

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



### “ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA GENERACIÓN ELÉCTRICA DE UN AGENTE BIOLÓGICO EN UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO.”

Tesis presentada por la Bachiller:

**Milagros Christiane, Rojas Gonzales**

Para optar el Título Profesional de

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

**Asesor:** Ing. Jaime Barreda

**AREQUIPA – PERÚ 2017**





*El principio de la sabiduría consiste en venerar al Señor,  
porque el Señor da la sabiduría de su boca nace el  
conocimiento y la inteligencia (Proverbios 1:7, 2:6)*



*Al Señor Dios Padre todopoderoso por todas las bendiciones, por darme coraje y sabiduría. A mi madre Giovanna que con su gran amor me acompañó en este sueño de ser Ingeniera, quien se esforzó por darme la mejor educación. A mi padre Víctor por su apoyo incondicional.*

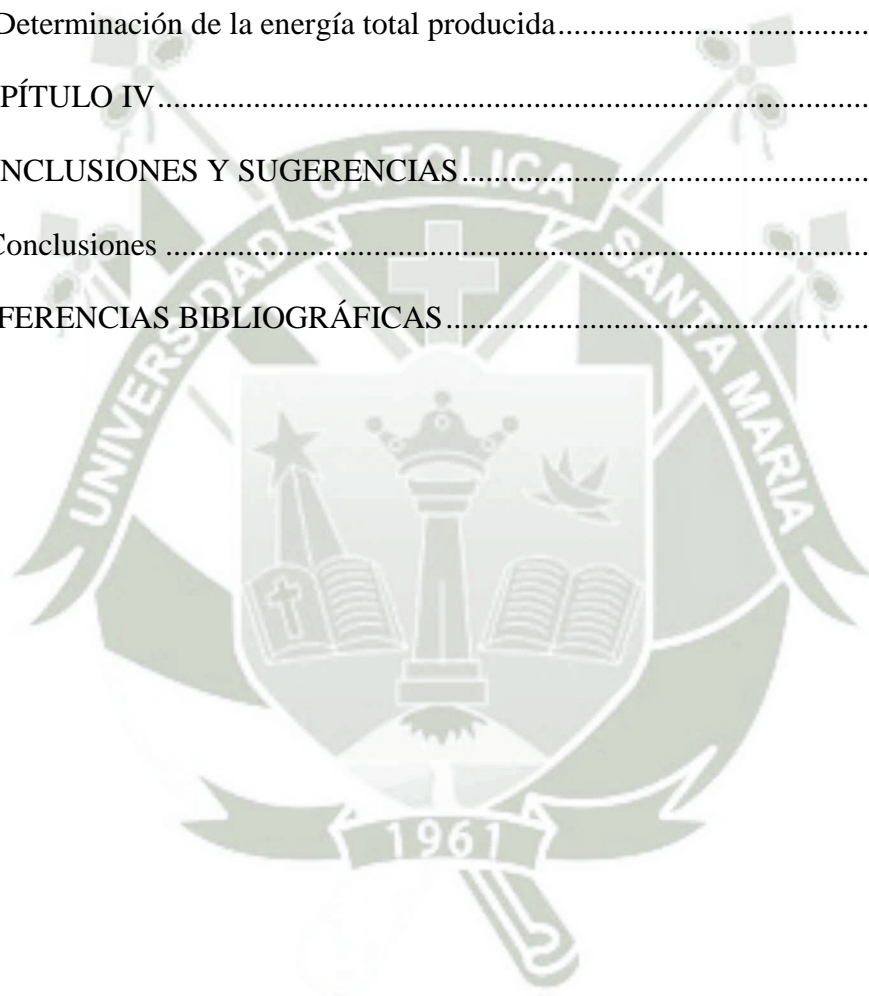
*A mis queridos abuelos Lalo y Milagro quienes con su inmenso amor caminando conmigo desde pequeña hicieron de mí una mejor persona*

## CONTENIDO

RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis.....	2
Objetivos .....	3
CAPÍTULO I.....	4
1    MARCO TEÓRICO.....	4
1.1    Cinética de crecimiento microbiana.....	4
1.2    Electricidad y corriente eléctrica.....	5
1.3    Celdas de combustible microbiana.....	6
Sistema bioelectroquímico .....	6
Principio de una celda de combustible microbiana.....	6
Diseño de una celda de combustible microbiana .....	8
Funcionamiento de la celda de combustible microbiana (CCM).....	10
Uso de la membrana.....	14
Electrodos	16
Desempeño eléctrico de las CCMs.....	17
Transferencia extracelular de electrones .....	19
1.4    Sustratos en celda de combustible microbiana.....	22
1.5    Microorganismos en celdas de combustible microbiana.....	25
CAPÍTULO II .....	27
2    MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
2.1    Lugar de investigación .....	27
2.2    Materiales .....	27

Material biológico .....	27
Material de vidrio .....	27
Instrumentación y equipos.....	28
Reactivos químicos.....	28
Otros materiales.....	29
2.3 Metodología.....	30
Implementación de la celda de combustible microbiana.....	30
Aislamiento, identificación y caracterización molecular y morfológica de la bacteria.....	32
Caracterización e identificación de la cepa obtenida .....	34
Caracterización molecular .....	34
Monitoreo del desempeño del sistema bioelectroquímico.....	36
CAPÍTULO III.....	41
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
3.1 Construcción de la estructura de la celda microbiana .....	41
Unidad experimental .....	43
Ensamblaje de la celda microbiana .....	44
3.2 Aislamiento, identificación y caracterización molecular y morfológica de la bacteria .....	45
Caracterización morfológica.....	45
3.3 Identificación molecular de la bacteria aislada .....	47
Secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa bacteriana .....	47
Análisis bioinformático de la secuencia .....	48
3.4 Evaluación de la generación de electricidad de la cepa aislada .....	50

Determinación de pH.....	50
Determinación de voltaje.....	51
Determinación de la intensidad de la corriente .....	52
Determinación de la potencia .....	53
Determinación de la densidad de la potencia .....	54
Determinación de densidad de corriente .....	55
Determinación de la energía total producida.....	56
CAPÍTULO IV.....	58
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	58
Conclusiones .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59



## INDICE DE TABLAS

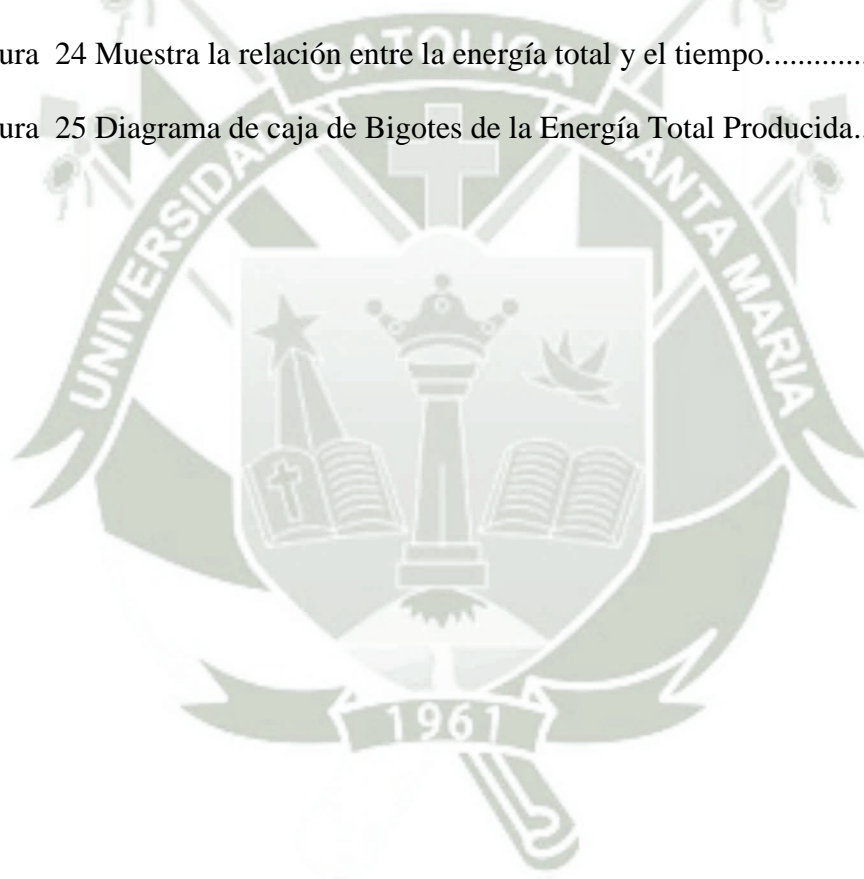
<b>Tabla 1</b> Caracterización de colonias obtenidas en el aislamiento bacteriano. ....	33
<b>Tabla 2.</b> Criterios de Diseño de la MFC.....	42
<b>Tabla 3.</b> Configuración de las celda de combustible microbiana para la evaluación del desempeño de generación eléctrica de <i>E. faecium</i> . ....	45
<b>Tabla 4.</b> Características macroscópicas de <i>E. faecium</i> , en la placa petri. ....	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de una celda de combustible microbiana (27)(Adaptada de Oh et al.,2010).....	10
Figura 2 Detalles principales de una CCM de cámara doble. Modificada a partir de (Du, 2007) (2).....	11
Figura 3 Esquema de celdas de electrólisis microbiana con dos cámaras (izquierda) y una cámara (derecha). (3).....	15
Figura 4 Mecanismo de transferencia de electrones. ....	22
Figura 5 Funcionamiento de una celda de combustible microbiana (MFC). (17)	25
Figura 6 materiales previos para ensamblar la CC.....	30
Figura 7 Electrodo de grafito usados en el Sistema Bioelectroquímico.....	31
Figura 8 Recolección de estiércol de ganado porcino en el distrito de Majes. ....	32
Figura 9 Multímetro Keysight 34461 a exactitud básica % CD, 0.06 AC.....	38
Figura 10 Sistema de monitoreo adquisitivo Keysigth 34972 .....	39
Figura 11 Diseño de prototipo de la celda de combustible microbiana. ....	42
Figura 12 Unidad experimental antes de ser ensamblada. ....	43
Figura 13 Proceso de ensamble de la Celda Microbiana. ....	44
Figura 14 Celda de combustible Microbiana en operación.....	45
Figura 15 Vista macroscópica de la bacteria <i>E. faecium</i> . ....	46
Figura 16 Imagen microscópica a 100x de <i>E. Faecium</i> .....	47
Figura 17 Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de la cepa aislada y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	49

