luego se secaron a temperatura ambiente. Después las muestras secas se colocaron sobre una lámina de papel aluminio (0.5 x 0.5 cm) y se observaron en condiciones de bajo vacío en un Jeol SEM JEM 7401 operado a 5kV. para el procesamiento de imágenes se utilizó el Software InTouchScope™. El análisis elemental fue obtenido de tres puntos en donde se observó la mayor presencia de la biopelícula.

3.3.7.2 Cuantificación y cinética de formación de biopelícula

Cuando el voltaje de salida de la CCM se mantuvo estable, el ánodo fue extraído de la cámara anódica y se colocó en tubos para centrifuga que contenían 10 mL de agua destilada estéril. Estos se agitaron vigorosamente hasta obtener la suspensión de células. La suspensión se diluyó en serie con agua destilada estéril e inmediatamente fue sembrada sobre placas que contenían agar nutriente. Después se mantuvieron en incubadora por 72 h a 28 °C para obtener el número total de bacterias adheridas sobre el electrodo (Luo et al., 2015). Finalmente, mediante el modelo Maltusiano [$X(t) = X_0 \exp(\mu t)$] que se describe en el apartado 2.8.1 se determinó la tasa específica de crecimiento.

3.3.7.3 Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis FT-IR se realizó a la primera hora y 20 horas de establecido el experimento. Las muestras de electrodos se prepararon secándolas en horno a 120 °C durante toda la noche. Después de colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Seguidamente, con cuidado se fue desprendiendo la biopelícula de la superficie del electrodo, después se mezcló con KBr (sigma Aldrich grado FT-IR) al 1 % en peso de la muestra. Posteriormente se analizó en un espectrómetro FT-IR Shimadzu modelo IRAFfinity-1, en un intervalo de 750-4500 1/cm, a una resolución de 2/cm y 40 escaneos. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Irsolution™.

3.3.7.4 Voltamperometría cíclica

Para elucidar el mecanismo de transferencia de electrones de *B. Subtilis* se establecieron tres condiciones, estas fueron: 1) solución anódica con biomasa y biopelícula sobre electrodo, 2) sobrenadante, que fue obtenido al centrifugar la solución anódica (10,000 rpm por 10 minutos). Además éste fue filtrado mediante membrana de 0.22 µm para separar la biomasa. Y 3) un control que consistió de un medio fresco estéril. La voltametría cíclica fue realizada en Potenciostato-Galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT 128N. El volumen de trabajo de la celda electroquímica (Figura 3.15) fue de 60 mL. Como electrodo de trabajo se usó el electrodo de grafito con 6.28 cm² de área sumergida. El contraelectrodo fue una malla de platino estéril de 5 cm de largo por 0.5 de ancho y el electrodo Ag/AgCl fue usado como electrodo de referencia, éste se lavó previamente con agua desionizada estéril. Las mediciones se realizaron a las 20, 45, 64 y 88 horas de establecido el bioensayo. Los parámetros de medición fueron: potencial Inicial de -0.8 V a potencial final de 0.8 V, velocidad de escaneo 50 mV/s, número de segmentos de 20 (Lui et al., 2010, Luo et al., 2015).

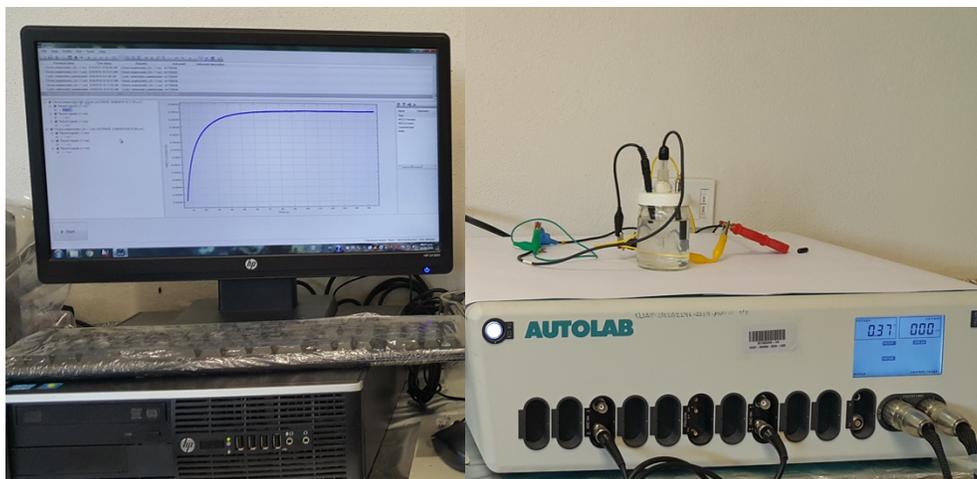


Figura 3.15. Análisis de voltamperometría cíclica de anolito.

3.3.8 Modelos cinéticos para crecimiento microbiano y consumo de sustrato en tratamiento optimizado

El estudio de la curva de crecimiento bacteriano y del consumo de sustrato es fundamental para cuantificar o monitorear el comportamiento de un microorganismo en biorreactores para el tratamiento de aguas residuales. En este estudio se aplicó el modelo de Gompertz (Ecuación 3.9), ya que se ha aplicado ampliamente por describir la forma sigmoidea asimétrica del crecimiento microbiano con precisión estadística en comparación con otras funciones sigmoideas (Gil et al., 2011, Liu et al., 2017).

$$\text{Log}N = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad \text{Ec. 3.9}$$

Donde:

Log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (log (UFC/mL) al tiempo t; A es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al logaritmo de los niveles iniciales de bacterias) (log (UFC/mL); C es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos log de crecimiento) (log (UFC/mL); M es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h); B es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo M (1/h). De estos

parámetros se deriva la velocidad específica de crecimiento ($\mu = B(C/e), e = 2.7182) [\text{Log} (\text{UFC}/\text{mL}) / \text{h}]$.

Los modelos cinéticos para determinar la tasa de consumo del sustrato fueron: modelos de cero, primer y segundo orden (Sarioglu y Gökçek, 2016). Los datos fueron ajustados a cada uno de los modelos y los parámetros cinéticos fueron considerados con base en la verificación del coeficiente de determinación (R^2) de cada modelo ajustado. Las ecuaciones son las siguientes:

En modelos de orden cero la concentración del sustrato es directamente proporcional al tiempo transcurrido, por lo que el valor de k_0 puede obtenerse trazando (S_t) frente a tiempo (horas) en la ecuación 3.10.

$$S_t = S_0 - k_0 t \quad \text{Ec. 3.10}$$

Para modelos de primer orden la concentración del sustrato decae exponencialmente con el tiempo. El valor de k_1 puede obtenerse trazando ($\text{Ln}S_t$) en función del tiempo (horas) en la ecuación 3.11.

$$S_t = S_0 e^{k_1 t} \quad \text{Ec. 3.11}$$

En modelos de segundo orden el valor de k_2 puede obtenerse trazando ($1/S_t$) en función del tiempo (horas).

$$\frac{1}{S_t} = \frac{1}{S_0} + k_2 t \quad \text{Ec. 3.12}$$

Dónde: S_t es la concentración del sustrato a un tiempo t (g/L), S_0 es la concentración inicial del sustrato a un tiempo t_0 (g/L), t es el tiempo (h), k_0 es la tasa de consumo del sustrato de orden cero (g/L h), k_1 es la tasa de consumo del sustrato de primer orden (1/h) y k_2 es la tasa de consumo del sustrato de segundo orden (L/g h).

3.4 Etapa IV: Evaluación de la eficiencia en dos configuraciones de CCM

3.4.1 Remoción de la DQO y producción de electricidad en CCM-U y CCM-D

Recientemente las CCM han llamado la atención como una nueva tecnología, porque el tratamiento de aguas residuales y la producción de electricidad son simultáneos. Tao et al. (2015) menciona que la remoción de contaminantes está influenciada por el tipo de configuración.

En esta investigación un sistema de una sola cámara y de doble cámara fueron usados para evaluar la eficiencia en la remoción de la DQO y la producción de electricidad a partir de agua residual sintética.

El diseño experimental fue completamente al azar, con un total de 2 tratamientos por triplicado.

El factor o variable independiente fue el tipo de configuración de CCM (I) y las variables dependientes (Y) fueron: el potencial generado a circuito abierto (mV), la densidad potencia (mW/m^2), la eficiencia coulombica (% EC) y el % de remoción de DQO.

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + I_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3 \dots t \quad j = 1, 2, 3 \dots r \quad \text{Ec. 3.13}$$

Dónde, Y_{ij} es la variable respuesta en tratamiento i , repetición j , μ es la media general, I_i es el efecto del tratamiento i , ε_{ij} es el error aleatorio; $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

El ANOVA de una-vía fue aplicado con el fin de comparar las variables dependientes. El análisis de medias fue realizado con la prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas individuales. La significancia estadística se estableció como $p \leq 0.05$ y el Software estadístico utilizado fue Minitab Express™ 1.5.0.

La DQO y la eficiencia coulombica fueron determinadas como se mencionó en los apartados 3.3.6.3 y 3.3.6.4.

Las curvas de polarización para cada configuración de celda fueron obtenidas variando la resistencia externa desde 4700 hasta 47 Ω . La resistencia interna de

cada CCM fue obtenida a partir de la pendiente de la curva de polarización mediante un ajuste lineal (Logan, 2008).

3.4.2 Construcción de dos configuraciones de CCM

Los sistemas de CCM de una cámara (CCM-U) y de doble cámara (CCM-D) (Figura 3.16) fueron hechas de acrílico Plexiglas de 3mm de espesor. La CCM de una cámara con cátodo expuesto al aire (Call y Logan, 2004), consistió de una cámara horizontal cilíndrica (ánodo) de 10 cm de largo por 10 cm de diámetro con un volumen de trabajo de 700 mL.

La CCM de doble cámara (anódica y catódica) consistió de dos cámaras cilíndricas horizontales de 10 cm de largo por 10 cm de diámetro (Logan et al., 2006). El volumen de trabajo de cada cámara fue de 700 mL.

Las cámaras estuvieron separadas por una membrana intercambiadora de protones Nafion 117, película de 183 μm . La distancia de separación entre las cámaras fue de 0.5 cm. Láminas de silicón fueron usadas con el fin de evitar fugas del electrolito. En la parte superior de la cámara anódica se colocó una toma de muestra utilizando pipetas Pasteur adaptadas con venoclisis, para facilitar la toma de muestra por medio de una jeringa de 5 mL. La cámara catódica se mantuvo aireada continuamente a través de un compresor. Y para evitar contaminación por microorganismos en la cámara catódica, el compresor fue conectado a un filtro microporo de 0.22 μm .

La preparación de los electrodos, la MIP y los electrolitos se realizaron como se mencionó en los apartados 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4, respectivamente.

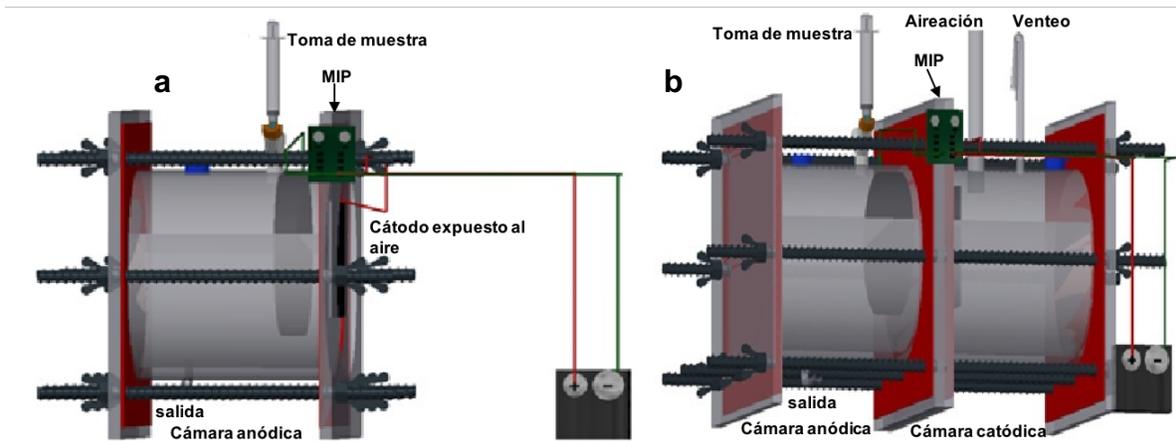


Figura 3.16. Esquema de la celda de las celdas de combustible microbianas a) CCM-U con cátodo expuesto al aire. b) CCM-D.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características fenotípicas y genotípicas de aislados bacterianos

4.1.1 Caracterización fenotípica

El aislamiento bacterias se llevó a cabo en el medio de cultivo agar nutriente, donde la caracterización macroscópica a nivel cepa permitió observar dos cepas codificadas como BCC-1 y BSC-2. Las colonias de estas cepas presentaban formas circulares e irregulares, blanquecinas, redondas y onduladas, de elevación plana y convexa (Figura 4.1, tabla 4.1).

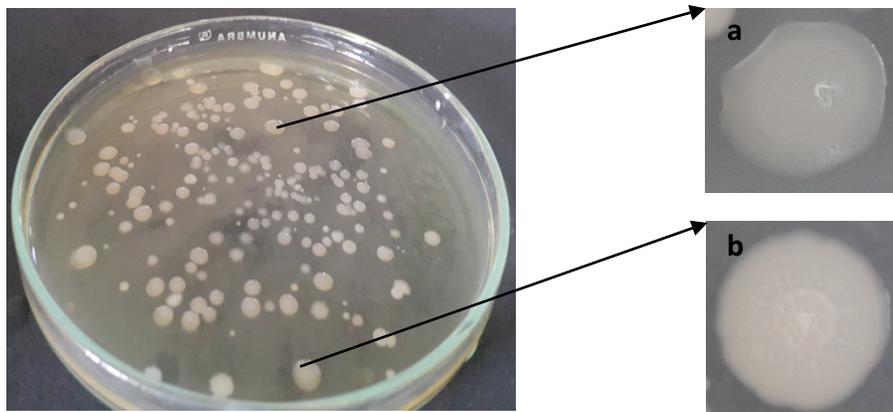


Figura 4.1. Colonias de bacterias encontradas en agua residual de la industria azucarera. a) Cepa BCC-1 y b) Cepa BSC-2.

Las células fueron Gram-positivas y las micrografías muestran que las bacterias tienen forma oval con longitud de 1.2 a 1.4 μm y 1.4 a 1.6 μm para las cepas BCC-1 y BSC-2, respectivamente (Figura 4.2).

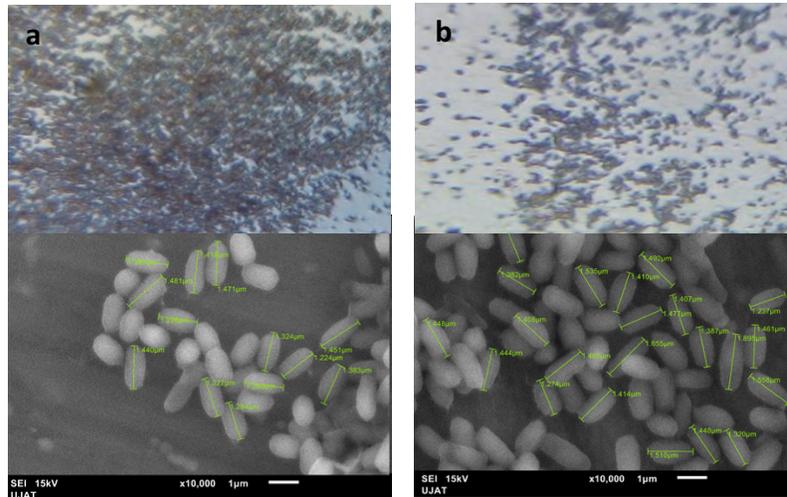


Figura 4.2. Tinción de Gram (superior) y micrografías SEM (Inferior), para a) Cepa BCC-1 y b) Cepa BSC-2.