Figura 18 Curva de cinética de crecimiento de <i>Enterococcus Faecium</i> durante 24 horas.....	49
Figura 19 Resultados de la evaluación del efecto del microorganismo en términos de Voltaje.....	51
Figura 20 Resultados de la determinación de intensidad de corriente.....	53
Figura 21 Resultado de la determinación de la potencia.....	54
Figura 22 Muestra la densidad de potencia con relación al tiempo.....	55
Figura 23 Muestra la densidad de corriente con relación al tiempo.....	56
Figura 24 Muestra la relación entre la energía total y el tiempo.....	57
Figura 25 Diagrama de caja de Bigotes de la Energía Total Producida.....	57



### Lista de símbolos

Área	A
Abs	Absorbancia
C	Concentración
G	Gramos
h	Horas
kg	Kilogramos
L	Litros
m	minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
s	Segundos
µm	Micrómetros

## Lista de abreviaturas

FC: Fuel Cell, Celdas de combustible

MFC: Microbiological Fuel Cell, Celdas de Combustible Microbiana

PEM: Proton Exchange membrane

MIP: Membrana de Intercambio protónica

V: Diferencia de potencial, voltaje

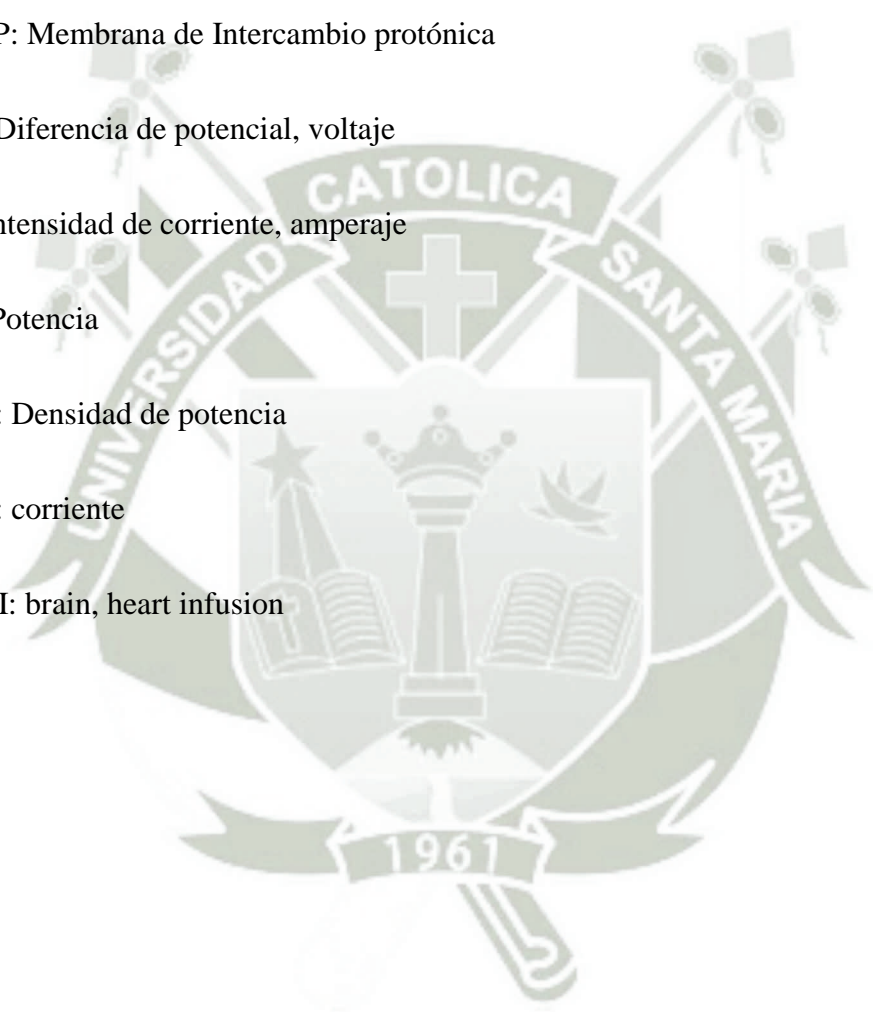
I: Intensidad de corriente, amperaje

P: Potencia

DP: Densidad de potencia

CE: corriente

BHI: brain, heart infusion



## RESUMEN

La celda de combustible microbiana (CCM) es una nueva tecnología en desarrollo que permite producir energía de manera limpia sin contaminar el medio ambiente usando uno o más microorganismos que mediante su respiración celular son capaces de metabolizar electrones por tanto energía eléctrica. En el presente trabajo de investigación se diseñó y se construyó una celda de combustible microbiana usando una membrana de intercambio protónico (MIP) Nafion 117, electrodos de grafito de alta densidad y como agente biológico se aisló una bacteria nativa a partir de biomasa residual de origen porcícola a éste agente bacteriano se le evaluó el desempeño de la generación eléctrica.

El sistema trabajó en régimen Batch que fue inoculado con la bacteria *E. faecium*, el cual estuvo funcionando por 10.000 minutos de manera continua, los resultados muestran produciendo una media de producción energética de 3 kJ y una media máxima de densidad de potencia de 4.5 watt/ m<sup>2</sup> y la máxima densidad de corriente de 6.0 amperios / m<sup>2</sup>.

El sustrato usado fue el caldo BHI que mostró un buen rendimiento en el metabolismo de la bacteria para su generación de energía eléctrica. Por tanto se puede concluir que es posible generar energía eléctrica con el microorganismo *E. faecium*.

Palabras clave: celdas de combustible microbiana, *E. faecium*



## ABSTRACT

The microbial fuel cell (CCM) is a new technology in development that allows producing energy cleanly without contaminating the environment using one or more microorganisms that through their cellular respiration are able to metabolize electrons by electric energy. In the present work, a microbial fuel cell was designed and constructed using a Nafion 117 proton exchange membrane (MIP) and high-density graphite electrodes and as a biological agent a native bacterium was isolated from native, biomass Porcine to this bacterial agent was evaluated the performance of the electric generation.

The system took a Batch flow principle that was inoculated with the bacterium *E. faecium*, which was operated for 10 000 minutes continuously, the results show producing a mean energy yield of 7.8 J and a mean maximum density of Power of 4.5 watt / m<sup>2</sup> where a yield of four times more than other scientific publications was found, and the maximum current density of 6.0 amperes / m<sup>2</sup>. The substrate used was the BHI broth, which showed a good performance in the generation of electric energy. It can be concluded that it is possible to generate electrical energy with the microorganism *E. faecium*

Key words: microbial fuel cells, *E. faecium*

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de energía y la consigna de limitar y controlar las emisiones de carbono está dando un énfasis mayor a la provisión de fuentes de energía alternativas a las actuales. Por lo tanto, se están realizando grandes esfuerzos en tecnologías basadas en energías renovables como la producción de hidrógeno y metano a partir de biomasa o productos de derivados biológicos. (1)

Muchos de estos procesos tienen limitaciones en sus desempeños. Frente a estos problemas de deficiencia de generación eléctrica, se deben desarrollar métodos alternativos para operar conjuntamente con otras rutas de suministro de energía, en paralelo con la investigación y desarrollo. (2)

Las centrales térmicas alimentadas con combustibles fósiles, son uno de los principales responsables de la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Así nos vemos obligados a buscar nuevas formas de tecnología para la generación eléctrica, capaces idealmente de transformar los desechos del sistema de producción en combustibles con menor impacto para el medio ambiente. (3)

El desarrollo de tecnologías para poder recuperar directamente la energía eléctrica de los desechos es una propuesta atractiva y en este contexto las células de biocombustibles tienen un papel potencial que se puede capitalizar por el uso de la amplia gama de fuentes de carbono a un bajo coste. El hecho es que las CCMs ayudados de uno o más agentes bacterianos pueden convertir sustratos disponibles en electricidad fácilmente haciéndolas fuentes sostenibles de energía que podrían aportar una importante contribución a las necesidades energéticas. Tal proceso también proporcionaría un medio para reducir simultáneamente los costos de tratamiento asociados con las fuentes de desecho de carbono. (4)

Entre diferentes tecnologías de energías renovables existentes como son la eólica, fotovoltaica, hidráulica y biomasa (biodiesel y bioetanol); una alternativa poco conocida y explorada en nuestro país son las celdas de combustible microbianas.

En el contexto actual de la creciente necesidad energética del país y transformación de la matriz de la generación existente, la principal motivación de este trabajo es determinar las potencialidades de una tecnológica de generación eléctrica alternativa, en el marco de las tecnológicas de bioelectricidad con celdas de combustible microbiana. (5). Sin embargo las CCMs están en desarrollo y la investigación significativa es necesaria para abordar la preparación tecnológica.

Las CCMs son especialmente adecuadas para la alimentación de pequeños sistemas eléctricos que requieren bajos rendimientos energéticos y cuyas aplicaciones no soliciten grandes consumos eléctricos, dentro de sus usos se plantea hipótesis como sistemas de energías distribuida para usos locales, sobre todo en las regiones subdesarrolladas del mundo. Esas condiciones de generar bioelectricidad dan un panorama de poder aprovechar sus características y propiedades y su potencial energético.

### **Hipótesis**

Dado que existen microorganismos llamados electrogénicos que tienen la capacidad de generar electricidad al transferir los electrones al ánodo por sus características de la membrana bacteriana que ésta le confieren la capacidad de metabolizar electrones. Es probable que diseñando y construyendo una celda de combustible microbiana conformada por determinado agente bacteriano y un sustrato artificial, se pueda generar un potencial eléctrico.

## Objetivos

### Objetivo general

- Analizar la eficiencia para generar energía eléctrica de un agente biológico en un sistema Bioelectroquímico.