Tanto la cepa BCC-1 como BSC-2 fueron positivas a las pruebas de catalasa y reducción de nitratos. La cepa BSC-2 puede fermentar manosa, sorbitol, arabinosa, ramnosa, ribosa, glucosa y sacarosa. La cepa BCC-1 puede fermentar ribosa, glucosa y sacarosa. Pero ésta no puede fermentar manosa, sorbitol, arabinosa y ramnosa (Tabla 4.1).

Won (2015) y Petersohn et al. (2001) reportan que las bacterias del género *Bacillus* son Gram-positivas, reducen nitratos, son positivas a catalasa y presentan longitudes desde 1 hasta 10 µm. Las características fenotípicas mostradas en la Tabla 6.1, indican que las cepas BCC-1 y BSC-2 pertenecen al género *Bacillus*. Sin embargo, debido a la diferencia en la fermentación de carbohidratos, se pudo decir que son dos especies de *Bacillus*.

Tabla 4.1. Características fenotípicas de cepas bacterianas.

Características	BCC-1	BSC-2
Forma	Circular	Irregular
Color	Blanquecina	Blanquecina
Borde	Redondo	Ondulado
Elevación	Convexa	Plano
Consistencia	Viscosa	Seca y aspera
Características microscópicas	1.2-1.4 μm	1.4-1.6 μm
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Nitrato	+	+
Manosa	-	+
Sorbitol	-	+
Arabinosa	-	+
Ramnosa	-	+
Ribosa	+	+
Glucosa	+	+
Sucrosa	+	+

4.1.2 Caracterización genotípica

El producto de amplificación que se obtuvo con los iniciadores 16sV3-V5F y 16sV3-V5R fue de 579 pb. La comparación de la secuencia de nucleótidos de la cepa BCC-1 mostró 99 % de similitud con la secuencia de *Bacillus cereus* (KX170761.1). La cepa BSC-2 presentó un 99 % de similaridad con la secuencia de *Bacillus subtilis* (GQ392049.1). Estas similitudes son reportadas por el Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCMI, 2016). Por lo tanto, las cepas BCC-1 y BSC-2 fueron designadas como *B. Cereus* y *B. Subtilis*, respectivamente. Sin embargo, debido a que *B. cereus* es considerada por la Food and Drug Administration (FDA) como organismo patógeno (Tallent et al., 2012) su uso fue descartado en este trabajo. Por lo tanto, *B. subtilis* fue seleccionado ya que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica (Zhu et al., 2015). La secuencia obtenida de *B. subtilis* se registró en el Banco de Genes con el número de acceso [KY508314](#).

4.1.3 Efecto del pH sobre el crecimiento de *B. subtilis* BSC-2

Aunque las bacterias *B. subtilis* son conocidas por su capacidad para resistir a condiciones ambientales estresantes (Wong, 2015), el pH adecuado para el máximo crecimiento de la especie fue a un pH neutro (Figura 4.3). Madigan et al. (2012) reporta que el crecimiento de los microorganismos es dependiente de diversos factores como: los nutrientes, las condiciones ambientales y fisiológicas como el pH, y que el pH adecuado para el desarrollo de los microorganismos es cercano a la neutralidad.

En este estudio el análisis de varianza demostró que existen diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$) en el crecimiento de *B. subtilis* a diferentes pHs. La mayor población con 163×10^5 UFC/mL se registró cuando el pH fue 7. Cuando el pH se mantuvo en 8 la población fue de 52×10^5 UFC/mL. En el medio ácido a pH de 5 y 6 la población fue baja ya que solo se encontró el 2 % de la población respecto a las que se encontraron a pH de 7. Por lo tanto, el pH neutro favorece el crecimiento de *B. subtilis*.

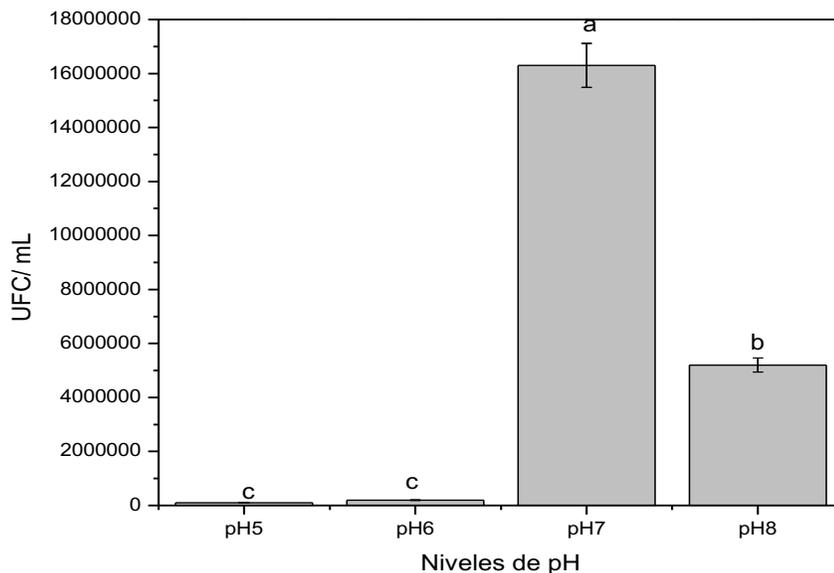


Figura 4.3. Población de *B. subtilis* BSC-2 a pH's de 5, 6, 7 y 8. Barras con misma letra son estadísticamente iguales.

4.2 Influencia del pH y el tiempo en la remoción de la DQO

El análisis de varianza (ANOVA) fue aplicado para estimar la significancia del modelo, el modelo cuadrático es estadísticamente significativo para la variable de respuesta (% de remoción de DQO). El valor de F de Fisher es calculado a partir de la varianza debido a la fuente de regresión con respecto a los residuos. La prueba de Fisher mostró un valor mayor con respecto al valor crítico, indicando que el modelo es altamente significativo con un valor de significancia de 0.000 (Tabla 4.2). Los efectos principales de los factores X_1 (pH) y X_2 (TRH) no fueron significativamente influyentes sobre el % de remoción de DQO en razón al p valor de 0.914 y 0.086, respectivamente. Sin embargo, sí existe un efecto altamente significativo sobre la variable respuesta debido al término de interacción ($X_1 * X_2$) y a los términos cuadráticos de los factores X_1^2 y X_2^2 , con un p valor de 0.000, 0.006 y 0.000, respectivamente (Tabla 4.3). Aunque los efectos principales no fueron significativos, se incluyeron en el modelo para formar un modelo jerárquico (Myers et al., 2016). Por lo tanto, el siguiente modelo de segundo orden (Ec. 4.1) se consideró satisfactorio para explicar % de remoción de DQO.

$$\% \text{ de Remoción DQO} = -951.39 + 259.45X_1 + 11.85X_2 - 1.33X_1 * X_2 - 16.62X_1^2 - 0.06X_2^2$$

Ec. 4.1

Tabla 4.2. ANOVA para el modelo cuadrático del % de remoción de DQO.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado medio	Coefficiente-F	P valor
Modelo	5	1016.30	203.26	13.09	0.000
Lineal	2	46.85	24.48	1.58	0.223
Cuadrado	1	388.14	194.07	12.50	0.000
interacción	2	581.30	581.30	37.45	0.000
Residuo	30	465.68	15.52		
Total	35	1481.98			

Tabla 4.3. Coeficientes estimados a partir de la regresión.

Parámetro	Coefficiente estimado	Error estándar	Prueba t	p-valor
Constante	77.4535	1.4222	54.460	0.000
X_1	1.5850	0.8942	1.773	0.086
X_2	0.0890	0.8156	0.109	0.914
X_1^2	-5.9466	1.4816	-4.014	0.000
X_2^2	-4.1546	1.3030	-2.983	0.006
X_1X_2	-6.6550	1.0875	-6.120	0.000

4.2.1 Superficie de respuesta para % de remoción de DQO

La superficie de respuesta de los efectos del pH y el TRH que generan la máxima remoción de DQO se muestran en la Figura 4.4. La curvatura generada por el término cuadrático del pH y el TRH causan un máximo en la variable de respuesta. La tendencia en la remoción de la DQO es aumentar conforme aumenta el pH desde 6 hasta 7, pero disminuye cuando el pH se incrementa sobre 7. Con respecto al TRH el comportamiento es similar al efecto cuadrático del pH, la remoción de la DQO aumenta conforme se incrementa el TRH desde 10 hasta 20 h, después de este tiempo tiende a disminuir. Esto indica que existen condiciones óptimas de los factores para la remoción de la DQO. Por lo tanto, mediante la ecuación 4.1 se obtuvieron los valores óptimos para pH y TRH de 7 y 20 h, respectivamente. Para estos puntos el máximo valor de la remoción de DQO fue de 80 %. Es claro que el pH juega un papel importante en el metabolismo bacteriano y en la absorción de nutrientes. Si el microorganismo crece a pH óptimo la actividad enzimática es estable y el microorganismo degrada la materia orgánica de forma efectiva (Madigan et al., 2012). Por otra parte, el TRH mayor a 20 h y a pH's menor o mayor que 7 causan un efecto negativo en el % de remoción de la DQO. Por lo tanto, el efecto del TRH sobre el % de remoción de DQO es altamente dependiente del nivel del pH.

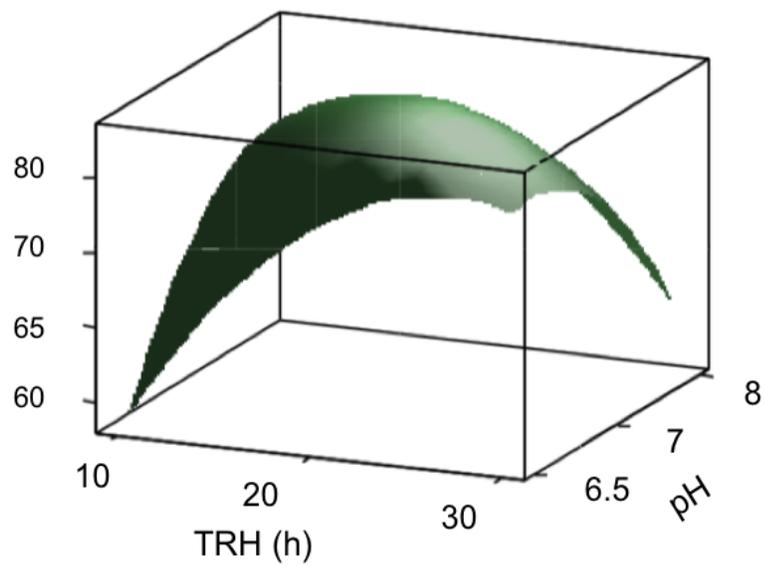


Figura 4.4. Efecto de los niveles de cada factor en la remoción de la DQO.

4.3 Generación de voltaje, crecimiento y consumo de sustrato de *B. subtilis*

El voltaje de salida de la celda fue incrementando con la etapa del crecimiento exponencial de *B. subtilis*. Esta etapa es considerada como anabolismo, donde las células utilizan la fuente de carbono para su división o reproducción (Madigan et al, 2012). Con el inicio de la fase de crecimiento exponencial de *B. subtilis* desde 15 hasta 61 horas, el voltaje incrementó desde 6 hasta 567 mV con un potencial estable de 539 ± 22 mV (Figura 4.5a y 4.5b). Un estudio similar fue reportado por Nimje et al. (2009) quienes registraron que la cepa *B. subtilis* (BK006) aislada de un suelo mantuvo un voltaje constante de 360 ± 20 mV, pero con la adición sucesiva de glucosa durante 72 días. Por otro lado, una CCM operada con *Kucuria rizophila* generó un máximo voltaje 215 mV a las 315 horas de operación (Luo et al., 2015). En este estudio no hubo adición de sustrato y el voltaje generado fue mayor a los reportados. Esto puede ser debido a que la cepa *B. subtilis* BSC-2 está adaptada a desdoblar la sacarosa, pues de donde esta fue extraída, la sacarosa es la fuente de principal de carbono.

La sacarosa es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, *B. subtilis* BSC-2 es eficiente para hidrolizar la sacarosa y obtener azúcares simples. Estos últimos son usados para la síntesis de ATP mediante la cadena transportadora de electrones. Cuando la concentración de sacarosa disminuye desde 1.00 hasta 0.85 ± 0.0014 g/L, se registró el mayor voltaje (539 ± 22 mV) y la población microbiana fue de $33 \times 10^4 \pm 1667$ CFU/mL (Figura 4.5a). Este resultado puede ser debido a la formación de una biopelícula sobre el electrodo que facilitó el transporte de electrones y provocó un aumento en el voltaje. Así como a la posible formación de metabolitos secundarios o primarios que actuaron como mediadores de electrones.

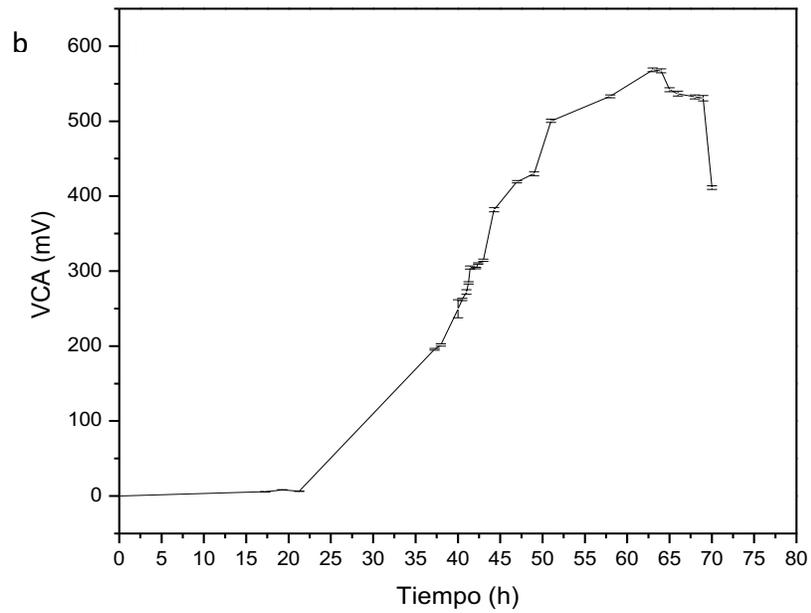
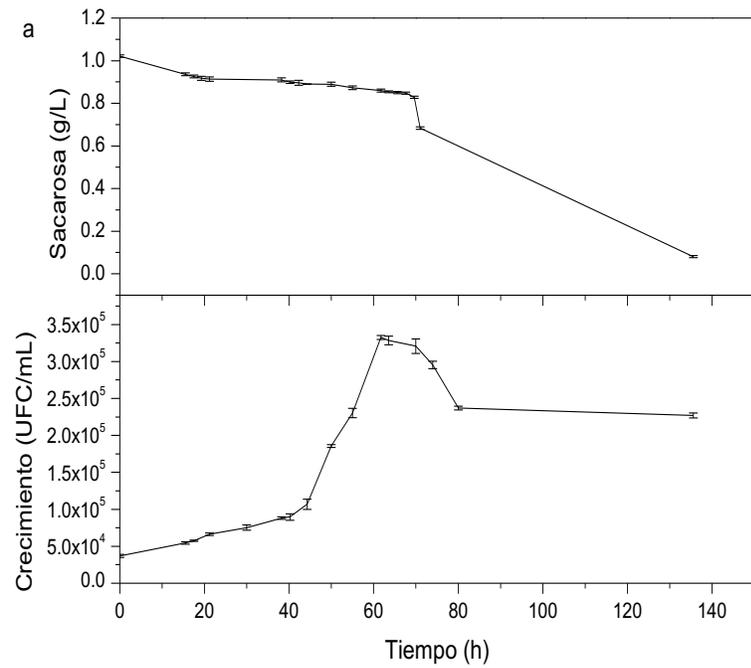


Figura 4.5. Comportamiento del crecimiento de *B. subtilis* y generación de voltaje. a) curva de crecimiento y consumo de sustrato. b) Voltaje en circuito abierto. (barras de error con n=3).

4.3.1 Relación entre el voltaje, consumo de sustrato y crecimiento de *B. subtilis* BSC-2

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson se pudo confirmar la fuerte relación entre el crecimiento bacteriano, el consumo del sustrato y la generación de voltaje (Tabla 4.4). El crecimiento bacteriano con el consumo de sacarosa presentan una correlación negativa significativa ($r=-0.71$, $p<0.015$) ya que conforme aumenta el crecimiento bacteriano la concentración de sacarosa disminuye. El crecimiento bacteriano con la generación de voltaje presentan una correlación positiva altamente significativa ($r=0.87$, $p=0.000$). indicando que el 76 % (0.87^2) de la variación en la salida del voltaje se explica por el crecimiento bacteriano. El 24 % restante no explicado, puede deberse a la influencia de otros factores que afectan la salida del voltaje en la CCM. Varios estudios informan que existe una relación directamente proporcional entre el voltaje y el metabolismo bacteriano. Pero debido a pérdidas de potenciales (activación, óhmicas y de concentración) el rendimiento de las CCM's se ve afectado (Gude, 2016).

Tabla 4.4. Matriz de Correlación de variables: consumo de sustrato, crecimiento bacteriano y voltaje.

Variables	Crecimiento bacteriano	Consumo de sustrato
Consumo de sustrato	-0.71 <0.015	
Voltaje	0.87 0.000	-0.74 0.009

4.4 Efecto del pH anódico y la resistencia externa sobre la densidad de potencia

4.4.1 Optimización mediante diseño factorial completo

El diseño factorial fue usado para investigar el efecto del pH y la resistencia externa sobre la densidad de potencia. La Tabla 4.5 muestra los datos obtenidos del ensayo experimental. Y los valores de densidad de potencia fueron ajustados al diseño para obtener el modelo matemático en función de las variables independientes.

Tabla 4.5. Diseño factorial completo con sus niveles experimentales codificados de variables independientes y valores de respuesta observados.

Batch No.	Niveles de variables independientes (factores)		Variable dependiente (response)
	pH, X_1	Resistencia (Ω), X_2	Densidad de potencia (mW/m^2)
MFC ₁	-1	-1	059.42 ± 3.03 ^a
MFC ₂	-1	0	037.89 ± 1.09
MFC ₃	-1	1	121.39 ± 2.12
MFC ₄	0	-1	006.91 ± 0.77
MFC ₅	0	0	327.64 ± 58.85
MFC ₆	0	1	313.65 ± 19.00
MFC ₇	1	-1	002.70 ± 0.63
MFC ₈	1	0	002.21 ± 0.97
MFC ₉	1	1	416.10 ± 86.77

+1: valor alto, 0: Valor medio y -1: valor bajo. ^aMedia ± DS, n = 3.

El modelo completo que relaciona a la densidad de potencia con las variables independientes es:

$$DP (mW/m^2) = 250.50 + 45.92X_1 + 130.35X_2 - 109.45X_1^2 - 24.17X_2^2 + 93.19X_1X_2 \quad \text{Ec. 4.2}$$

El modelo estadístico se desarrolló con la prueba estadística de Fisher para el ANOVA. La tabla 4.6 muestra los valores de Prob > F de todos los términos del modelo de regresión, que fueron menores a 0.05. Esto indica que los términos del modelo son significativos con un intervalo de confianza del 95%. Además, el F-valor (18.18) del modelo implica que el modelo cuadrático es significativo. El lack-of-fit describe la variación del ajuste del modelo. El modelo presentó un valor de lack-of-fit (F-valor = 4.87, p<0.05) no significativo, que indica una correlación significativa entre los factores y la respuesta (Myers et al., 2016).

La simplificación del modelo se llevó a cabo eliminando términos no significativos (p > 0.05) del modelo anterior (Ec. 4.3).

$$DP (mW/m^2) = 232.81 + 45.92X_1 + 127.81X_2 - 109.45X_1^2 + 93.19X_1 * X_2 \quad \text{Ec. 4.3}$$

Tabla 4.6. Resultados del ANOVA para el modelo cuadrático de la densidad de potencia.

Fuente	gl	Sum. de cuadrados	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Modelo	4	511072	127768	18.18	0.000 ^a
Lineal	2	329622	173106	24.63	0.000
Cuadrático	1	71872	71872	10.22	0.004
Interacción	1	109578	109578	15.59	0.001
Residual Error	22	154646	7029		
Lack-of-Fit	4	131904	32976	4.87	0.056
Error-puro	5	22742	6763		
Total	26	665718			

^a Términos significativos $p < 0.05$, R-Cuadrada = 86 % y R-cuadrada ajustada = 84 %

Como el modelo fue generado tomando en cuenta únicamente los términos significativos del modelo completo, los resultados fueron deducidos por interpretación del modelo reducido. La Tabla 4.7 muestra el efecto de los factores y los p-valores asociados para la densidad de potencia, tanto para el modelo reducido como para el modelo completo.

Los coeficientes en la regresión con más de un factor representan una interacción. Un valor positivo representa un efecto sinérgico que favorece la optimización, mientras que un signo negativo indica un efecto antagónico o inverso entre los factores y la respuesta (Sarabia y Ortiz, 2009). Así, la ecuación de regresión del modelo reducido (Ec. 4.3) y la Tabla 4.7 muestran que la densidad de potencia fue significativamente influenciada por el efecto sinérgico del pH, la resistencia externa y la interacción (pH*Rext) con p-valores de 0.032, 0.000 y 0.001, respectivamente. Mientras el término cuadrático del pH presentó un efecto negativo sobre la densidad de potencia con un p-valor de 0.004. Los resultados indican que el incremento en la densidad de potencia es consecuencia de la fuerte interacción entre el pH y la resistencia. Además, el pH mostró un efecto cuadrático sobre la densidad de potencia que indica que existe un nivel óptimo de pH que está dentro de la región experimental.

Tabla 4.7. Efecto de los factores para el modelo completo y modelo reducido.

Factor	Modelo completo			Modelo reducido		
	Coefficientes de X	t	P-valor	Coefficientes de X	t	P-valor
X ₁	45.92	2.261	0.035 ^a	45.92	2.296	0.032
X ₂	130.35	6.495	0.000 ^a	127.81	6.632	0.000
X ₁ X ₂	93.19	3.888	0.001 ^a	93.19	3.948	0.001
X ₁ ²	-109.45	-3.148	0.005 ^a	-109.45	-3.198	0.004
X ₂ ²	-24.17	-0.573	0.573	-	-	-
Intercepto	250.50	5.964	0.000 ^a	232.81	8.297	0.000

^a Términos significativos a $p < 0.05$.

4.4.2 Superficie de respuesta y contornos

El MSR es una herramienta útil para desarrollar, mejorar y optimizar procesos, así como elucidar la relación entre las variables dependientes e independientes (Myers et al, 2016; Sarabia y Ortiz, 2009). Los gráficos de superficie de respuesta y de contorno son muy útiles para ilustrar y entender los efectos principales de interacción y cuadráticos sobre la densidad de potencia. Los efectos del pH y la R_{ext} que producen la máxima densidad de potencia están evidenciados en las Figuras 4.6a y 4.6b. En éstas se puede observar la curvatura introducida por el término cuadrático del pH y que la densidad de potencia efectivamente presenta un valor máximo. La figura 4.6a también muestra la tendencia de la densidad de potencia a aumentar conforme aumenta la R_{ext}. Además, los resultados presentan un máximo obtenido para un valor intermedio entre el pH 8 y pH 9 con las resistencias consideradas. Sin embargo, la máxima densidad de potencia es observada entre 150 y 220 Ω.

Es claro que el pH tuvo un efecto fuerte sobre la variable de respuesta, porque durante el crecimiento microbiano las reacciones enzimáticas que se dan en el cuerpo microbiano tienen un pH óptimo. Cambios ambientales en el pH afectan el centro activo de la enzima y la carga del sustrato, además valores de pHs por encima o debajo del pH adecuado influyen en la estabilidad de la enzima dañándola irreversiblemente, que resulta en la inactivación de la bacteria. Así mismo, el pH también influye en el metabolismo y la absorción de nutrientes, afectando la tasa de crecimiento del microorganismo (Madigan et al., 2012). Además, la selección del pH anódico asegura el movimiento eficiente de protones a través de la MIP por que la fuerza impulsora para la reacción en el ánodo se incrementa con un incremento del

pH en el anolito. Los efectos del pH alcalino en el anolito han sido previamente reportados, en tales estudios se han utilizado electrógenos de especies como *Corynebacterium* (Liu et al., 2010; Rago et al., 2016).

Además, la resistencia externa en la CCM influye directamente sobre la disponibilidad del ánodo como un aceptor de electrones. Y también ejerce una presión selectiva sobre la comunidad bacteriana electrogénica. Lyon et al. (2010) encontró que a bajas resistencias externas (50 a 500 Ω) se promueve el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos ya que se facilita el transporte de electrones. Zhang et al. (2013) menciona que la resistencia externa adecuada permite regular el potencial del ánodo, permitiendo a los electrógenos equilibrar la cinética de reducción del electrodo con ganancia de energía potencial y así reducir las pérdidas por activación. En este trabajo el incremento del pH desde 7 hasta 9 con resistencia externa de 220 Ω , la densidad de potencia fue mejorada alrededor de 3.4 veces (desde 121.3 hasta 416.10 mW/m^2). Estos resultados revelan, que el efecto de la interacción entre el pH y la R_{ext} es notable, y que el efecto del pH sobre la densidad de potencia depende en gran medida del nivel de resistencia externa.

La Figura 4.6b muestra el gráfico de contorno, las áreas representan respuesta constante, que corresponden a densidades de potencia desde 0 hasta 400 mW/m^2 . A partir del contorno se determinó que la máxima densidad de potencia mayor a 400 mW/m^2 puede ser obtenida en un rango de pH entre 8.5 y 8.8 con resistencia externa de 220 Ω . Mediante la ecuación 4.3 la localización de los valores óptimos fueron determinados para pH de 8.6 y resistencia externa de 220 Ω . La máxima densidad de potencia en tales puntos dados fue de 405 mW/m^2 . Para confirmar los resultados predichos por el modelo, la verificación experimental se realizó por triplicado bajo las condiciones óptimas. La densidad de potencia promedio generada fue de $402.55 \pm 2.63 \text{ mW/m}^2$. Con un pequeño error de -0.6. Esta CCM optimizada fue caracterizada mediante la cinética de crecimiento y consumo de sustrato para *B. Subtilis*.

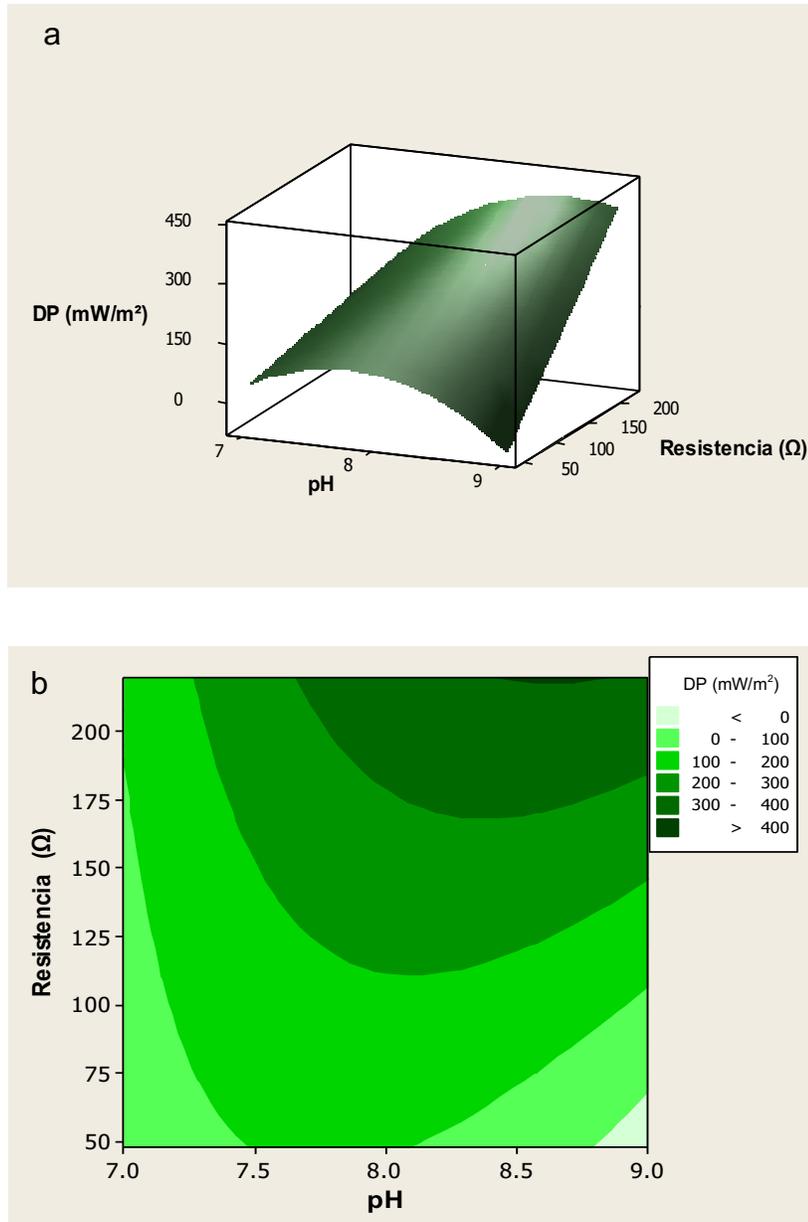


Figura 4.6. a) Superficie de respuesta para densidad de potencia. b) Gráfico de contorno para densidad de potencia.

4.5 Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *B. subtilis* en CCM optimizada

Los parámetros cinéticos μ y k_1 se determinaron por el ajuste de los datos al modelo de Gompertz y al modelo de primer orden, respectivamente. La Figura 4.7a muestra

que los datos observados dieron un ajuste razonable a la cinética de crecimiento descrita por el modelo de Gompertz (Ec. 3.9). Además, el valor del coeficiente de determinación ($R^2=0.98$) muestra la capacidad de este modelo en describir la cinética de crecimiento de *B. subtilis* BSC-2. Así, la tasa de crecimiento de *B. subtilis* BSC-2 obtenida en la CCM operada a pH anódico de 8.6 y resistencia externa de 220Ω fue de $\mu = 0.19/h$. La Figura 4.7b muestra la cinética del consumo de sacarosa y el ajuste del modelo mediante la ecuación 3.11. El coeficiente de determinación $R^2 = 0.97$ muestra que el modelo tuvo un excelente ajuste a los resultados experimentales, obteniendo así la tasa de consumo de sustrato de $k_1=0.019/h$.

Miroliaei et al. (2015) investigaron la cinética de cultivos puros de *E. Coli* y *Shewanella sp.* en una CCM de una sola cámara, los parámetros cinéticos fueron estimados usando los modelos de Monod y Moser. Para *E. Coli* el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.92 para el modelo de Moser y 0.94 para el modelo de Monod. Para *Shewanella sp.* el coeficiente de determinación R^2 fue de 0.90 y 0.94 para los modelos de Monod y Moser, respectivamente. Para *E. Coli* y *Shewanella sp.* la tasa de crecimiento específico estimada con el modelo de Monod fue de 0.42 y 1.54/h, respectivamente. Zhang et al. (2013) estudiaron la degradación de nitratos en una celda de combustible microbiana de desnitrificación anódica (CCM-DA). Este estudio reportó 4 modelos cinéticos de degradación, estos fueron: Haldane ($R^2=0.79$), Edwards ($R^2=0.83$), Luong ($R^2=0.97$) y Hand-Levenspiel ($R^2=0.99$). El modelo de Hand-Levenspiel fue seleccionado como el mejor modelo. Por lo tanto, la selección del modelo adecuado en el modelado del crecimiento bacteriano y el consumo de sustrato, puede depender del tipo de microorganismo, características del anolito y condiciones de operación, etc. (Okpokwasili y Nweke, 2005; Sarioglu y Gökçek, 2016).