### Objetivos específicos

- Implementar una celda de combustible microbiana a escala de laboratorio.
- Aislar, identificar y caracterizar el agente bacteriano obtenido a partir de biomasa residual de origen porcícola
- Evaluar el desempeño bioelectroquímico del agente microbiano.

## CAPÍTULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

En el capítulo presente se argumenta la revisión de aspectos teóricos más importantes relacionados con el tema de tesis a desarrollarse; como la situación energética actual, conceptos de celdas de combustible y tipos, su funcionamiento, los microorganismos implicados en el proceso.

#### 1.1 Cinética de crecimiento microbiana

El crecimiento microbiano hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo y no al aumento de tamaño de un microorganismo. El aumento del número de microorganismos permite la formación de colonias o de poblaciones. Es por eso que en microbiología el crecimiento se estudia por poblaciones y no en microorganismos individuales. Las bacterias se reproducen generalmente por fisión binaria. El resultado de la fisión binaria son dos células hijas por cada célula madre, así, una célula se divide en dos, dos en cuatro y cuatro en ocho y así sucesivamente. Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico, por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso. (6)

## 1.2 Electricidad y corriente eléctrica

El desempeño de una MFC se puede evaluar mediante diversos factores, como diferencia de potencial, densidad de corriente ( $j$ ), potencia ( $P$ ), y corriente ( $CE$ ). El concepto básico de electricidad es la carga eléctrica. La carga se define como la propiedad eléctrica de las partículas atómicas, medida en Coulombs. La capacidad de la carga para poder realizar un trabajo, se llama Potencial. En una batería o celda convencional se tienen dos cargas distintas, por lo tanto existe diferencia de potencial o también llamado tensión o voltaje. (7) (8).

La unidad básica de la diferencia de potencial es el voltaje ( $V$ ), y es definido como la energía requerida para mover una carga unitaria a través de un elemento conductor. (7). En un elemento conductor, los electrones libres son cargas que podemos poner en movimiento; la corriente es el agrupamiento de electrones, producto de la aplicación de la diferencia de potencial, desde el punto de carga negativa  $Q^-$ , hacia el punto de carga positiva  $Q^+$ , a través de un elemento conductor. La corriente se encuentra representada por el símbolo  $I$ , siendo su unidad básica el ampere ( $A$ ). .

Las celdas de combustible microbianas, corresponden al mismo principio que las celdas electroquímicas y baterías, las cuales producen corriente continua o directa; llamada así por la corriente presente en el circuito o conductor que se mueve en una única dirección. El movimiento unidireccional es provocado por las fuentes de voltaje, ya sea celdas o baterías, que mantienen la misma polaridad en su voltaje de salida. El circuito eléctrico para ser considerado como tal, debe estar formado por un dispositivo que cree una diferencia de cargas; que en este caso sería las celdas de combustible microbianas; y un circuito por el cual se realiza el paso de electrones como un cable de cobre. (9)

### 1.3 Celdas de combustible microbiana

#### Sistema bioelectroquímico

Los sistemas bioelectroquímicos utilizan determinadas bacterias que realizan la oxidación de la materia orgánica sobre un electrodo llamado ánodo. Su fuente de materia orgánica son sustratos tales como acetato, celulosa, almidón y aguas residuales de diversos orígenes (10). Esta tecnología puede dividirse en dos tipos de celdas de acuerdo a la espontaneidad de las reacciones que se realizan en ellas: celdas de combustible microbianas y celdas de electrólisis microbianas (11). Mientras en las primeras se genera corriente eléctrica de manera espontánea mediante reacciones de oxidación-reducción, en las segundas se consume energía eléctrica para llevar a cabo reacciones químicas no espontáneas de oxidación-reducción como la generación de hidrógeno.

#### Principio de una celda de combustible microbiana

El principio de la tecnología de celdas de combustible es tan antiguo como el desarrollo de la electroquímica misma, desde las primeras observaciones de Alessandro Volta (1745 – 1827) en el fenómeno, hasta el desarrollo más moderno de transbordadores espaciales de la NASA, cuyos sistemas eléctricos a bordo consumen electricidad generada con celdas de combustible de hidrógeno.

La teoría de celdas de combustible (CC) se puede remontar hacia 1800 por William Grove, quien realizando la electrólisis mediante electricidad, podía separar el agua en hidrógeno y oxígeno; entonces, el caso reversible sería verdad. Combinando hidrógeno y oxígeno con el método correcto se podría producir electricidad. Las celdas de combustible son reactores electroquímicos abiertos que convierten la energía química de una reacción directamente en energía eléctrica. Por ejemplo, pueden generar electricidad combinando hidrógeno y oxígeno electroquímicamente sin ninguna combustión; estas celdas no se agotarían como lo haría una batería convencional, ni precisan recarga, ya que producirán energía en forma de electricidad y calor en tanto se les provea de combustible.

Las celdas de combustible consisten en dos electrodos un ánodo y un cátodo separados por un electrolito iónico conductor (PEM). Cuando el hidrógeno es ionizado en el ánodo se oxida y pierde un electrón. Al ocurrir esto, el hidrógeno oxidado (ahora en forma de protón) y el electrón toman caminos diferentes, migrando hacia el segundo electrodo llamado cátodo. El hidrógeno lo hará a través del electrolito, mientras que el electrón lo hará por un material conductor externo en donde se ubicara la carga. Al final de su camino se vuelven a reunir en el cátodo, donde ocurre la reacción de reducción o ganancia de electrones del oxígeno para formar agua junto con el hidrógeno oxidado. Así este proceso genera agua 100% pura, corriente eléctrica. (12)

Por convención, se denomina celda de combustible a una celda electroquímica cuya finalidad es la generación de electricidad a razón de la alimentación de combustible. En otros casos, cuando no hay alimentación continua, sino que el consumo de una especie electro activa acumulada, se habla de pilas (baterías, para un arreglo en serie o paralelo) primarias o secundarias (recargables). La celda de combustible consiste básicamente en un sistema de dos electrodos que entran en contacto mediante conducción iónica, en un electrolito, y eléctrica. El combustible de la celda es alimentando al compartimento anódico, oxidándose (catalíticamente) sobre la superficie anódica y transfiriendo electrones al ánodo. Los electrones se mueven hacia el cátodo debido a una diferencia de potencial. Sobre la superficie catódica son transferidos al comburente reduciéndolo (catalíticamente). El desplazamiento de los electrones por el circuito externo genera una corriente eléctrica que puede ser aprovechada.

De acuerdo al tipo de combustible (dador de electrones), comburente (aceptor de electrones) y electrolito se clasifican las celdas de combustible en distintos tipos. Entre estos, la tecnología PEM (Polymer Electrolyte Membrane) Hydrogen Fuel Cell es probablemente la más avanzada en su desarrollo. Esta celda consume  $H_2$  y  $O_2$  gaseoso como combustible y comburente respectivamente. El  $H_2$  es la fuente de electrones que al oxidarse sobre la superficie anódica libera protones, los cuales migran a través de una membrana selectiva hasta alcanzar la superficie catódica, donde reaccionan con el oxígeno y los electrones provenientes del

ánodo, dando lugar a la generación de electricidad y vapor de agua como productos finales.

Hoy, existen ya automóviles, buses e inclusive un prototipo de aeroplano cuyos motores eléctricos se alimenta con electricidad de una celda de este tipo. (13)

Dentro de esta última línea de investigación, el uso de materia orgánica residual es una alternativa tecnológica que presenta mayor grado de avance, siendo una celda piloto de 1 m<sup>3</sup> de volumen de reacción, construido en la Universidad de Queensland, Australia, el exponente de mayor capacidad (14). La idea básica es usar microorganismos en condiciones anaeróbicas capaces de oxidar la materia orgánica y transferir, directa o indirectamente, los electrones de la oxidación al ánodo. En la mayoría de los casos, los electrones que llegan al cátodo se combinan con protones que difunden del compartimento anódico, a través de una membrana conductora selectiva (PEM), y oxígeno disuelto, resultando agua como producto final. (15)

Desarrollo de celdas de combustibles microbiológicas (Microbial Fuel Cell) MFC alimentadas con materia inorgánica no han sido hallados con la misma ocurrencia que la alternativa orgánica. Algunos diseños hacen uso de bacterias sulfato reductoras alimentadas con sulfato, para producir ácido sulfhídrico como combustible de la celda (16) (17) (18); otros utilizan iones metálicos para mejorar la cinética de la reacción catódica, al actuar como mediadores de la reducción del oxígeno disuelto. (19)

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en todo el mundo sobre la producción de bioelectricidad con una gama de productos de fermentación y residuo orgánicos (20). Los estudios de MFC se han centrado en la adherencia y crecimiento del biofilm de bacterias con respiración anódica y los medios de transferir electrones a la superficie del ánodo

### **Diseño de una celda de combustible microbiana**

Se ha propuesto una variedad de diseños escalables para la construcción de una CCM. En la mayoría de los estudios, la configuración comúnmente adoptada fue la tradicional doble cámara (en forma de H), en la que dos vasos (cámaras o

compartimentos) están conectadas por medio de un tubo que contiene una membrana selectiva (15).

Inicialmente, los reactores utilizaban un puente salino (21) como el canal de intercambio de iones entre el ánodo y el cátodo de la cámara, pero este fue remplazado posteriormente por membranas de intercambio de protones. Muchas de las modificaciones de los modelos existentes se han llevado a cabo recientemente para aumentar las densidades de potencia, y para mantener una producción de corriente constante. Algunos de los mejores diseños conocidos incluyen un flujo ascendente de tipo tubular (18) un diseño de placa plana (22), un apilado de CCMs (23) y un tubo en U (24). Un tipo de CCM de sedimentos, que utiliza el sedimento y el agua sobrenadante como el anolito y el catolito, respectivamente, ha registrado densidades de potencia de  $55 \text{ mW/m}^2$  en sedimentos marinos. (25)

Las CCMs son celdas electroquímicas que convierten energía química en energía eléctrica (Figura 1). En el compartimiento anódico ciertas bacterias llamadas electrogénicas llevan a cabo la oxidación del sustrato orgánico y generan electrones y protones. Los electrones se transportan a través de un circuito externo hacia el cátodo. Al mismo tiempo los protones ( $\text{H}^+$ ) generados en el ánodo se transportan hacia la cámara catódica a través de una membrana que separa ambas cámaras. La corriente eléctrica es producida por la reducción de oxígeno en el cátodo (donde se genera  $\text{H}_2\text{O}$ ). Se han hecho perfiles taxonómicos de las comunidades microbianas en los electrodos para numerosas celdas de combustible microbianas y actualmente las bacterias electrogénicas mejor estudiadas pertenecen a las familias *Shewanellaceae* y *Geobacteraceae* (26).