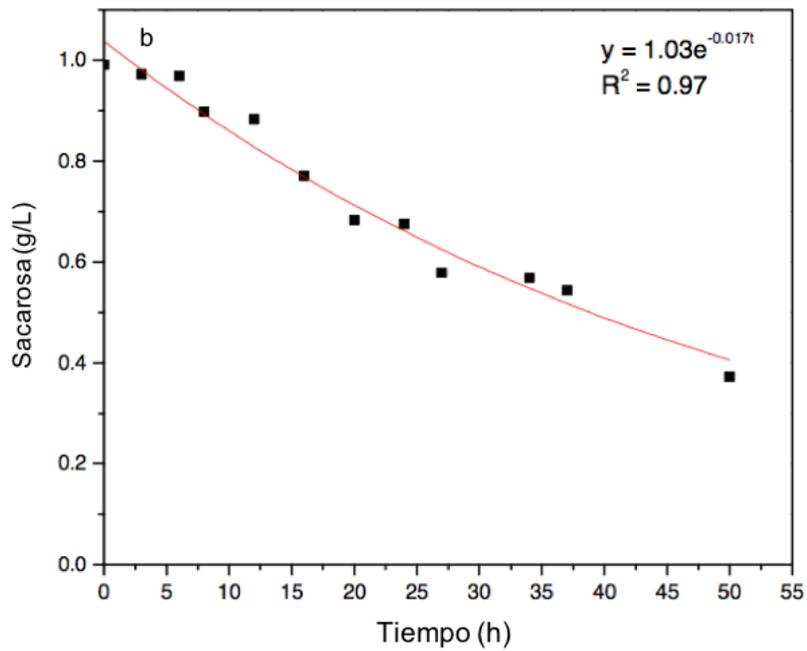
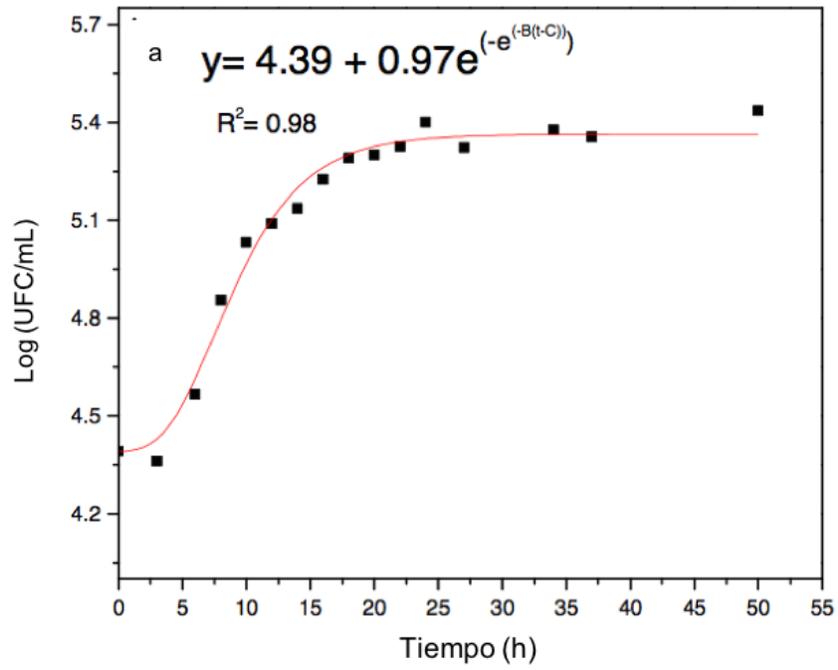


Figura 4.7. a) Valores de crecimiento de *B. subtilis* BSC-2 y modelo ajustado por ecuación 3.9. b) Valores de concentración de sacarosa y modelo ajustado por la ecuación 3.11.

4.6 Caracterización de biopelícula electroactiva de *B. Subtilis* BSC-2

Las bacterias se posicionan estratégicamente sobre la superficie del ánodo y forman una comunidad llamada biopelícula. La biopelícula está formada por una matriz de EPS que permite a las bacterias transportar electrones al ánodo (Zhang et al., 2015). Para confirmar la presencia de biopelícula en la superficie del ánodo, se realizaron análisis SEM del ánodo antes de la operación de la CCM, al final de la fase exponencial del crecimiento de *B. subtilis* BSC.2 (~ 60 horas) y al final de la fase estacionaria (~ 70 horas). Los resultados se presentan en las Figuras 4.8a, 4.8b y 4.8c. La Figura 4.8b muestra la formación de una biopelícula densa, las bacterias se agruparon tal vez por la suficiencia de nutrientes absorbidos en el ánodo y por la disponibilidad del ánodo como un aceptor de electrones. Por otro lado, la Figura 4.8c muestra que al final de la fase estacionaria la biopelícula es menos densa, puede atribuirse a la pérdida de biomasa porque en esta etapa el sustrato se ha agotado.

Flemming y Wingender (2010) mencionan que algunas biopelículas pueden funcionar como aceptores o donadores de electrones. En estas las proteínas permiten la formación de nanocables y mejoran la producción de enzimas y metabolitos secundarios con actividad redox (Zhang et al., 2015; Berenjian et al., 2013).

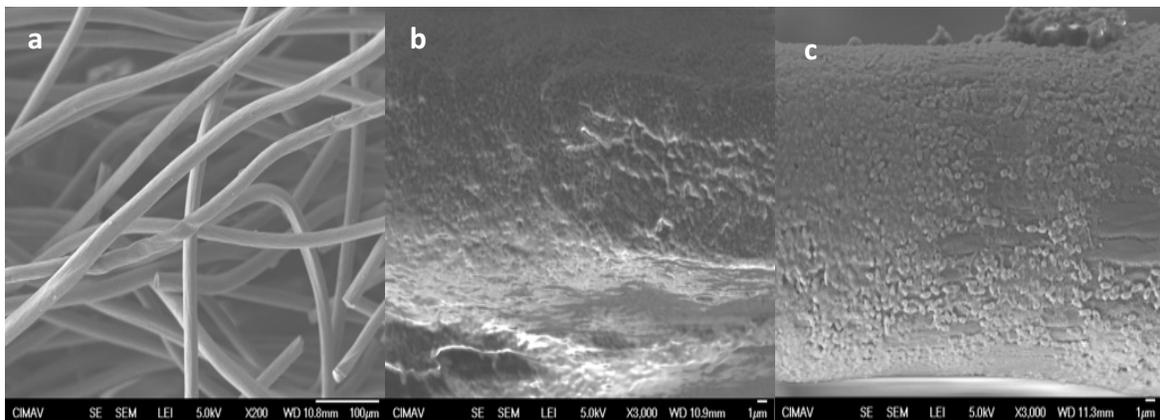


Figura 4.8. Imágenes SEM de ánodo de fieltro de grafito: a) Antes de la operación de la celda. b) Después de 61 horas de operación y c) 70 horas de operación.

4.6.1 Cinética de la colonización de *B. Subtilis* BSC-2 sobre el ánodo

La población de bacterias adheridas al ánodo presentó adhesión eficiente, es decir se formó una biopelícula que es esencial para el funcionamiento de una CCM. La formación inicial de la biopelícula ocurrió a partir de la primera hora de operación de la CCM. La Figura 4.9 muestra la tendencia lineal de la formación de la biopelícula con una tasa de crecimiento específico de 0.07/h ($R^2=96\%$, $p\leq 0.05$) (Tabla 4.8). Esta tendencia es correspondiente a la ley exponencial o al conocido modelo maltusiano (Ec. 2.17). Diversos autores han encontrado un comportamiento similar con bacterias de los géneros de *Geobacter* en las CCM's, reportan tasas de crecimiento específico de entre 0.4 y 0.96/día en su fase de crecimiento exponencial (Bond y Lovley, 2003; Parot et al., 2008). Sin embargo, el hecho de que la población aumente no significa que se genere un aumento en la de corriente, pues Kang et al. (2012) demostraron que con especies de *Pseudomonas* la corriente disminuyó al aumentar la densidad celular a 10^8 UFC/mL. Esto pudo deberse a la disminución del área superficial efectiva del electrodo ya que con el aumento de la población se cubre una superficie más amplia o por la falta de nutriente los microorganismos se mantienen en un estado de latencia (metabólicamente inactivos) dentro de la matriz de exopolisacárido.

Tabla 4.8. Análisis de varianza de la regresión de la población de bacterias adheridas sobre el ánodo.

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P-Valor
Regresión	1	1534509658	1534509658	319.35	<0.0001
Error	17	81687162	4805127		
Total	18	1616196821			

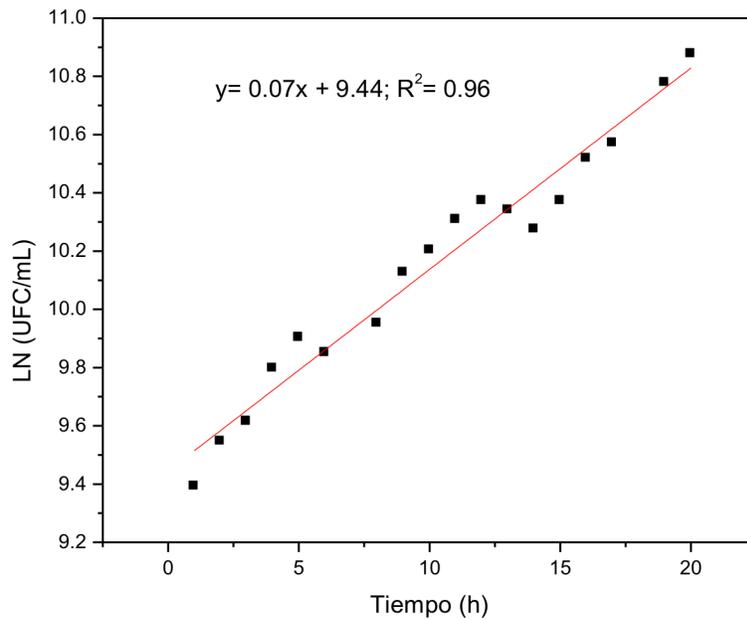


Figura 4.9. Tendencia de la población de bacterias adheridas al ánodo.

4.7 Análisis FTIR de biopelícula de *B. subtilis* adherida sobre el ánodo

Diversos trabajos mencionan que las biopelículas son comunidades microbianas, donde las células microbianas se adhieren a las superficies como microcolonias rodeadas por una matriz de EPS. Para caracterizar las fracciones de EPS de las biopelículas se ha utilizado la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) (Barannitharan et al., 2015; Freitas et al, 2009). Los espectros FT-IR de los EPS asociados a *B. subtilis* BSC-2, producidos a la primera hora y 60 horas después de la operación se muestran en la Figura 4.10.

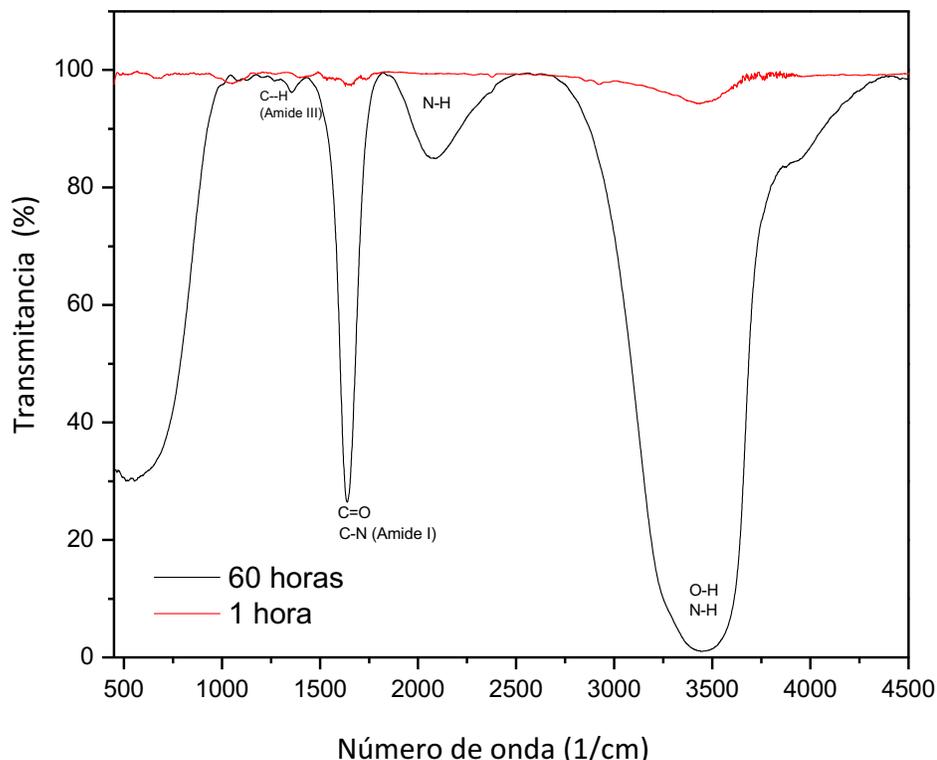


Figura 4.10. Espectros IR de biopelícula sobre el ánodo a la primera hora y 60 horas después de la operación de la CCM.

Los dos FT-IR revelan las diferencias en cuanto a la formación de la biopelícula a la primera y 60 horas después de la operación de la CCM. Una hora después de la operación, el espectro de FTIR indica el inicio de la formación de la biopelícula sobre el ánodo y a las 60 h la formación de la biopelícula fue abundante. Para este tiempo el espectro FTIR de la biopelícula elucidó la presencia de biomoléculas. Éstas fueron bandas representantes de los grupos funcionales derivados de proteínas (1700-1500/cm), polisacáridos y ácidos nucleicos (1300-900/cm), así como aminoácidos (2930-2860/cm) (Lembre et al., 2012), que indica la presencia de estas biomoléculas.

La banda ancha observada entre 3500 a 3100/cm se atribuye a los grupos O-H y N-H, que podrían formar enlaces de hidrógeno con el grupo carbonilo del enlace peptídico en las proteínas (Karnnet et al., 2005) La banda de 2066.81/cm puede

atribuirse al grupo funcional de aminoácidos por la tensión del enlace N-H (Nanda et al., 2007). La banda observada a 1630.70/cm corresponde a la estructura de amidas primarias (1630-1655/cm) asociada con la vibración de tensión del enlace C=O correspondientes a las cadenas polipeptídicas. Además, se presentan absorciones débiles de proteína de amida III en la banda de 1355.05/cm. Lo anterior demuestra la presencia de una biopelícula sobre la superficie del electrodo.

4.8 Análisis voltamperométrico

El comportamiento electroquímico de la CCM se evaluó in situ a través de la voltamperometría cíclica (CV). Ésta proporciona evidencia directa para la detección de compuestos redox y permite elucidar las reacciones que ocurren en la superficie del electrodo (Nimje et al., 2011). En primer lugar, se obtuvo el voltamperograma del medio estéril fresco, del cual no se detectó ninguna sustancia con actividad electroquímica (Figura 4.11a). No obstante, durante las fases de crecimiento del microorganismo se observaron cambios. Es decir, en la fase lag o fase del crecimiento exponencial (40 horas) se observaron picos redox tanto en el medio libre de células (sobrenadante) como en el medio con células (Figura 4.11b). Además, desde las 60 horas se detectó la aparición de nuevos picos redox, que a las 88 horas se observaron con mayor intensidad (Figura 4.11 c y d). Esto indica que *B. subtilis* BSC-2 puede presentar dos mecanismos de transferencia de electrones directa o indirecta (producción de compuestos con actividad electroquímica).