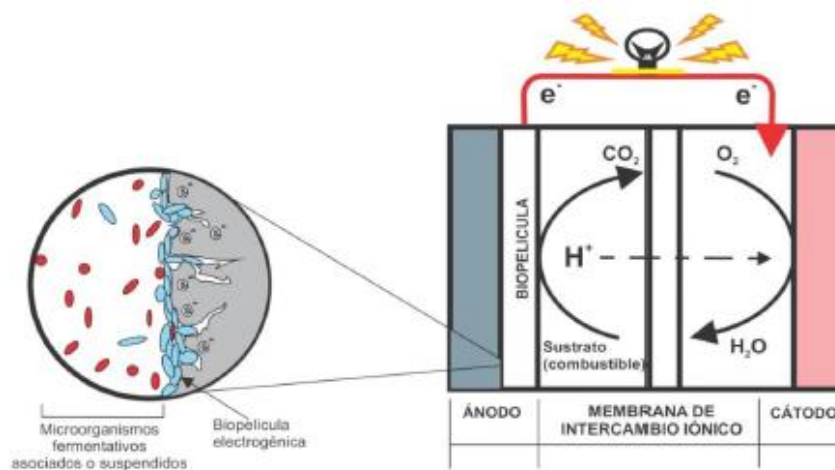


Figura 1 Representación esquemática de una celda de combustible microbiana (27)(Adaptada de Oh et al.,2010)

### **Funcionamiento de la celda de combustible microbiana (CCM)**

Una CCM típicamente está compuesta por dos cámaras (Figura 2), una anaeróbica y otra aeróbica (28) en medio de las cuales hay un separador. La cámara anaeróbica contiene sustratos orgánicos que al oxidarse por acción de los microorganismos, generan electrones, protones y  $\text{CO}_2$ . En cada una de las cámaras se coloca un electrodo, el ánodo en la cámara anaeróbica y el cátodo en la cámara aeróbica (29), una vez los electrones se liberan en la cámara anódica, éstos son captados por el ánodo y posteriormente transferidos hacia el cátodo mediante un circuito externo. Simultáneamente, en la cámara anódica se generan protones que migran hacia la cámara catódica a través del separador (30), donde se combinan con el oxígeno del aire para reducirse a agua con los electrones que captan directamente del cátodo, debido a que esta reacción no está catalizada por microorganismos el cátodo se refiere como abiótico

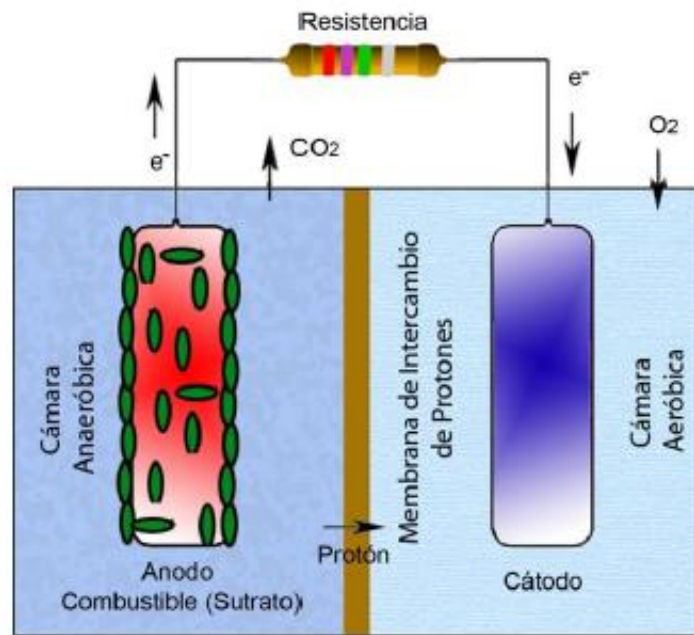


Figura 2 Detalles principales de una CCM de cámara doble. Modificada a partir de (Du, 2007) (2)

La celda se fabrica en acrílico o en vidrio, para los electrodos se pueden utilizar diferentes materiales como cobre, platino, grafito u otros (29) El separador, que es un importante componente del sistema porque es una membrana que impide el paso de electrones de la cámara anódica a la catódica y deja pasar los protones, puede ser de varios tipos: membrana de intercambio de cationes (MIC), membrana de intercambio de aniones, membrana bipolar, membrana de microfiltración, membrana de ultrafiltración, puente salino, fibra de vidrio, membranas porosas y otros materiales para filtrado (30).

El separador más ampliamente utilizado es la MIC que también se conoce como membrana de intercambio de protones (MIP) y entre ellas es muy común la Nafion, un producto de DuPont Inc., USA, que muestra una alta permeabilidad a los protones (31).

En los últimos años se han desarrollado CCMs de biocátodo o de cátodo microbiano (32), en las que a diferencia de los cátodos abióticos los microorganismos son usados como biocatalizadores para aceptar electrones a partir del cátodo y así reemplazar el uso de catalizadores químicos costosos.

Los biocátodos son de dos tipos: (1) biocátodos aeróbicos que usan oxígeno como el oxidante y microorganismos que asisten la oxidación de compuestos metálicos de transición, tales como Mn(II) o Fe(II), para la entrega de electrones al oxígeno; (2) biocátodos anaeróbicos que usan diferentes compuestos como aceptores terminales de electrones, tales como: nitrato, sulfato, Mn(IV), Fe(III), selenato, arsenato, fumarato, perclorato, cloroetenos, 2-clorofenol,  $\text{ClO}_4^-$ , U(VI), Cr(VI),  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ , entre otros (33). Estos biocátodos son de gran interés por su bajo costo, capacidad auto-regenerativa y sostenibilidad y además porque pueden contribuir a disminuir los altos potenciales catódicos. (32)

Los materiales del ánodo y el cátodo son seleccionados en base a varias propiedades, tales como: gran área superficial, estabilidad química, biocompatibilidad (ánodo), y buena conductividad. Como material del ánodo, el carbono es preferible a los metales como el cobre ya que este último es tóxico para las bacterias. Así, el carbón de fieltro, espuma de carbón y grafito granulado han demostrado ser muy eficaces. El cátodo es generalmente del mismo material que el ánodo, aunque se ha experimentado con varias combinaciones.

En algunos ensayos se utilizan catalizadores de platino para aumentar la tasa de reducción de oxígeno disuelto en el compartimento catódico (34). La membrana de intercambio iónico juega un papel importante no sólo por el propósito de transferir protones del compartimento anódico al catódico, sino también por la prevención de la introducción de oxígeno en la dirección inversa. Membranas utilizadas para este fin incluyen materiales como Nafion o Ultrex (35).

La composición del catolito es importante porque los resultados experimentales han mostrado que algunos tienen ventajas sobre los demás. Por ejemplo, MFC con ferricianuro ha demostrado que producen 1,5 a 1,8 veces más densidad de potencia que los que utilizan aire con platino (37). A su vez, el permanganato de potasio ha producido 4,5 y 11,3 veces más densidad de energía que el ferricianuro y oxígeno respectivamente.

Si bien de esta manera es posible aumentar la densidad de corriente significativamente, el uso de estos agentes oxidantes no es una alternativa viable para un desarrollo económico de la tecnología, puesto que su uso es mucho más costoso que  $O_2$ . Además, ni siquiera es posible su regeneración (reoxidación) usando  $O_2$  una vez agotado el poder oxidante. (36)

Varios otros factores contribuyen a la extracción eficiente de la potencia máxima de un sistema de MFC. Estos incluyen la distancia entre los electrodos, la fuerza iónica y la temperatura (38).

Un aumento de potencia de hasta un 85% se ha observado cuando la fuerza iónica (concentración de NaCl) es variada. Dado que las MFC son aplicables sobre todo en el tratamiento de aguas residuales, el aumento de la concentración de sal de las aguas residuales es una estrategia inviable.

En la Tabla 1 se presenta una lista de los sustratos más comúnmente usados por diferentes autores utilizados en celdas de combustible microbiológicas, así como las características de la celda en términos de volumen y/o área de electrodos y la intensidad de corriente en el punto de máxima potencia, se puede ver el uso de acetato, arabitol, carboximetil celulosa, partículas de celulosa y rastrojos de maíz cisteína, etanol, estiércol de granja, furfural, galactito, glucosa y ácido glucurónico cada uno con sus respectivos rendimientos de densidad de corriente; teniendo el más alto rendimiento el ácido glucurónico con  $1.18 \text{ mA/cm}^2$  seguido de la glucosa con un  $0.70 \text{ mA/cm}^2$  siendo sustratos bastante usados en el campo de celdas de combustible microbianas, además de las mejor recibidas por diferentes géneros bacterianos.