A las 40 horas se observaron dos picos redox -0.10 y 0.18 V. El pico redox de -0.10 V que se observó a las 40 horas, pueden ser debido a la oxidación catalítica del sustrato por la biopelícula con transferencia heterogénea de electrones al electrodo. En CCM's con especies de *Geobacter* y *Shewanella*, Roy et al. (2014) reportan que los picos redox pertenecientes a la región de potenciales entre -0.8 y 0 V vs Ag/AgCl están asociados a la actividad electroquímica de las flavoproteínas. Estas proteínas están relacionadas con la cadena de transporte de electrones en las bacterias. Puede decirse que en este tiempo la actividad catalítica de *B. subtilis* BSC-2 está dominada por la transferencia directa de electrones.

El pico redox de 0.16 V puede atribuirse a la producción de algún metabolito ya que diversos estudios han reportado que, desde la biopelícula los microorganismos también pueden producir ácidos húmicos, surfactantes o enzimas catabólicas (Chen et al., 2015; Berenjian et al., 2013).

Las biopelículas microbianas ante la escasez de la fuente de carbono van desarrollando EPS para asegurar su sobrevivencia. Ésta crece con el tiempo y se hace más compleja. Por esta razón, en las 64 y 88 horas los picos redox son más pronunciados. A las 60 y 88 horas los potenciales negativos en la biomasa de -0.44 y -0.49, respectivamente pueden atribuirse a las flavoproteínas (Roy et al., 2014). Estudios realizados en CCM's inoculadas con *Shewanella sp.* se presentó un comportamiento similar. En un medio limitado en fuente de carbono, cuando el potencial fue -0.3 a -0.4 V hubo aumento en la producción de riboflavinas. Las riboflavinas participan en la transferencia extracelular de electrones (Roy et al., 2012; Roy et al., 2014). Esto indica que a las 88 horas el mecanismo de transferencia de electrones es dominado por la transferencia extracelular de electrones. Además, la concentración de sacarosa para este tiempo disminuyó en un 85 % y posiblemente debido a la falta de fuente de carbono hubo un aumento en la producción de riboflavinas.

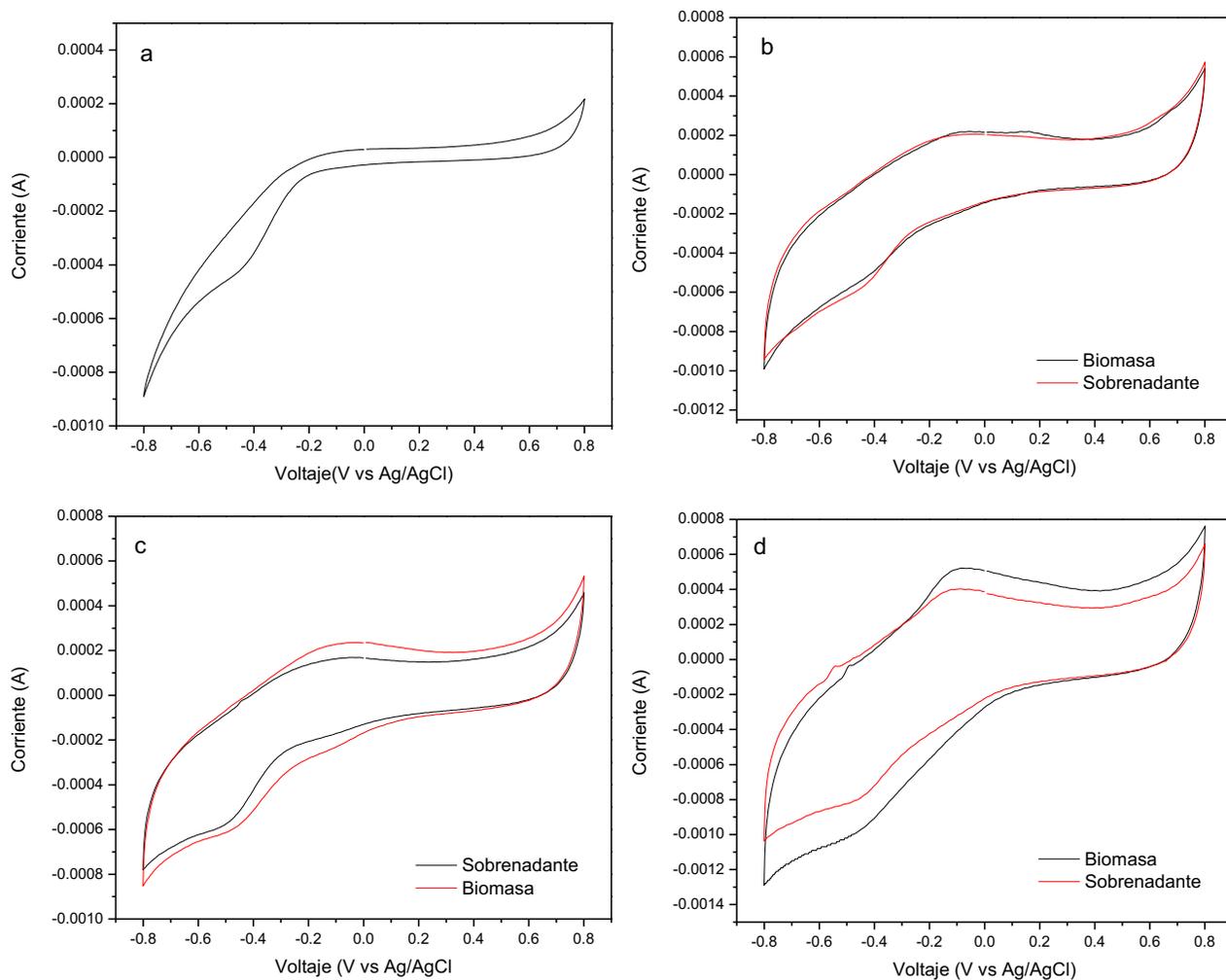


Figura 4.11. Voltamperograma cíclico de *B. subtilis* BSC-2. a) Medio sintético estéril fresco antes de la inoculación. Medio anódico con biomasa suspendida y sobrenadante b) a las 40 horas, c) 64 horas y d) 88 horas de inicio de experimento.

4.9 Remoción de la DQO y eficiencia coulombica en dos configuraciones de CCM

La concentración de DQO en el anólito de la CCM-U y la CCM-D fue medida en función del tiempo de operación. El ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la remoción de la DQO y la EC debido al tipo de configuración.

La remoción de DQO fue mayor en la CCM-D con 79.4% con una EC de 30%. Mientras en la CCM-U fue de 58% con una EC de 9% (Figura 4.12). La baja eficiencia en la CCM-U puede atribuirse a la difusión de oxígeno a la cámara anódica. Esto causa que los electrones generados por el metabolismo bacteriano pueden ser usados para otros procesos de fermentación, causando inactivación electroactiva en los microorganismos y esto provoca una disminución en la EC y la remoción de DQO. Tao et al. (2015) menciona que los procesos de remoción de DQO y la EC siguen diferentes mecanismos, que varían con la configuración de la CCM.

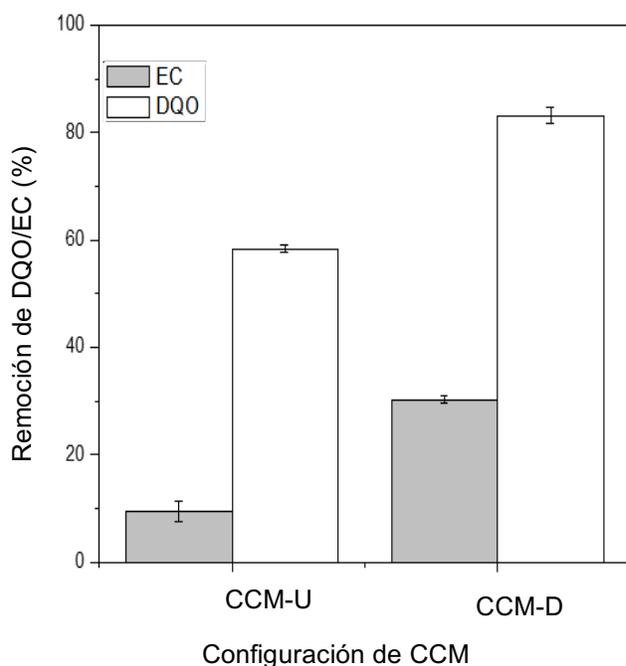


Figura 4.12. Remoción de DQO y eficiencia coulombica (EC) para la CCM-U y CCM-D.

4.10 Generación de electricidad en las CCM's

La Figura 4.13 muestra el voltaje contra el tiempo para la CCM-U y la CCM-D sobre tres ciclos de operación. La generación de voltaje desde las primeras horas del día uno aumento en forma abrupta, lo que indica el crecimiento de una biopelícula sobre el ánodo. Sin embargo, al quinto día de operación el voltaje disminuyó en ambas celdas (CCM-U y CCM-D). No obstante, tras la adición del agua residual sintética

los voltajes de salida de las CCM's comenzaron a aumentar notablemente y el voltaje estable alcanzado en el segundo ciclo fue de 470 y 505 mV para la CCM-U y la CCM-D, respectivamente. Después de la segunda adición de agua residual sintética el voltaje se mantuvo estable durante 57 días para la CCM-U y 47 días para la CCM-D. El máximo voltaje de salida de la CCM-U y la CCM-D para el tercer ciclo fue de 480 y 520 mV, respectivamente. El voltaje generado por la CCM-U fue un 10 % menor que el generado por la CCM-D. Comparado con otras CCM de una cámara reportadas en la literatura, el voltaje máximo de la CCM-U fue similar al reportado por Zhang et al. (2018).

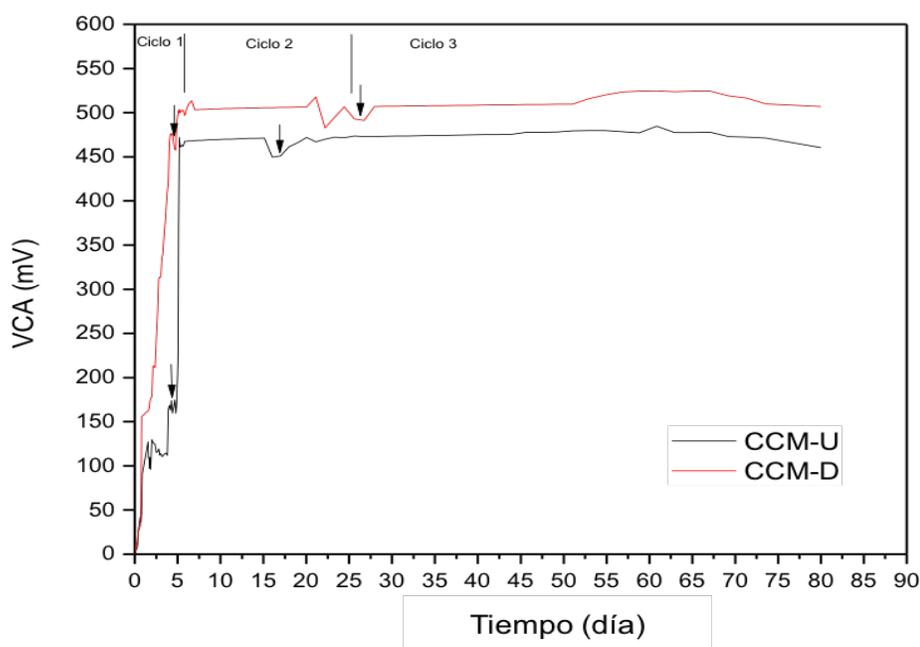


Figura 4.13. Voltaje a circuito abierto en dos configuraciones de celda (CCM-U y CCM-D). Flechas indican la adición de sustrato fresco.

4.11 Comportamiento del pH y la conductividad eléctrica

El pH de las aguas residuales en la cámara anódica y del tampón fosfato de la cámara catódica influye en la eficiencia de la CCM. También modifican la conductividad eléctrica en el electrolito y afecta el flujo de protones y electrones. Para la CCM-D la figura 4.14a muestra que el máximo cambio del pH en el anolito fue de 0.2 y para el catolito fue de 0.4 unidades. El cambio en el pH fue mayor al

inicio de la operación de la CCM, posiblemente se debió a la alta actividad metabólica de *B. subtilis* BSC-2 porque a las 20 horas los exoelectrógenos estaban en la parte intermedia de la fase exponencial. Esto provocó una baja transmisión de protones a través de la MIP en comparación con su producción (Mansoorian et al., 2013). En la CCM-U el pH no fue estable, ya que éste disminuyó en 1.4 unidades (Figura 4.14a). Este comportamiento puede ser atribuido a la difusión de oxígeno a la cámara anódica que causó un proceso de fermentación mediante el cual se generaron metabolitos que acidificaron el medio.

Kato-Marcus et al. (2007) demostraron que la conductividad eléctrica está relacionada con la producción de biomasa. Alta conductividad (1-100 S/m) promueven la actividad metabólica de las bacterias electrogénicas. Sin embargo, el aumento en la biomasa afecta el potencial del electrodo causando una disminución de la densidad de corriente. En la Figura 4.14b para la CCM-D se muestra que en la cámara anódica la conductividad eléctrica aumentó en 0.7 unidades, mientras en la cámara catódica en 0.3 unidades. Este comportamiento puede atribuirse a que en la cámara anódica los microorganismos generan metabolitos o mediadores de electrones que aumentan la conductividad eléctrica. Esto es benéfico para el rendimiento de la CCM-D ya que la conductividad eléctrica además de promover el transporte de electrones a través de la biopelícula, también puede disminuir la resistencia a la transferencia de carga (Malvankar et al., 2012). Por otra parte, en la CCM-U la conductividad eléctrica se mantuvo estable, esto pudo deberse a la disminución del pH causado por la difusión de oxígeno a la cámara anódica, que posiblemente provocó la producción de metabolitos ácidos que tal vez no son transportadores de electrones.

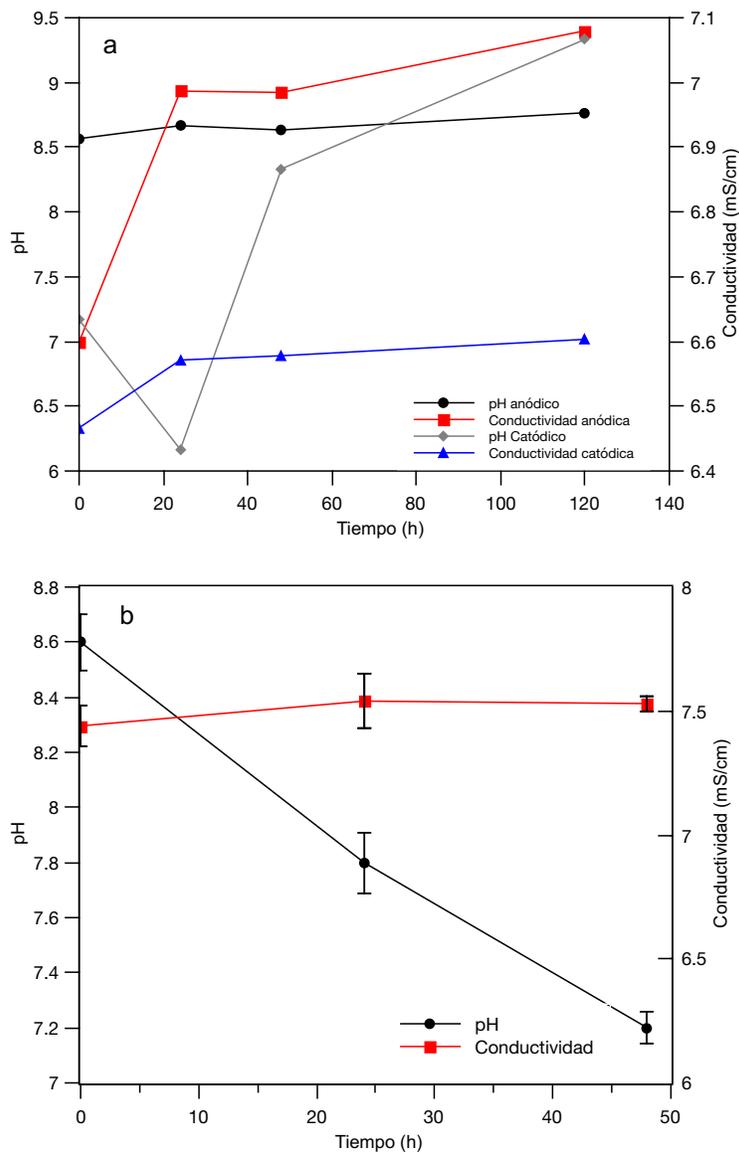


Figura 4.14. a) Comportamiento de la conductividad eléctrica y el pH en la CCM-D. b) Comportamiento de la conductividad eléctrica y el pH en la CCM-U.

4.12 Comparación de la resistencia interna en la CCM-U y en la CCM-D

Una curva de polarización describe el voltaje como función de la corriente y es una herramienta completa para analizar y caracterizar la CCM. Mediante la curva de polarización la resistencia interna (R_{int}) de la celda puede ser estimada. La resistencia externa (R_{ext}) es un parámetro importante, es bien sabido que la transferencia máxima de potencia se puede lograr cuando la resistencia externa se

combina con la resistencia interna de un sistema, que se conoce como la ley de Jacobi. Por lo tanto, la selección de una R_{ext} correspondiente a la R_{int} mejorará el rendimiento de una CCM. Las Figuras 4.15a y b muestran las resistencias internas para la celda CCM-U y CCM-D. La R_{int} en la CCM-U fue de 491.66 Ω , mientras en la CCM-D fue de 483.08 Ω . Las resistencias internas encontradas fueron cercanas a la reportada por Luo et al. (2015) que fue de 583.7 Ω . Ellos lograron obtener la resistencia interna de una CCM mediante el uso del electrógeno *Kocuria rhizophila*. En este estudio, con la reducción de la distancia de los electrodos a 6mm y sin aplicar ningún tratamiento al electrógeno *B. subtilis*, se logró obtener una baja resistencia interna en la CCM's.

Aunque la R_{int} en la CCM-U fue baja, la difusión de oxígeno a la cámara anódica puede causar inestabilidad operativa. Por otro lado, Ren et al. (2011) mencionan que la R_{int} puede cambiar debido al desarrollo del sistema biológico o a la configuración de la CCM, por ello es un parámetro valioso para evaluar el impacto en los cambios de operación o configuración de celda.

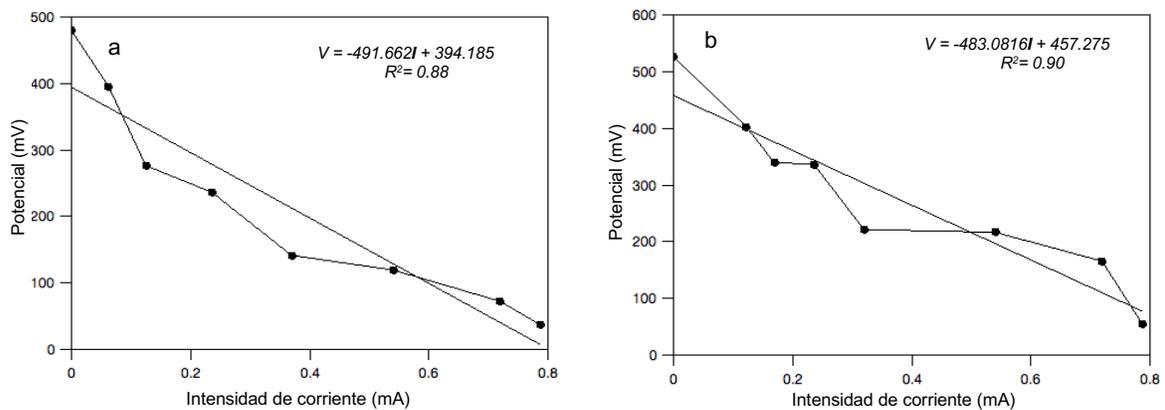


Figura 4.15. Curva de polarización y ajuste para cálculo de resistencia interna en: a) CCM-U y b) CCM-D.

V. CONCLUSIONES

1. Las aguas residuales de la industria azucarera contiene una especie de bacteria clasificada como *B. subtilis* con características de bacilos cortos (1.4-1.6 μm) Gram-positivos que crecen en un rango de pH de 5 hasta 8.
2. A pH de 7 y tiempo de retención hidráulica de 20 horas la remoción de la DQO de agua residual sintética es de un 80 % en biorreactor batch.
3. Con base en la aplicación de la MSR, se desarrolló un modelo cuadrático mediante el cual se logró determinar la máxima potencia (405 mW/m^2) de la CCM. La densidad de potencia se vio significativamente influenciada por el pH y la resistencia externa. Con el modelo se obtuvieron las condiciones óptimas de pH y R_{ext} , estas fueron: pH anódico de 8.6 y R_{ext} de 220 Ω . Además, bajo estas condiciones la cinética de crecimiento de *B. subtilis* BSC-2 sigue la tendencia del modelo de Gompertz y la cinética de consumo de sustrato sigue el modelo de primer orden.
4. Las técnicas SEM y FTIR confirman que *B. subtilis* BSC-2 genera una biopelícula sobre el ánodo de fieltro de grafito, ésta es esencial para el funcionamiento de la CCM.
5. La voltamperometría cíclica indicó la presencia de compuestos redox excretados por la bacteria, que se generaron desde la matriz de la biopelícula adherida al ánodo. Debido a que *B. subtilis* no presenta filamentos extracelulares conductivos la transferencia de electrones es a través de la producción de compuestos endógenos con transferencia extracelular de electrones.
6. Los sistemas de celdas de combustible microbianas de una cámara y de doble cámara pueden remover la DQO y producir electricidad medida en eficiencia coulombica. Sin embargo, hubo diferencias significativas en la remoción de DQO y la eficiencia coulombica entre los dos sistemas, ya que estas dos variables variaron considerablemente. Y aunque las resistencias internas fueron similares, la CCM-U fue menos eficiente que la CCM-D.

VI. Recomendaciones y perspectivas

1. Caracterizar los metabolitos de la cámara anódica producidos por *B. subtilis* BSC-2 y evaluar su actividad redox por voltamperometría cíclica.
2. Evaluar el efecto de otros sustratos orgánicos e inorgánicos con el uso de la cepa *B. subtilis* BSC-2 en la generación de energía.
3. Evaluar el proceso de la formación de la biopelícula de *B. subtilis* BSC-2 mediante el uso de modelos dinámicos con el fin de mejorar el rendimiento en las CCM's.

VII. REFERENCIAS

- Baranitharan, E., Khan, M. R., Prasad, D. M. R., Teo, W. F. A., Tan, G. Y. A., Jose, R. 2015. Effect of biofilm formation on the performance of microbial fuel cell for the treatment of palm oil mill effluent. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38, 15-24.
- Berenjian, A., Li-Cheng C. N., Mahanama, R., Talbot, A., Regtop, J. K., Dehghani, F. 2013. Effect of Biofilm Formation by *Bacillus subtilis natto* on Menaquinone-7 Biosynthesis. *Molecular Bioengineering.* 54, 371-378.
- Bhuvaneshwari, A., Navanietha, K. R., Berchmans, S., 2013. Metamorphosis of pathogen to electrigen at the electrode/electrolyte interface: direct electron transfer of *Staphylococcus aureus* leading to superior electrocatalytic activity. *Electro-chem Commun.* 34, 25-8.
- Biresselioglu, M. E., Yelkenci, T. 2016. Scrutinizing the causality relationships between prices, production and consumption of fossil fuels: A panel data approach. *Energy.* 102, 44-53.
- Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295, 483-485.
- Bond, D. R., Lovley, D. R., 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol.* 69, 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, 2186–2189.
- Borole, A. P., O'Neill, H., Tsouris, C., Cesar, S., 2008. A microbial fuel cell operating at low pH the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Biotechnol Lett.* 30, 1367-1372.
- Borole, A. P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z., Feng, Y., Kim, B. H. 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ Sci.* 4, 4813-4834.
- Bouguettoucha, A., Balannec, B. and Amrane, A. 2011. Unstructure models for lactic acid fermentation a review. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 3-12.
- Call, D., Logan, B. E. 2008. Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane, *Environ. Sci. Technol.* 42, 3401-3406.
- Cai, W. F., Geng, J. F., Pu, K. B., Ma, Q., Jing, D. W., Wang, Y. H., Chen, Q. Y., Liu, H. 2018. Investigation of a two-dimensional model on microbial fuel cell with different biofilm porosities and external resistances. *Chemical Engineering Journal.* 333, 572-582.
- Cancino, S. Y., Paredes, S. P. J. Gutierrez, T. J. A., Xiberta, B. J. 2016. The development of renewable energy resources in the State of Veracruz, Mexico. *Util Policy.* 39, 1-4.
- Carmona-Martinez A. A., Harnisch, F., Kuhlicke, U., Neu, T. R., Schroder, U. 2013. Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochem.* 93, 23-9.
- Chaudhuri, S.K., Lovley, D.R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229-1232.
- Chen, J., Deng, F., Hu, Y., Sun, J., Yang, Y. 2015. Antibacterial activity of graphene-modified anode on *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm in microbial fuel cell. *Journal of Power Sources.* 290 80-86.
- Chouler, J., and Di Lorenzo, M. 2015. Water quality monitoring in developing countries; can

- microbial fuel cells be the answer? *Biosensors*. 5, 450-470.
- CONAGUA. 2014. Programa Nacional Hídrico 2014-2018.
- Deng, L., Fang Bai, L., Zhou, S., Huang D. & Jin Ren N. 2010. A study of electron-shuttle mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology* 55, 99–104.
- Dominguez, B. X., Sevda, S., Vanbroekhoven, K., Pant, D. 2012. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. *Chem Soc Rev*. 41, 7228-7246.
- Dubios, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 28, 350-356.
- Dumas, M., Rising, J., Urpelainen, J. 2016. Political competition and renewable energy transitions over long time horizons: A dynamic approach. *Ecological Economics*. 124, 175-184.
- Elakkiya, E., Matheswaran, M., 2013. Comparasion of anodic metabolisms in bioelectricity production during treatment of dairy wastewater in Microbial Fuel Cell. *Bioresour Technol*. 136, 407-412.
- Fedorovich, V., Knighton, M.C., Pagaling, E., Ward, F.B., Free, A., Goryanin, I., 2009. Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolate from a Microbial Fuel Cell Appl. *Environ. Microbiol*. 75 (23), 7326-7334.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8(9), 623-633.
- Freitas, F., Alves, V., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou L., Oliveira R., Reis, M. A. 2009. Characterization of an extracellular polymeric polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresour Technol* 100, 859–865.
- Gil, M. M., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M. 2011. On the use of the Gompertz model to predict microbial thermal inactivation under isothermal and non- isothermal conditions. *Food Eng. Rev*. 3, 17–25.
- Gude, V. G. 2016. Microbial fuel cells for wastewater treatment and energy generation. In Scott, K. And Hao, Y. E. 2016. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells Fundamentals and Applications*. 1 st Edition. Woodhead Publishing Elsevier. P. 247-285.
- Guo, X., Zhan, Y., Chen, C., Zhao, L., Guo, S. 2015. The influence of microbial synergistic and antagonistic effects on the performance of refinery wastewater microbial fuel cells, *J. Power Sources*. 251, 229–236.
- Hamawand, I. 2015. Anaerobic digestion process and bio-energy in meat industry: A review and a potential. *Renew Sustain Energy Rev*. 44, 37–51.
- Hamelers, H. V. M., Heijne, A., Stein, N., Rozendal, R. A., Buisman, C. J. N. 2011. Butler-Volmer-Monod model for describing bio-anode polarization curves. *Bioresource Technology*. 102: 381-387.
- Han, T. H., Cho, M. H., Lee, J. 2014. Indole Oxidation Enhances Electricity Production in an *E. coli*-catalyzed Microbial Fuel Cell. *Biotechnol and Bioprocess Eng*. 19, 126-131.
- He, C. S., Mu, Z. X., Yang, H. Y., Wang, Y. Z. Mu, Y., Yu, H. Q. 2015. Electron acceptors for energy generation in microbial fuel cells fed with wastewaters: A mini-review. *Chemosphere*. 140, 12-17.
- He, H., Yuan, S. J., Tong, Z. H., Huang, Y. X., Lin, Z. Q., Yu, H. Q., 2014. Characterization of a new electrochemically active bacterium, *Lysinibacillus sphaericus* D-8, isolated

- with a WO₃ nanocluster probe. *Process Biochem.* 49, 290-4.
- He, S. C., Mu, Z. X., Yang, H. Y., Wang, Y. Z., Mu, Y., Yu, H. Q. 2015. Electron acceptors for energy generation in microbial fuel cells fed with wastewaters: A mini-review. *Chemosphere.* 140, 12-17.
- Holmes, D. E., Bond, D. R., Lovley, D. R. 2004a. Electron transfer by *desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1234-1237.
- Holmes, D. E., Nicoll, J. S., Bond, D. R., Lovley, D. R. 2004b. 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, 6023-6030.
- Jayapriya, J., Ramamurthy, V., 2012. Use of non-native phenazines to improve the performance of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2474 catalysed fuel cells. *Bioresour Technol.* 124, 23-28.
- Jayasinghe, N., Franks, A., Nevin, K. P., Mahadevan, R. 2014. Metabolic modeling of spatial heterogeneity of biofilms in microbial fuel cells reveals substrate limitations in electrical current generation. *Biotechnol. J.* 9, 1350–1361
- Jia, Q., Wei, L., Han, H., Shen, J. 2014. Factors that influence the performance of two-chamber microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy.* 39, 13687-13693.
- Jung, S., Regan, M. J. 2011. Influence of external resistance on electrogenesis, methanogenesis, and anode prokaryotic communities in microbial fuel cells. *Applied and environmental microbiology.* 77, 564-571.
- Kang, J., Kim, T., Tak, Y., Lee, J. H., Yoon, J. 2012. Cyclic voltammetry for monitoring bacterial attachment and biofilm formation. *J Indo Eng Chem.* 18, 800-807.
- Karnnet, S., Potiyaraj, P., Pimpan, V. 2005. Preparation and properties of biodegradable stearic acid-modified gelatin films. *Polym Degrad Stab* 90(1), 106–110.
- Kashyap, D., Dwivedi, P. K., Pandey, J. K., Kim, Y. H., Kim, G. M., Sharma, A., Goel, S. 2014. Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review. *Int. J. Hydrogen Energy.* 39, 20159–20170.
- Kato-Marcus, A., Torres, C. I., Rittmann B. E. 2007. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioengineering* 98 (6), 1171-82.
- Kazemi, S., Barazandegan, M., Mohseni, M., Fatih, K. 2016. Systematic Study of separators in Air-breathing flat-plate microbial fuel cells-Part 2: Numerical modeling. *Energies* 9, 79.
- Kim, N., Choi, Y., Jung, S., Kim, S. 2000. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnol Bioeng.* 70:109–14.
- Kimura, Z. I., Chung, K. M., Itoh, H., Hiraishi, A., Okabe, S. 2014. *Raoultella electrica* sp. isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64, 1384-8.
- Kouzuma, A., Oba, H., Tajima, N., Hashimoto, K., Watanabe K. 2014. Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiology.* 14, 190.
- Kumar, S. (2015): *Textbook of Microbiology for Bsc Nursing.* 1ra Ed. Jaypee Brother