Tabla 1 Lista de diferentes sustratos utilizados en celda de combustible microbiológicas. (39)

Tipo de sustrato	Concentración	Fuente del inóculo	Tipo de MFC	Densidad de corriente (mA/cm <sup>2</sup> )
Acetato	1 g/L	Bacteria preacimataada desde una MFC	Forma cúbica de una cámara con ánodo de cepillo de fibra de grafito (7170 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> volumen del cepillo)	0,8
Arabitol	1220 mg/L	Bacteria preacimataada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,68
Azo colorante con glucosa	300 mg/L	Mezcla de lodo aeróbico y anaeróbico	Una cámara, cátodo al aire, ánodo de papel de carbono (36 cm <sup>2</sup> )	0,09
Carboximetil celulosa (CMC)	1 g/L	Cocultivo de <i>Clostridium cellulolyticum</i> y <i>G. sulfurreducens</i>	Doble cámara con discos de grafito como electrodos (16 cm <sup>2</sup> ) y catolito de ferriicianuro	0,05
Partículas de celulosa	4 g/L	Cultivo puro de <i>Enterobacter cloacae</i>	Tubular en forma de U con ánodo de tela de carbón (1,13 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de fibras de carbón.	0,02
Rastrojos de maíz	1 g/L COD	Aguas residuales domésticas	Una cámara, sin membrana separadora, cátodo al aire, ánodo de papel carbón (7,1 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de tejido de carbón.	0,15
Cisteína	385 mg/L	Muestra de sediment de 30 cm de profundidad	Doble cámara con electrodos de papel carbón (11,25 cm <sup>2</sup> )	0,0186
1,2-Dicloroetano	99 mg/L	Consorcio microbiano de una MFC enriquecida en acetato	Doble cámara con ánodo de disco de grafito (20 cm <sup>2</sup> ) y cátodo de grafito granular	0,008
Etanol	10 mM	Lodo anaeróbico de una planta de aguas residuales	Doble cámara con electrodos de papel carbón (22,5 cm <sup>2</sup> )	0,025
Estiércol de granja	3 kg en agua (20% w/v)	Autocolonización en ambiente anaeróbico	Un reactor de estiércol con ánodo en el fondo, y cátodo sobre el sólido; electrodos de tela de carbón (256 cm <sup>2</sup> )	0,004
Furfural	6,8 mM	Bacteria preacimataada desde un ánodo de una MFC con cátodo de ferriicianuro	Una cámara con cátodo al aire, electrodos de papel carbón (7 cm <sup>2</sup> )	0,17
Galactitol	1220 mg/L	Bacteria preacimataada desde una MFC	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,78
Glucosa	6,7 mM	Cultivo bacteriano mixto mantenido en acetato de sodio por 1 año ( <i>Rhodococcus</i> y <i>Paracoccus</i> )	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	0,70
Ácido glucorónico	6,7 mM	Cultivo bacteriano mixto	Una cámara con cátodo al aire, (12 mL), ánodo de tela de carbón no a prueba de agua (2 cm <sup>2</sup> ), cátodo de tela de carbón a prueba de agua (7 cm <sup>2</sup> )	1,18

### Uso de la membrana

La membrana se utiliza para crear una cámara donde los microorganismos puedan degradar un sustrato que es mantenido separado del cátodo (donde está involucrado el hidrógeno). Esta configuración minimiza las pérdidas de hidrógeno en el ánodo y en el líquido, y evita que el hidrógeno se mezcle con otros productos gaseosos como dióxido de carbono del ánodo. En un sistema de dos cámaras el biogás producido por la oxidación de la materia orgánica es colectado en la parte superior de la cámara anódica y el H<sub>2</sub> en la parte superior de la cámara catódica. En una configuración de una sola cámara ambos gases son colectados en el mismo compartimiento. Se utiliza una fuente de energía (FP) para aplicar el potencial eléctrico y una resistencia externa (R) para determinar la corriente como se muestra en la (Figura 3) (3).

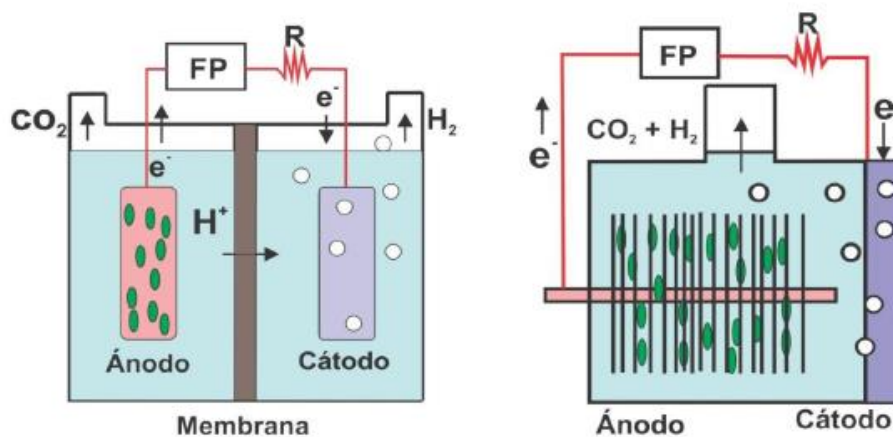


Figura 3 Esquema de celdas de electrólisis microbiana con dos cámaras (izquierda) y una cámara (derecha). (3)

### ***Características de una membrana***

Las CCMs utilizan membranas de polímeros, que se encuentran entre el ánodo y el cátodo las cuales tienen la capacidad de conducir protones del ánodo hacia el cátodo con la menor resistencia posible y separar físicamente el sustrato del oxidante que se encuentra entre el ánodo y el cátodo (40). Las membranas utilizadas en las celdas de combustible tienen que cumplir con las siguientes características: (41).

a) Capacidad de intercambio de protones elevada. Esta propiedad se mide cuando las membranas son colocadas en soluciones catiónicas, por ejemplo cloruro de sodio, el ion sodio sustituye a los protones.

Para determinar la concentración de protones intercambiados en la solución, se realizan titulaciones con NaOH.

b) La alta conductividad protónica es una de las principales propiedades, ya que de esto depende que se acumulen o no los protones en el ánodo (42) y por lo tanto se presente una variación en el pH.

c) Estabilidad química, térmica y resistencia mecánica. Generalmente, las membranas de intercambio protónico se utilizan en entornos químicamente hostiles lo que requiere que estén constituidas por materiales estables en el medio.

d) Además deben presentar baja permeabilidad al combustible empleado (3), para evitar reacciones secundarias en el cátodo.

La conductividad de protones del Nafion®, está directamente relacionada con el grado de hidratación debido al mecanismo de transporte asistido por agua (43). Sin embargo, esto es una limitante ya que no puede rebasar temperaturas mayores a 100 °C, debido a que el contenido de agua en la membrana disminuye notablemente, limitando de esta manera el transporte de protones (41) .

### **Electrodos**

Los electrodos deben tener buena conductividad eléctrica, no ser susceptibles a la corrosión, ser poco costosos, poseer un área superficial específica alta y además de ser fáciles de fabricar. En adición las baterías deben ser capaces de adherirse a su superficie para lograr una buena conexión eléctrica. (26).

El carbono es el material más utilizado para fabricar ánodos debido a la afinidad que las baterías tienen por él, buena estabilidad química, alta conductividad y relativamente bajo costo (44).

Se hace una revisión para las CCMs. Los diferentes materiales comparados son: papel carbón, hojas o placas de grafito, tela de carbón, malla de carbón, fieltro de carbón y esponjas de carbón. Materiales como el fieltro de carbón resultan adecuados debido a que tienen una porosidad más alta respecto con otros materiales, no obstante, el crecimiento de las bacterias electrogénicas en un ánodo de fieltro de carbono se ve limitado por la transferencia de sustrato y de productos en la superficie interna del material. Por su parte el papel carbón y las placas de grafito son los materiales más usados a nivel laboratorio por su bajo costo. (36).

También es posible utilizar un ánodo empacado con material granular de forma irregular, como por ejemplo trozos de grafito. Para que esta configuración funcione los gránulos deben estar empacados muy juntos uno del otro para lograr una conductividad satisfactoria. Esta configuración aporta la ventaja de tener un área superficial grande.

No obstante, después de un largo tiempo de funcionamiento, aún pueden existir zonas muertas para la generación de corriente (44) y por otro lado el utilizar fibras de carbono como el fieltro o lechos empacados aumenta la resistividad del material, pues se suma la resistividad de las fibras o de los gránulos (45) .

Otro tipo de ánodos son de cepillo de carbono. Estos están compuestos por dos alambres de titanio enrollados alrededor de cerdas de grafito de tal modo que al final el electrodo queda con forma de cepillo. Ofrece a las bacterias una superficie mayor que otros materiales. Sin embargo, adolece de los mismos inconvenientes que el fieltro de grafito en cuanto a la transferencia de masa entre sus fibras (44). Sin embargo, el alambre de titanio al que el electrodo está unido contribuye a reducir su resistividad (45).

La producción de hidrógeno ocurre en el cátodo. La reacción de evolución del hidrógeno en electrodos de carbón planos es muy lenta. Y requiere un alto sobrepotencial para producir la reacción. Para reducir este potencial se utilizan electrodos catalizados con platino. (41)

Mencionan que para aumentar la recuperación de H<sub>2</sub> es conveniente reducir la distancia entre los electrodos al mismo tiempo que se incrementa el tamaño de la membrana de intercambio iónico y el área de los electrodos. (41)

### **Desempeño eléctrico de las CCMs**

El desempeño eléctrico de una CCM se estudia a partir de las mediciones de voltaje que se realizan en la resistencia externa conectada entre el ánodo y el cátodo y los respectivos cálculos que se derivan de ellas. Los parámetros que se analizan para evaluar el comportamiento eléctrico de este tipo de dispositivos son: la densidad de potencia (DP), la eficiencia coulombica (EC) (46) y la resistencia interna (RI) (31).

La densidad de potencia (DP) expresada como la potencia por unidad de área del electrodo anódico (1) (47) o la potencia por unidad de volumen del sustrato (2), (48), se calcula de la siguiente manera:

$$P_A = \frac{IU}{A} \quad (1)$$

$$P_v = \frac{IU}{V} \quad (2)$$

Donde, I es la corriente en amperios, U es el potencial en voltios, A es el área de la superficie del electrodo anódico en m<sup>2</sup> y V es el volumen del sustrato de la cámara anódica.

Con relación a la resistencia interna (RI) éste es un parámetro muy importante para caracterizar un generador de corriente como lo es una CCM. Se puede obtener a partir del análisis de las curvas de polarización que se derivan de las mediciones de voltaje en la resistencia externa (49) (46), o por la técnica de espectroscopia de impedancias, que se fundamenta en la aplicación de una pequeña señal de voltaje a la celda electroquímica y posterior medición de la corriente a través de ella (50).