- Medical Publishers. New Delhi, India. 314 pp.
- Kumar, R., Singh, L., Wahid, Z. A., and Din, M. F. M. 2015. Exoelectrogens in microbial fuel cells toward bioelectricity generation: a review. *Int. J. Energy Res.* 39, 1048–1067.
- Larminie, J., Dicks, A. 2013. Proton Exchange Membrane Fuel Cells. in: *Fuel Cell Systems Explained*, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 67-119.
- Le, L. J., Bahloul, H., Serino, S., Jobin, M., Schmitt, P. 2015. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiology.* 46, 314-321.
- Lefebvre, O., Tan, Z., Shen, Y., How, Y. N. 2013. Optimization of a microbial fuel cell for wastewater treatment using recycled scrap metals as a cost-effective cathode material. *Bioresour Technol.* 127, 158-164.
- Lembre, P., Lorentz, C., Martino, D. 2012. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. In the *Complex World of Polysaccharides*. InTech. 648 pps. doi: 10.5772/2947.
- Liu, G., Zhou, Y., Luo, H., Cheng, X., Zhang, R., Teng, W. 2015. A comparative evaluation of different types of microbial electrolysis desalination cells for malic acid production. *Bioresour Technol.* 198, 87-93.
- Liu, H., Chen, N., Feng, C., Tong, S., Li, R. 2017. Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bio-electrochemical denitrification reactor. *Bioresour Technology.* 232, 344-353.
- Liu, H., Logan, B. E. 2004. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane, *Environ. Sci. Technol.* 38, 4040-4046.
- Liu, M., Yuan, Y., Zhang, X. L., Zhuang, L., Zhou, S. G., Ni, J. R. 2010. Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium sp.* strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 101 (6), 1807-1811.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R. A., Schrorder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181-5192.
- Logan, B., E., 2008. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons Inc. New Jersey, USA. 216 p.
- Logan, B.E and Regan J.M. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, *Trends Microbiol.* 14, 512–518.
- Logan, B.E., Rabaey, K., 2012. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science* 337, 686–690.
- Luo, J., Li, M., Zhou, M., Hu, Y., 2015. Characterization of a novel strain phylogenetically related to *Kocuria rhizophila* and its chemical modification to improve performance of microbial fuel cells. *Biosens Bioelectron.* 69, 113-120.
- Luo, J., Yang, j., He, H., Jin, Ti., Zhou, Li., Wang, M., Zhou, M. 2013. A new wlvcreochemically active bacterium phylogenetically related to *Tolomonas osonensis* and power performance in MFCs. *Bioresour technol.* 139, 141-148.
- Lyon, D. Y., Buret, F., Vogel, T. M., Monier, J. M. 2010). Is resistance futile? Changing external resistance does not improve microbial fuel cell performance. *Bioelectrochemistry.* 78, 2–7.

- Madani, S., Gheshlaghi, R., Mahdavi M, A., Sobhani, M., Elkamel, A., 2015. Optimization of the performance of a double-chamber microbial fuel cell through factorial design of experiments and response surface methodology. *Fuel* 150, 434–440.
- Madigan M, Martinko M, Stahl Ay Clark D. 2012. Brock Biology of microorganisms. 13a. Edición. Pearson Higher education. España. p 1152.
- Malvankar N. S., Lau, J., Nevin, K. P., Franks, A. E., Tuominen, M. T., Lovley, D. R. 2012. Electrical Conductivity in a Mixed-Species Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (16), 5967-71.
- Mansoorian, H. J., Mahvi, A. H., Jafari, A. J., Amin, M. M., Rajabizadeh, A., Khanjani, N. 2013. Bioelectricity generation using two chamber microbial fuel cell treating wastewater from food processing. *Enzyme and Microbial Technology*. 52, 352-357.
- Martínez-Conesa, E. J., Ortiz-Martínez, V. M., Salar-García, M. J., Delos Rios, A. P., Hernández-Fernández, F. J., Lozano, L. J., Godínez, C. 2017. A Box-Behnken design-based model for predicting power performance in microbial fuel cells using wastewater. – *Chem. Eng. Commun.* 204, 97-104.
- Martinucci, E., Pizza, F., Perrino, D., Colombo, A., Trasatti, S. P. M., Barnabeu, A. L., Liberale, A., Cristiani, P. 2015. Energy balance and microbial fuel cells experimentation at wastewater treatment plant Milano-Nosedo. *Int. J. Hydrogen Energy*. 40, 14683-14689.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. 2016. Response Surface Methodology. 4th ed. – John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- Mazurenko, I., Etienne, M., Kohring, G. W., Lapicque, F., Walcarius, A. 2016. Enzymatic bioreactor for simultaneous electrosynthesis and energy production. *Electrochimica Acta*.
- Meneses, J. A., Díaz, C. R., Velásquez, A. H. I., Cárdenas, C. D. L., Parra, R., Ruiz, C. A. A. 2016. Sustainable Energy from agro-industrial wastewaters in Latin-America. *Renew Sustain Energy Rev.* 56, 1249-1262.
- Miroliaei, M. R., Samimi, A., Mohebbi-Kalhari, D., Khorram, M. 2015. Kinetics investigation of diversity cultures of *E. coli* and *Shewanella* sp., and their combined effect with mediator on MFC performance. – *J. Ind. Eng. Chem.* 25, 42-50.
- Nanda, P. k., Krishna, R. K., Nayak, P. L. 2007. Biodegradable polymers. XI. Spectral, thermal, morphological, and biodegradability properties of environment-friendly green plastics of soy protein modified with thiosemicarbazide. *J Appl Polym Sci* 103(5), 3134–3142.
- Nandy, A., Kumar, V., Kundu, P. P. 2016. Effect of electric impulse for improved energy generation in mediatorless dual chamber microbial fuel cell through electroevolution of *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics*. 79, 796-801.
- Nikhil, G. N., Venkata, S. G., Kumar, Y. D., Venkata, M. S. 2015. Closed circuitry operation influence on microbial electrofermentation: Proton/electron effluxes on electro-fuels productivity. *Bioresource technology*. 195, 37-45.
- Nimje, V. R., Chen, C. Y., Chen, C. C., Tsai, J. Y., Chen, H. R., Huang, Y. M., Jean, J. S., Chang, Y. F., Shih, R. C., 2011. Microbial fuel cell of *Enterobacter cloacae*: Effect of anodic pH microenvironment on current, power density, internal resistance and electrochemical losses. *Int. J. Hydrog. Energy*. 36 (17), 11093-11101.
- Nimje, V. R., Chen, C.Y., Chen, C. C., Jean, Jiin-Shuh, Reddy, A. S., Fan, C. W., Pan, K. Y., Liu, H. T., Chen, J. J., 2009. Stable and high energy generation by astrain of *bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *J. Power Sources* 190, 258–263.

- Okpokwasili, G. C., Nweke, C. O. 2005. Microbial growth and substrate utilization kinetics. *Afr. J. biotechnol.* 5, 305-317.
- Olyveira, G. M., Iost, R. M., Luz, R. A. S., & Crespilho, F. N. 2013. *Nanoenergy*. (F. L. de Souza & E. R. Leite, Eds.). Springer Berlin Heidelberg.
- Ortiz-Martínez, V.M.; Salar-García, M.J.; De Los Ríos, A.P.; Hernández-Fernández, F.J.; Egea, J.A.; Lozano, L.J. 2015. Developments in microbial fuel cell modeling. *Chem. Eng. J.* 2015, 271, 50–60.
- Pandey, P., Shinde, V. N. Deopurkar, R. L., Kale, S. P., Pantil, S. A., Pant, D. 2016. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy.* 168, 706-723.
- Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Kim, M., Chang, I.S., Park, Y.K., Chang, H.I., 2001. A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe.* 7, 297–306.
- Parot, S., Délia, M. L., Bergel, A. 2008. Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresource technology.* 99, 4809-4816.
- Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J., Lker U. & Hecker M. 2001. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology.* 183, 5617–5631.
- Pham, C. A., Jung, S. J., Phung, N.T., Lee, J., Chang, I.S., Kim, B.H., Yi, H., Chun, J., 2003. A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 129–134.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., El-Naggar, M. Y. 2014. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11, 12883-8.
- PLED. 2013. Plan Estatal de desarrollo (2013-2018). Estado, Tabasco, México.
- Pradeed, N. V., Vidyashree, K. G. Pooja, J., Anupama, S., Laskshmi, P. Arun Kumar, J. M., Ankitha, K. 2014. Treatment of Sugar Industry Wastewater in Anaerobic Downflow Stationary Fixed Film (DSFF) Reactor. *Sugar Tech.* 16(1), 9–14.
- Prasad, D., Arun, S., Murugesan, M., Padmanaban, S., Satyanarayanan, R.S., Berchmans, S., Yegnaraman, V., 2007. Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 22(11), 2604-2610.
- Qin, L. J., Han, K., Yueh, P. L., Hsueh, C. C., Chen, B. Y. 2016. Interactive influences of decolorized metabolites on electron-transfer characteristics of microbial fuel cells, *Biochem. Eng. J.* 109, 297–304.
- Rabaey K, Verstraete W. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23,291–8.
- Rago, L., Baeza, J. A., Guisasola, A., 2016. Increased performance of hydrogen production in microbial electrolysis cells under alkaline conditions. *Bioelectrochemistry.* 109, 57-62.
- Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour A., Oh, S. E. 2015. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering*

Journal. 54, 745–756.

- Recio-Garrido, D.; Perrier, M.; Tartakovsky, B. Modeling, optimization and control of bioelectrochemical systems. *Chem. Eng. J.* 2016, 289, 180–190.
- Reguera, K. D., McCarthy, T., Mehta, J. S., Nicoll, M. R., Tuominen, Lovley, D. R. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435, 1098–1101.
- Ren, Z.Y., Ramasamy, R. P., Cloud-Owen, S. R., Yan, H., Mench, M. M., Regan, J. M. 2011. Time-course correlation of biofilm properties and electrochemical performance in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 102(1), 416-421.
- Roy, J. N., Babanova, S., Garcia K. E., Cornejo, J., Ista, L. K., Atanassov, P. 2014. J.N. Catalytic biofilm formation by *Shewanella Oneidensis* MR.1 and anode characterization by expanded uncertainty. *Electrochimica Acta.* 126, 3-10.
- Roy, J.N., Luckarift, H.R., Lau, C., Falase, A, Garcia, K.E., Ista, L.K., Chellamuthu, P., Ramasamy, R.P., Gadhamshetty, V, Wanger, G., Gorby, Y. A., Neals, K. H., Bretschger, O., Johnson, G.R., Atanassov, P. 2012. A study of the flavin response by *Shewanella* cultures in carbon-limited environments. *RSC Adv.* 2, 10020-10026.
- Ryan, C. P., Stewart, G., M., Espencer, N., Li, Y. 2016. Probabilistic analysis of climate change impacts on timber power pole networks. *Int J Electr power Energy Syst.* 78, 513-523.
- Sarabia, L. A., Ortiz, M. C. 2009. Response Surface Methodology. In *Comprehensive Chemometrics. Chemical and Biochemical Data Analysis*, Ed., S. D. Brown, R. Tauler, B. Walczak, Section 1.12, pp. 345-390, Elsevier.
- Sarioglu, M. C., Gökçek. O. B. 2016. Treatment of automotive industry wastewater using anaerobic batch reactors: The influence of substrate/inoculum and molasses/wastewater. *Process Safety and Environmental Protection* 102, 648-654.
- SEMARNT., 1996. NOM-001-SERMANAT-1996.Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas, de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- SCFI, 2012. NMX-AA-030/1-SCFI-2012. Análisis de agua-Medición de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. - Método de prueba- Parte 1- Método de refluo abierto.
- Schilirò, T., Tommasi, T., Armato, C., Hidalgo, D., Traversi, D., Bocchini, S., Gilli, G., Pirri, C.F. 2016. The study of electrochemically active planktonic microbes in microbial fuel cells in relation to different carbon-based anode materials. *Energy.* 106, 277-284.
- Sevda, S., Dominguez, B. X., De, W. H., Vanbroekhoven, K., Sreekrishnan, T.R., Pant, Deepak. 2014. *Biochemical Engineering Journal.* 90, 294-300
- Solano-Cornejo, M., Vidaurre-Ruiz, J. 2017. Aplicación de modelos cinéticos no estructurados en el modelamiento de la fermentación láctica de subproductos de pesca. *Scientia Agropecuaria.* 8(4), 367-375. .
- Srikanth, S., Venkata, M., S., 2012. Change in electrogenic activity of the microbial fuel cell (MFC) with the function of biocathode microenvironment as terminal electron accepting condition: influence on overpotentials and bioelectro kinetics. *Bioresour Technol.* 119, 241-251.
- Subba Rao, N. S. 1999. *Soil microorganisms and plant/ Soil Microbiology.* 4ta edition. Science publishers, Inc. USA Pp 407.
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A., Bennett. R. W. 2012. Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. *Journal of AOAC International,* 95(2), 446-451.

- Tao, Q., Zhou, S., Luo, J., Yuan, J. 2015. Nutrient removal and electricity production from using microbial fuel cell technique. *Desalination*. 365, 92-98.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich A., Green P., Glidden S., Bunn S.E., Sullivan C.A., Liermann C.R., Davies P. M. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*. 467 (7315), 555–561.
- Walter, X. A., Forbes, S., Greenman, J. Leropoulos, L A. 2016. From single MFC to cascade configuration: The relationship between size, hydraulic retention time and power density. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 14, 74-79.
- Wielgosinski, G., Lechtanska, P., Namiecinska, O. 2017. Emission of some pollutants from biomass combustion in comparison to hard coal combustion. *Journal of Energy Institute*. 90,787-796.
- Wong, L. S. 2015. Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. *Journal of Cleaner production*. 93, 5-17.
- Wrighton, K. C., Agbo, P., Warnecke, F., Weber, K. A., Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Andersen, G. L., Coates, J. D., 2008. A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells. *ISME J*. 2, 1146-1156.
- Wu, Y-c., Wang, Z-j., Zhen, Y., Xiao, Y., Yang, Z-h., Zhao, F. 2014. Light intensity effects the performance of photo microbial fuel cells with *Desmodesmus* sp. A8 as cathodic microorganism. *Applied Energy*. 116, 86-90.
- Xia, C., Zhang, D., Pedrycz, W., Zhu, Y., Guo, Y. 2018. Models for microbial fuel cells: A critical review. – *J. Power Sources* 373, 119-131.
- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J. M., Logan, B.E., 2008. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX.1. *Environ. Sci. Technol.* 42(11), 4146-4151.
- Xu, S., Liu, H., 2011. New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. *J Appl Microbiol*. 111, 1108-15.
- Yang, W., Song, J., Higano, Y., Tang, J. 2016. Exploration and assessment of optimal policy combination for total water pollution control with a dynamic simulation model. *J Clean Prod*. 102, 342-352.
- Yao, S., He, Y. L., Song, B. Y., Li, X. Y. 2016. A two-dimensional, two-phase mass transport model for microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*. 212, 201-211.
- Yong, X. Y., Shi, D. Y., Chen, Y. L., Feng, J. Xu, L. Zhou, J., Wang, S. Y., Yong, Y. C., Sun, Y. M., Ouyang, P. K., Zheng, T. 2014. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells., *Bioresour. Technol*. 152, 220-224.
- Yuan, Y., Zhou, Shungui, Xu, N., Zhuang, L. 2011. Microorganism-immobilized carbon nanoparticle anode for microbial fuel cells based on direct electron transfer. *Appl Microbiol Biotechnol*. 89, 1629-1635.
- Zhang, H., Tian, Y., Wan, J., Zhao, P., 2015. Study of biofilm influenced corrosion on cast iron pipes in reclaimed water. *Applied Surface Science*, 357, 236-247
- Zhang, J., Yang, G., Zhou, S., Wang, Y., Yuan, Y., Zhuang, L., 2013. *Fontibacter ferrireducens* sp., an Fe (III)-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 925-9.
- Zhang, L. X., Zhou, S. G., Zhuang, L., Li, W. S., Zhang, J. T., Lu, N., Deng, L. F. 2008. Microbial fuel cell based on *klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochem Commun*. 10 (10), 1641-1643.

- Zhang, T., Cui, C., Chen, S., Ai, X., Yang, H., Shen, P., Peng, Z., 2006. A novel mediatorless microbial fuel cell based on direc. Chem. Commun. 4(21), 2257–2259.
- Zhang, X., He, W., Renb, L., Stager, J., Evans, P. J., Logan, B. E. 2015. COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells. Bioresour Technol.176, 23-31.
- Zhang, E., Yu, Q., Zhai, W., Wang, F., Scott, K. 2018. High tolerance of and removal of cefazolin sodium in single-chamber microbial fuel cells operation. Bioresour Technol. 249, 76-81.
- Zhao, F., Rahunen, N., Varcoe, J. R., Chandra, A., Avignone-Rossa, C., Thumser, A. E., Slade, R. C., 2008. Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. 42(13), 4971–4976..
- Zhu, Y., Liu, Y., Li, J., Shin, H-D., Du, G., Liu, L., Chen, J. 2015. An optimal glucose feeding strategy integrated with step-wise regulation of the dissolved oxygen level improves N-acetylglucosamine production in recombinant *Bacillus subtilis*. Bioresour Technol. 177, 387-392.
- Zuo, Y., Xing, D., Regan, J. M., Logan, B. E., 2008. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3130-3137.

ANEXOS

A. Preparación de curva de calibración para población de *B. subtilis* BSC-2 en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)

Este procedimiento permitió obtener la concentración de la población de *B. subtilis* BSC-2 al transformar los valores de absorbancia correspondientes a unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Para realizar la curva patrón de unidades formadoras de colonias se preparó un medio de caldo nutritivo para el crecimiento de *B. subtilis* BSC-2 (100 mL). Para obtener una solución concentrada de *B. subtilis* el crecimiento de la bacteria se mantuvo durante 24 horas. A partir de esta solución madre se preparó la curva de calibración como se muestra en la Tabla 1. En cada punto de la curva se midió la absorbancia por espectrofotómetro UV-Vis a 600 nm y después se realizó un sembrado en placa mediante el método de siembra por extensión en placa (Madigan et al., 2012). Después se graficó la absorbancia en función de las UFC/mL para obtener la ecuación $Abs = m \cdot (UFC/mL) + Abs_0$.

Tabla 1. Curva de calibración para unidades formadoras de colonias de *B. subtilis* BSC-2.

No. de tubo	Solución Madre (mL)	Agua (mL)
1	10	0
2	8	2
3	6	4
4	4	6
5	1	9
6	0.5	9.5
7	0	10

A continuación, se muestra la curva de calibración de unidades formadoras de colonias obtenida en este trabajo (Figura 1).

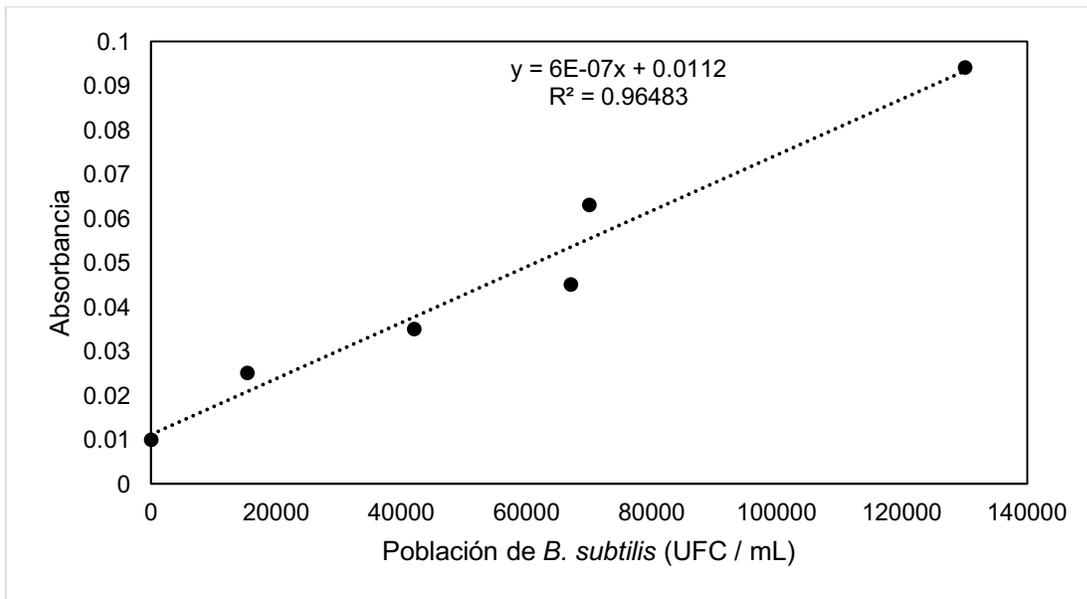


Figura 1. Curva de calibración para unidades formadoras de colonias de *B. subtilis* BSC-2.

B. Preparación de curva de calibración para DQO por método colorimétrico en reflujo cerrado (NMX-AA-030/1-SCFI-2012)

Material y equipo

Espectrofotómetro UV-Vis.

Bloque de calentamiento 150°C o estufa de secado.

Centrifuga.

Tubos de reacción de 10 mL.

Celda de cuarzo de 10mm para espectrofotómetro.

Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado.

Dicromato de potasio.

Sulfato de mercurio.

Hidrógenoftalato de potasio.

Curva de calibración

En primera instancia se procede a la preparación de los reactivos como se indica a continuación:

a) Solución de digestión 0.1 mol/L

Disolver en agua destilada $29.418 \pm 0,005$ g de $K_2Cr_2O_7$, previamente secado a 105°C durante 2 horas, adicionar 600 mL de agua destilada. Agregar cuidadosamente 160 mL de H_2SO_4 y aforar con agua destilada a 1 litro.

b) Reactivo H_2SO_4 concentrado de 1.84 g/mL.

c) Reactivo H_2SO_4 diluido (1.8 mol/L).

En un matraz que contenga 180 ± 2 mL de agua destilada, añadir cuidadosamente 20 ± 1 mL de H_2SO_4 concentrado.

d) Reactivo H_2SO_4 diluido (4 mol/L).

A un vaso que contenga aproximadamente 500 mL de agua, añadir cuidadosamente con agitación, 220 ± 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dejar enfriar y diluir a

1000 ± 10 mL y almacenar en un frasco de vidrio. La disolución es estable por doce meses.

e) Solución de HgSO₄ 1.35 mol/L.

Disolver 80 ± 1g de HgSO₄ grado reactivo en 200 ± 2 mL de ácido sulfúrico de 1.8 mol/L (c).

f) Solución de Ag₂SO₄ en ácido sulfúrico 0.0385 mol/L.

Disolver 24 ± 0.1 g de sulfato de plata en 2 L de ácido sulfúrico concentrado. Agitar la mezcla y dejar reposar una noche y después agite nuevamente con el fin de disolver todo el sulfato de plata. Almacenar en botella de vidrio ámbar.

g) Reactivos premezclados con intervalo de DQO de hasta 1000 mg/L.

Colocar 0,50 ± 0,01 mL de dicromato de potasio (a) en tubos de digestión individuales. Agregar con cuidado 0,20 ± 0,01 mL de disolución de sulfato de mercurio (II) (d), seguido de (2,50 ± 0,01) mL de sulfato de plata (e).

Preparación de la curva de calibración

Solución patrón de ftalato hidrógeno de potasio de 10 000 mg/L.

Disolver 4,251 ± 0,002 g de ftalato hidrógeno de potasio, previamente secado a 105 ± 5 °C durante dos horas, en aproximadamente 350 mL de agua destilada. Diluir con agua a 500 mL en un matraz volumétrico.

Almacenar la disolución en refrigeración de 2 °C a 8 °C y preparar nuevas disoluciones cada mes.

Una alternativa para el almacenamiento por refrigeración es añadir 2 mL de ácido sulfúrico diluido, antes de diluir a 500 mL, para inhibir la degradación microbiológica. Esta disolución, si es almacenada adecuadamente, en un frasco de vidrio ámbar y en refrigeración a 4 °C, puede durar al menos un año.

A partir de la solución madre de ftalato hidrógeno de potasio preparar las soluciones para la curva de calibración como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración para DQO por el método NMX-AA-030/1-SCFI-2012.

Solución madre (mL)	H ₂ SO ₄ de 4 mol/L (mL)	Volumen final (mL)	DQO mg/L
20	4	1 000	200
40	4	1 000	400
60	4	1 000	600
80	4	1 000	800
100	4	1 000	1000

Pipetear 2.00 mL de cada punto de la curva de calibración en el tubo de digestión (g). Llevar a cabo una determinación de blanco utilizando agua con cada lote de análisis.

Colocar el tubo en la placa de calentamiento.

Reflujar el contenido a 150 °C durante 2 h.

Retirar los tubos de la placa de calentamiento y dejar enfriar a 60 °C o menos. Mezclar el contenido invirtiendo cuidadosamente cada tubo varias veces mientras permanezcan calientes. Después, dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia.

Detección Espectrofotométrica

Si las muestras digeridas enfriadas son claras (ausencia de cualquier turbiedad visible), medir la absorbancia a 600 nm. Los resultados de absorbancia en función de la concentración (DQO, mg/L) para obtener la ecuación $Abs = m \cdot DQO + Abs_0$. En la Figura 2 se muestra la curva de calibración y la ecuación que se obtuvo en este trabajo.

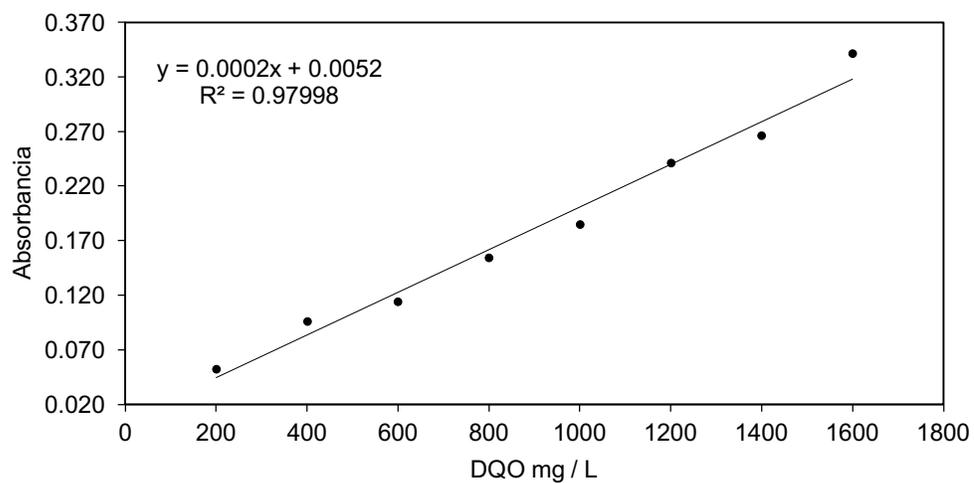


Figura 2. Curva de calibración para DQO por el método de la NMX-AA-030/1-SCFI-2012.

C. Preparación de curva de calibración de azúcares totales

Utilizar como patrón la solución de sacarosa 1:200 (1000 mg/L). Realizar las respectivas mezclas de reacción (por triplicado) indicadas en la tabla 1, teniendo en cuenta las siguientes indicaciones: en un tubo de reacción agregar el volumen respectivo de agua destilada y las diferentes cantidades de patrón. Posteriormente agregar 0.6 mL de fenol al 5 % (recién preparado). Después adicionar 3.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Agitar por un minuto, se debe tener cuidado al agitar por que la reacción es altamente exotérmica. Dejar enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad. El compuesto que se forma es estable por 36 horas. Leer absorbancia a 490 nm contra el blanco de reactivos, el cual debe prepararse al mismo tiempo que la curva de calibración y que corresponde al primer tubo de la Tabla 3. Elaborar gráfica de azúcares totales (mg/L o mg/mL en el eje X) Vs Abs_{promedio} (Eje Y). Obtener una línea recta con un coeficiente de correlación > 0.9.

Tabla 3. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración para azúcares solubles totales por el método de Dubois et al., (1956).

N. de tubo	Sol. Madre (mL)	Agua destilada (mL)	Fenol (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Conc. Sacarosa (mg/mL)
0	0	1	0.6	3.5	0
1	0.2	0.8	0.6	3.5	0.03
2	0.4	0.6	0.6	3.5	0.08
3	0.6	0.4	0.6	3.5	0.12
4	0.8	0.2	0.6	3.5	0.16
5	1	0	0.6	3.5	0.19

Para este análisis se obtuvo la curva de calibración y su ecuación que se muestran en la Figura 3.

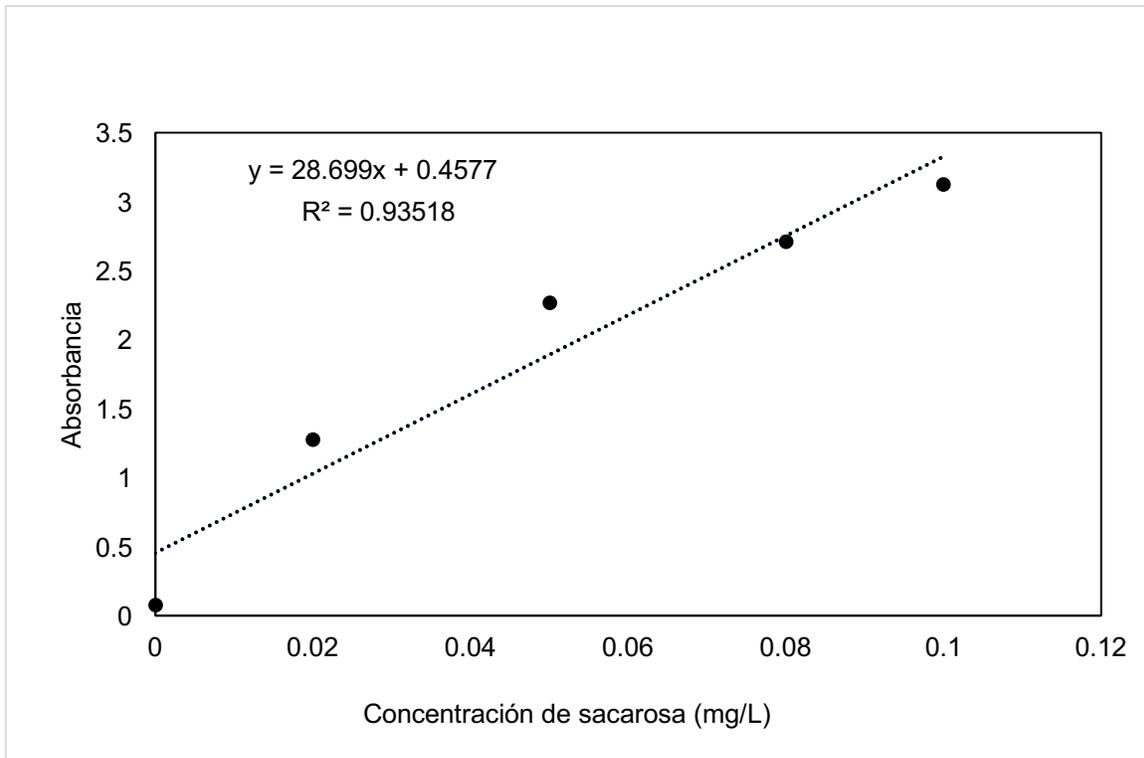


Figura 3. Curva de calibración para azúcares solubles totales por el método de Dubois et al. (1956).