La eficiencia coulombica (EC) 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 CCMs. La EC se calcula como la razón entre la carga generada y la carga teórica presente en el sustrato de la cámara anódica, mediante la siguiente expresión matemática.

$$EC\% = \frac{\sum_{i=1}^n U_i t_i}{RFb\Delta SV} M \times 100 \quad (3)$$

Donde, U<sub>i</sub> es el voltaje de la CCM en el tiempo t<sub>i</sub>, R es la resistencia externa, F es la constante de Faraday (96485 C/mol), b es el número de moles de electrones producidos por una mol de demanda química de oxígeno (DQO), ΔS es la concentración removida de DQO (g/L), V es el volumen del líquido (L) y M es el peso molecular del oxígeno (32g/mol).

## Transferencia extracelular de electrones

### *Transferencia de electrones desde el microorganismo al ánodo*

En un bioánodo existen bacterias electroquímicamente activas (51) que transfieren los electrones directamente al ánodo a través de proteínas de membrana como los citocromos tipo *c*, o de conductos proteicos denominados pili que sirven como nano conductores; estudios genéticos han demostrado que la eficiente transferencia de electrones a través de una biopelícula de *Geobacter sulfurreducens* requiere de su presencia (52). Otras bacterias que no pueden hacerlo debido a la naturaleza no conductiva de su membrana celular, requieren de mediadores de electrones exógenos o endógenos (29). Estos mediadores se reducen durante la oxidación metabólica de materiales orgánicos y su forma reducida es luego re-oxidada al transportar los electrones hacia el ánodo, el cual se mantiene a un alto potencial eléctrico (51), este proceso cíclico permite una mayor velocidad de transferencia de electrones incrementando la salida de energía (29).

Los buenos mediadores deberían poseer las siguientes características atravesar la membrana celular fácilmente, tomar los electrones a partir de la cadena transportadora, poseer una alta velocidad de reacción con el electrodo, tener una buena solubilidad en el anolito, no biodegradables ni tóxicos para los microorganismos, de bajo costo y que tengan un potencial de reducción lo más cercano posible al del componente biológico para mantener una adecuada transferencia de electrones. Es común usar mediadores exógenos sintéticos (tintes y metal orgánicos) tales como: rojo neutro, azul de metileno, tionina, azul de meldola, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, Fe (III) EDTA y otros compuestos hidrofílicos (51). Desafortunadamente, la inestabilidad de los mediadores sintéticos, su costo y su alta concentración, que llegaría a ser tóxica para el microorganismo, limita sus aplicaciones en las CCMs (51); por lo tanto, las CCMs sin mediadores son ventajosas en el tratamiento de aguas residuales y la generación de energía porque se elimina principalmente el costo del mediador. (29).

Cuando se utiliza una mezcla de microorganismos es común la presencia de mediadores endógenos, estos pueden ser metabolitos secundarios, como en el caso de *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas aeruginosa*, o metabolitos primarios observados en *Escherichia coli* y en *Sulfurospirillum deleyianum*; los mediadores redox producidos por una bacteria pueden ser usados por otras para transferir los electrones al ánodo (17).

### ***Transferencia de electrones desde el cátodo al microorganismo***

Los mecanismos de transferencia de electrones en los biocátodos son similares a los del bioánodo, en este proceso los microorganismos pueden llevar a cabo reacciones de transferencia directa con participación importante de citocromos tipo *c* e hidrogenasas, y reacciones de transferencia indirecta con mediadores redox naturales tales como PQQ (pirroloquinolinaquinona) (53); sin embargo, estos procesos bioquímicos solo se están estudiando en los últimos años.

Los microorganismos capaces de aceptar electrones directamente a partir de electrodos se han denominado coloquialmente electrodo-oxidantes (54) o más formalmente electrótrofos (55) ; en este caso, los electrones que reciben del cátodo son transferidos selectivamente a aceptores finales con altos potenciales redox que captan del medio tales como protones, CO<sub>2</sub>, nitrato, fumarato, Cr(VI), U(VI), solventes clorinados, entre otros (55). El mecanismo mencionado anteriormente permite visualizar un amplio rango de aplicaciones principalmente en biorremediación, debido a que muchos de los aceptores finales en su estado reducido pueden ser más amigables para el ambiente, por ejemplo, la reducción del nitrato contribuye a la remoción de compuestos nitrogenados o la reducción del Cr (IV) proveniente de aguas residuales de la industria del cuero hasta su forma menos tóxica Cr (III) (56). Además, en el sistema de biocátodo se pueden producir biocombustibles (H<sub>2</sub>, butanol, CO<sub>2</sub> reducido, entre otros) u otros compuestos químicos de interés (55).

### *Mediadores secretados por bacterias*

En 2005 Rabaey y colegas, demostraron que no era necesario el uso de mediadores externos debido a que las mismas comunidades microbianas (mixtas o puras), podrían producir mediadores endógenos que resultarían en excelentes transportadores de electrones. Los mejores mediadores excretados por bacterias electrotróficas son derivados de fenazina producidos por *Pseudomonas aeruginosa* como: piocianina (PYO) y fenazina-1-carboxamida; y flavinas producidas por *Shewanella* como: riboflavinas (vitamina B2, RF) y flavina mononucleótidas (FMN). Además las flavinas pueden interactuar con otros microorganismos y generar corriente eléctrica en microorganismos considerados no-electrogénicos; tal es el caso de *Bacillus sp.*, y levaduras (57)

En la figura 4, se muestra los dos mecanismos de transferencia para el uso de un aceptor de electrones de estado sólido. Las flechas invertidas representan la absorción de electrones de un donante de electrones de estado sólido. (1a) Un microorganismo puede realizar EET poniendo directamente en contacto el electrodo con redes de redox u otras moléculas de transferencia de electrones, (1b) Variación de 1a en la que los nanocables conductores permiten la transferencia de electrones a distancias micrométricas En este último mecanismo aún no se han observado reacciones de absorción de electrones. (2a) Un microorganismo puede utilizar una lanzadera de electrones o el transporte de electrones hacia / desde la célula. Las moléculas segregadas por microbios, así como los compuestos artificiales añadidos, pueden actuar como lanzadera electrónica. (2b) Variación en 2a donde los electrones son transferidos por metabolitos primarios tales como H<sub>2</sub> (32)

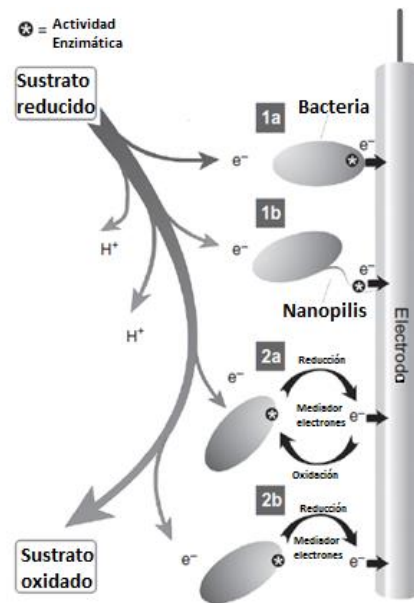


Figura 4 Mecanismo de transferencia de electrones.

#### 1.4 Sustratos en celda de combustible microbiana

Cualquier fuente de carbono biodegradable puede ser utilizada en una CCM para la generación de electricidad incluyendo moléculas simples tales como carbohidratos y proteínas, así como una mezcla compleja de materia orgánica presente en los humanos, animales y diferentes tipos de aguas residuales principalmente aguas residuales domésticas, municipales y de la industria alimentaria. La producción de electricidad a través de la materia orgánica depende de los micro-organismos adheridos sobre el ánodo. Por lo tanto, en las CCM's, el sustrato es considerado como uno de los factores biológicos más importantes que afectan a la generación de electricidad (58)

El sustrato es uno de los aspectos más importantes de la CCM porque constituye el combustible a partir del cual se genera la energía. En la literatura científica se encuentran diversos trabajos en los que se emplea una gran variedad de sustratos, desde compuestos puros hasta mezclas complejas. En los primeros años, sustratos simples como glucosa y acetato eran de uso general, pero en los últimos años las investigaciones se centran en la utilización de sustratos menos convencionales con el fin de utilizar la biomasa presente en aguas residuales de diverso tipo y adicionalmente depurarlas y generar energía. (58).

Los compuestos puros se pueden degradar de manera más simple lo que permite obtener mayor generación de energía e hidrógeno (39), además a nivel experimental es recomendable su uso porque se facilita la evaluación de condiciones operacionales de la CCM tales como, la eficiencia coulombica, la densidad de potencia y la resistencia interna. Algunas investigaciones han empleado por ejemplo, acetato debido a su inactividad hacia los procesos microbianos (fermentación y metanogénesis), glucosa (59), sacarosa, almidón (60), lactato, ácido tereftálico, tintes sintéticos, indol (61), lactosa, maltosa, xilosa, formiato, propionato, ácido succínico, etanol , entre otros.

Sin embargo, el uso de sustratos complejos en una CCM es de gran interés porque, además de ser fuentes de energía, estos se pueden degradar y/o biorremediar antes de su descarga al medio ambiente. A diferencia de los compuestos puros los sustratos complejos requieren para su degradación una comunidad microbiana diversa y electroquímicamente activa (62), cuyas poblaciones se van seleccionando dependiendo del tipo de sustrato. Como ejemplos de este tipo de sustratos se pueden explorar: aguas residuales provenientes del procesamiento de frutas y vegetales, suero de queso, melazas de destilerías, aguas residuales de biorrefinerías, aguas residuales de industrias farmacéuticas con contaminantes recalcitrantes, residuos agrícolas, entre otros. Además, se ha demostrado que las CCMs pueden utilizar como sustratos no sólo material orgánico degradable, sino también material resistente a la biodegradación (15).

Son diversos los factores a tener en cuenta para seleccionar el sustrato a utilizar en la CCM, entre ellos el costo. Los sustratos puros resultan más costosos por las implicaciones de los procesos de obtención, en cambio, los sustratos complejos tales como los mencionados anteriormente son productos de desecho industrial o doméstico disponibles en forma abundante, de fácil consecución y por lo tanto económicos. Otro factor que normalmente incide sobre la generación de energía es la concentración del sustrato, esta dependencia es característica de las reacciones enzimáticas que ocurren en la CCM. Un incremento en la concentración del sustrato acelera la velocidad de reacción, lo que normalmente conduce a una mayor generación de energía; sin embargo, algunos autores han

encontrado efectos contrarios y altas densidades de potencia a bajas concentraciones.

Hay dos posibles razones que explican este comportamiento, primero, un incremento de los productos de fermentación que ocasionan una disminución del pH en el sistema, lo cual inhibe la actividad enzimática; segundo, algunos compuestos del sustrato orgánico son utilizados para el crecimiento bacteriano y no para la generación de electricidad (63)

La eficiencia de la CCM igualmente está afectada por sus condiciones de operación, entre ellas el pH electrolítico. Los gradientes de pH se producen por la acidificación en la cámara anódica y la alcalinización en la cámara catódica, esto se presenta debido a que en las reacciones anódicas se producen protones y en las reacciones del cátodo se consumen protones. Cuando en la cámara anódica la difusión y la migración de los protones a través de la MIP es lenta, se produce una disminución del pH ocasionando una disminución drástica de la actividad bacteriana y por consiguiente se afecta la transferencia de protones hacia la cámara catódica (56). De otro lado, el flujo de protones y de otros cationes alcalinos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$ , y  $\text{Mg}_2^+$ ) hacia el compartimiento catódico reduce el oxígeno y genera un incremento de pH. La disponibilidad de protones en el cátodo es un factor clave que determina la eficiencia de reducción del oxígeno, así que, un aumento del pH en la cámara catódica puede disminuir significativamente la generación de corriente de la CCM. Termodinámicamente, un cambio en una unidad de pH causa en el electrodo una pérdida de potencial de 59 mV. Por lo tanto, para evitar los cambios de pH es necesario el uso de soluciones buffers de fosfato.

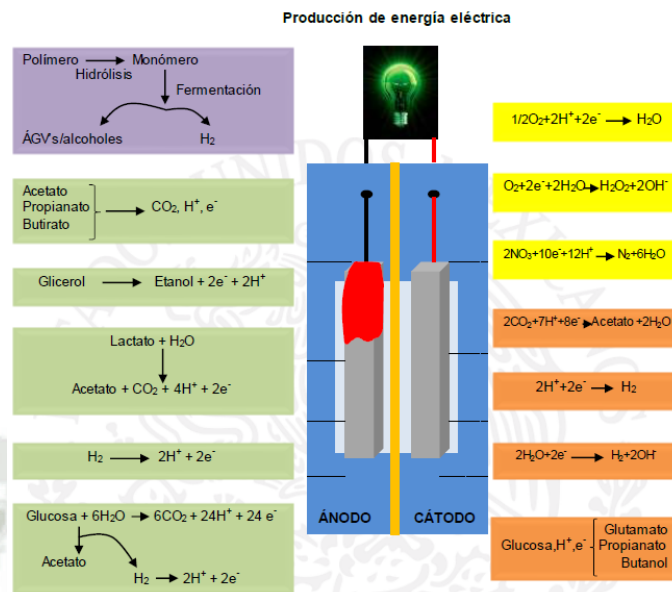


Figura 5 Funcionamiento de una celda de combustible microbiana (MFC). (17)

En la figura 5 indica que el factor más importante para que una CCM genere una corriente de electrones es el microorganismo o microorganismos utilizados para llevar a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica a compuestos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y de la liberación de electrones y protones al sistema. Otro factor importante es el tipo de inóculo que se puede utilizar en las CCM. El inóculo puede provenir de un proceso lodos activados lodos anaerobios (17), aguas residuales domésticas (22) y aguas residuales industriales. Los mejores resultados se han obtenido manejando inóculos de lodos activados o y de lodos anaerobios (17).

### 1.5 Microorganismos en celdas de combustible microbiana

Se ha estudiado el funcionamiento cultivos puros de *Shewanella sp.*, *Geobacter sp.*, y *Pseudomonas sp.*, para realizar estudios sobre el mecanismo de transferencia de electrones al ánodo, pero la producción de corriente eléctrica siempre es menor con cultivos puros que con mezclas de bacterias (64).

Rabaey y Verstraete (2005) presentan una detallada revisión sobre la generación de electricidad bacteriana en la cámara anódica y señalan que los principales factores que influyen en la generación de energía son las vías metabólicas que gobiernan el flujo de electrones y protones, la influencia del sustrato y el potencial del ánodo.

A altos potenciales anódicos, las bacterias pueden usar la cadena respiratoria en un metabolismo oxidativo y transferir electrones al ánodo, sin embargo, si el potencial del ánodo disminuye los electrones probablemente se depositan sobre aceptores de electrones alternativos (sulfato, nitrato, entre otros) y en su ausencia, ocurrirá la fermentación. Recientemente se ha demostrado en cultivos mixtos que los microorganismos fermentativos pueden tener poca o nula capacidad para transferir electrones al ánodo, sin embargo, su metabolismo contribuye a la generación de energía en la CCM ya que aportan subproductos que pueden ser utilizados como sustratos por otras poblaciones microbianas, permitiendo el establecimiento de interacciones sintróficas.

Discuten diversas publicaciones que caracterizan la comunidad microbiana de los sistemas bioelectroquímicos, al destacar procesos sintróficos específicos que capacitan a una biopelícula para la generación de corriente eléctrica a partir de un sustrato; la sintrofia consiste en que ciertos microorganismos hidrolizan y fermentan compuestos orgánicos complejos y otros utilizan los subproductos para la generación de corriente, estableciéndose una estructura jerárquica con microorganismos dominantes dependiendo del sustrato empleado.

Con base en lo anteriormente expuesto la formación de una biopelícula sobre el electrodo mejora la producción de energía (65), sin embargo, la microbiología de una biopelícula en la CCM y las implicaciones de la ecología microbiana sobre el funcionamiento del sistema han sido poco estudiados (66), por lo tanto, conocer los procesos de colonización, invasión y sucesión de las poblaciones microbianas que producen electricidad permitirá explorar nuevos métodos para la producción de energía sustentable y renovable (20).

## CAPÍTULO II

### 2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Lugar de investigación

La investigación fue realizada en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, en los laboratorios de pabellón H-104 y H- 303.

#### 2.2 Materiales

##### Material biológico

- Bacteria electrogénica
- Residuo orgánico porcícola

##### Material de vidrio

- Erlenmeyers 100 mL, 250 mL, 500mL
- Vasos de precipitado 250 mL, 500mL, 1000 mL
- Pipetas de 1 mL y 10 mL
- Baguetas
- Probeta 100 mL a 1000 mL
- Fiolas de 10 mL , 25 mL, 50 mL
- Matraces 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Propipetas
- Micropipetas 10 ul, 100ul, 1000 ul
- Frascos de vidrio

### **Instrumentación y equipos**

- Autoclave Tuttnauer 1730 M
- Multiparámetro, Hanna Multiparameter H9829
- Multímetro, Keysight Technologies U1272A
- Adquisitor de Datos, Keysight Technologies 3472A LX1 Data Acquisition/Switch unit
- Balanza analítica Ohaus Pioneer
- Centrifuga para tubos Falcon Mikro 120
- Dinamómetro Digital Liyi- Tech
- Espectrofotómetro Shimadzu 160 A
- Incubadora JP Selecta 200210
- Microscopio Óptico PrimoStar Zeiss
- Refrigeradora Coldex E-162
- Cintas pH

### **Reactivos químicos**

- Ferricianuro de potasio 99.6% , Diproquim
- Ácido sulfúrico 96%
- Cloruro de Bario, Diproquim
- Buffer fosfato J. T. Baker , Diproquim
- Papel pH, Universal Test Paper pH 0-14
- Medio nutritivo Himedia ref M002-500G
- Caldo BHI Himedia ref M002500G
- Agua destilada

- Alcohol medicinal 96%
- Agua oxigenada al 50% Diproquim

### Otros materiales

- Algodón medicinal
- Asa de Kolle
- Cortador
- Cubeta de cuarzo
- Espátula
- Jeringa hipodérmica 25mL
- Paños Absorbentes
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Pernos de  $\frac{1}{4}$
- Plastifilm rollo 5m x 15 cm
- Recipiente de plástico 20cm x 20cm x 5cm
- Soporte de láminas portaobjeto
- Tijera
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon 15 mL
- Tela de talega
- Placas Petri de plástico
- Caimanes
- Cables de cobre

- Jeringas 25mL
- Acrílico
- Termorregulador de pecera
- Tornillos
- Resistencias 10  $\Omega$

### 2.3 Metodología

#### Implementación de la celda de combustible microbiana

La celda de combustible microbiana fue implementada de material de acrílico con dimensiones de 8cm de lado tanto para la cámara anódica y catódica. La celda consiste de dos cámaras y separadas por un espacio concéntrico donde ingresa la membrana de intercambio protónico, los electrodos de ambas cámaras fueron de material de grafito de alta densidad, lo cual el diseño, medidas y especificaciones realizadas en programa software Autocad se mostrará en el anexo 2

Se obtuvo inicialmente una plancha de acrílico de 6mm de espesor cual fue cortado por la técnica de laser con las dimensiones que indica el diseño realizado. Como se muestra en la figura 6 las partes del acrílico ya cortado con su respectivo pegamento “solve acril” listo para ser armado.

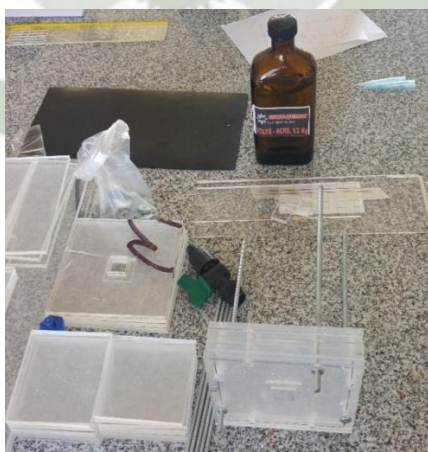


Figura 6 materiales previos para ensamblar la CC

### 2.3.1.1 Preparación del sustrato

Se usó caldo Infusión Cerebro Corazón porque obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio para el adecuado crecimiento y por tanto metabolismo respiratorio de la bacteria, se usó 37 gr por cada 1000ml de agua destilada, luego se de hacer la mezcla se autoclavó a 120 psi por 20 minutos para evitar alguna contaminación ya que el medio debe estar estéril para el uso en la cámara anódica.

### 2.3.1.2 Preparación de agua catódica

Se utilizó ferricianuro de potasio como solución catódica en proporción de 2.5 gr por cada 1700ml de agua destilada.

### 2.3.1.3 Preparación del electrodo

Se cortó los electrodos de 2.5 cm de ancho por 5 cm de largo a partir de una plancha de grafito y conectados a una cable de 22 cm de largo que funciona como conexión al adquisidor como en la figura 7 Donde se midió la resistencia con un multiparámetro.

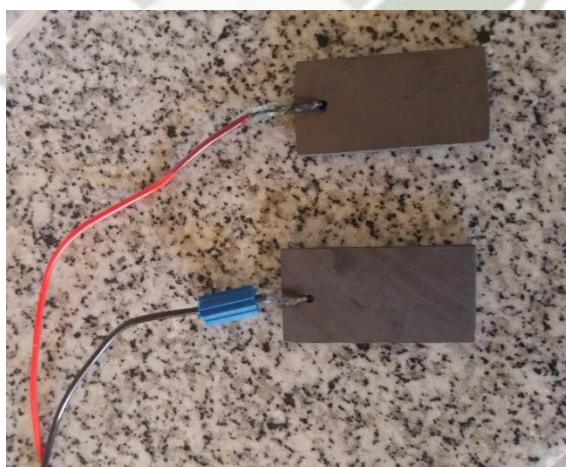


Figura 7 Electrodo de grafito usados en el Sistema Bioelectroquímico.

#### 2.3.1.4 Activación de la membrana Nafion 117

La membrana fue adquirida de la empresa Fuel Cell Store de EEUU, por ser la más usada en el campo de las MFC.

Se procedió a activar la membrana de intercambio iónico con un área de 3cm x 3cm donde el tratamiento fue de acuerdo al procedimiento 1 hora en 3% de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en solución a 80°C, 1 hora en agua desionizada a 80°C para remover las trazas de peróxido de hidrogeno, 1 hora en ácido sulfúrico 3M a 80°C y finalmente 1 hora en agua des ionizada a 80°C (67) y se procedió a guardar la membrana ya tratada en recipientes cerrados con agua destilada a temperatura ambiente, hasta ser usado.

#### **Aislamiento, identificación y caracterización molecular y morfológica de la bacteria**

#### 2.3.1.5 Recolección de muestra

La biomasa se recolectó de una granja en la localidad del pedregal del distrito de Majes de la provincia de Caylloma, la Biomasa adquirida fue del sector porcícola. Se tomó la muestra con una espátula la cantidad de 1 kg estiércol en una bolsa de muestreo inerte y estéril. Se transportó vía terrestre hasta la ciudad de Arequipa donde se almacenó bajo refrigeración a 8°C durante una semana hasta ensamblar el sistema para su uso. Figura 8



Figura 8 Recolección de estiércol de ganado porcino en el distrito de Majes.

### 2.3.1.6 Aislamiento bacteriano a partir de materia orgánica

Se aisló a partir del consorcio de bacterias presentes en el estiércol de ganado porcícola, y se sembró en una placa Petri que contenía un medio de cultivo nutritivo y mediante la técnica de siembra de agotamiento se fueron aislando los microorganismos propios para una Celda Microbiana.

En la tabla 2 se muestra la caracterización morfológica de las cepas obtenidas y en el anexo 1 se observa la vista macroscópica y microscópica de cada cepa aislada.

Tabla 2 Caracterización de colonias obtenidas en el aislamiento bacteriano

N°	PROCEDENCIA	FORMA COLONIA	COLOR DE COLONIA
C1	porcino	Ovalada	crema
C2	porcino	Ovalada	crema
C3	porcino	Puntiforme	Verde
C4	porcino	Ovalada	crema
C5	porcino	Ovalada	Blanca
C6	porcino	Cerebroide	Blanca
C7	porcino	Lineal	crema
C8	porcino	Puniforme	Verde
C9	porcino	Puntiforme	Roja
C10	porcino	Puntiforme	verde
C11	porcino	Ovalada	crema
C12	Porcino	Puntiforme	Crema

### 2.3.1.7 Identificación microbiana

Una vez obtenido el crecimiento de bacterias se seleccionaron colonias con las características deseadas, colonias de superficie rugosa, blanquecina, de consistencia cremosa, se hizo 12 purificaciones de cepa hasta obtener de una misma especie. Luego se realizó una primera tinción Gram con la cual se constató la presencia de bacterias Gram positivas. (Anexo 1)

Después de haber obtenido los cultivos puros, se sembró cada cepa por duplicado en placas con medio agar nutritivo, estas placas fueron llevadas a la incubadora por 48 horas a 37°C, terminando el tiempo de incubación se procedió a realizar una nueva tinción Gram.

#### *2.3.1.8 Cepa a ser investigada en el sistema bioelectroquímico*

Se eligió usar la cepa 7 ya que sus características morfológicas indican que es un coco Gram positivo, y según bibliografía se puede realizar investigación con este tipo de microorganismos.

### **Caracterización e identificación de la cepa obtenida**

#### *2.3.1.9 Identificación macroscópica y microscópica*

Una vez aislada la bacteria se hizo una siembra por el método microbiológico de agotamiento que nos muestra el tipo y características de la colonia. Luego con las colonias puras obtenidas se procedió a hacer una tinción Gram que nos demostró las características microscópicas del microorganismo elegido.

### **Caracterización molecular**

#### *3.4.1 Extracción del ADN genómico*

El ADN genómico extraído se analizó por espectrofotometría UV-Visible a una longitud de onda de 260 y 280 nm para comprobar la pureza de esta, donde la muestra mostraban un cociente entre las absorbancias dadas mayor a 1.5, concluyéndose que es una muestra de buena calidad para su posterior tratamiento.

#### *3.4.2 Reacción de amplificación (PCR)*

Una vez terminada la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se procedió a purificar los amplicones y posteriormente se confirmó por electroforesis, se observó las bandas de los amplicones con peso de 500 pb aproximadamente con la comparación del marcador de peso molecular.

### *3.4.3 Aislamiento de ADN y amplificación del gen RNAr 16S para bacterias.*

El ADN de las cepas nativas fue aislado de la siguiente manera, con una asa se tomó una asada de colonias de la placa Petri, la cual fue re suspendido en 600 ul de buffer de lisis 1X en un eppendorf, luego se incubó en hot block por 45 minutos a 65 °C, después de este periodo se agregó 300 ul de Fenol-Cloroformo, se agitó y se llevó a la centrifugación por 5 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante se recolectó y fue colocado en un nuevo eppendorf al cual se la añadió 500 ul de isopropanol, se llevó a centrifugación por 10 minutos a máxima velocidad, después el sobrenadante fue eliminado, se añadió 600 ul de etanol absoluto, se llevó a centrifugación por 2 minutos y se descartó el sobrenadante; el pellet que contiene el ADN fue re suspendido con 100 ul de agua destilada estéril.

### *3.4.4 Amplificación del ADN realizado mediante la técnica de PCR*

(Polymerase Chain Reaction) Para realizar la PCR, a cada tubo de PCR se añadió 2 µl de ADN de cada muestra, 2 µl de la solución de primers para la amplificación del gen del RNAr 16S (cada uno con una concentración final de 200 µM), y 30 µl de Platinum Blue PCR Supermix High Fidelity. Los tubos, se colocaron en un termociclador BioRad (MyCycler™ ThermalCyclerSystem WithGradientOption) y se programó de la siguiente manera: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 94 °C por 70 segundos (desnaturalización), 55 °C por 70 segundos (hibridación) y 72 °C por 70 segundos (extensión). Finalmente 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Luego de la amplificación las muestras serán mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

### *3.4.5 Electroforesis y purificación de productos de PCR*

El producto de la PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5% y la banda correspondiente al gen RNAr 16S fue cortado del gel para su purificación utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit. Donde se utilizó columnas de QIAGEN y se siguió las instrucciones de la compañía.

### 3.4.6 Secuenciación de productos de PCR

A 20  $\mu$ l de ADN purificado se le añadió 1  $\mu$ l de Primer para secuenciar (el gen ARNr 16S para bacterias) los tubos fueron etiquetados y fueron enviados al DNA Sequencing | Functional Biosciences, Inc.

### 3.4.7 Filogenia molecular

Las secuencias del gen RNAr 16S de las cepas nativas, que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (blast) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), y luego se construyó árboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas, porcentaje de similitud con otras especies. Además se realizaron pruebas de alineamiento múltiple y filogenia con el programa CLUTAL Omega (Sievers et al., 2011; Goujon et al., 2010; McWilliam et al., 2013).

### **Monitoreo del desempeño del sistema bioelectroquímico.**

El desempeño de las CCM's fue evaluadas mediante el voltaje (V), corriente eléctrica ( $I= V/R$ ), potencia eléctrica ( $P=I*V$ ), densidad de corriente ( $J= I/ A_{\text{electrodo}}$ ), y densidad de potencia ( $P/A_{\text{electrodo}}$ ) de acuerdo a Kim *et al.* (2005). (68)

### 2.3.1.10 Determinación del voltaje

El voltaje es una magnitud física que cuantifica la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos, en el caso de una celda de combustible microbiana, estos puntos corresponden a la cámara anódica y a la cámara catódica, ya que los electrones fluyen desde el ánodo hacia el cátodo. También es expresado como el trabajo por unidad de carga ejercido por el campo eléctrico sobre una partícula cargada para moverla entre dos posiciones determinadas. El voltaje es independiente de la longitud del camino recorrido por el electrón y depende

exclusivamente del potencial eléctrico de ambos puntos en el campo eléctrico. Se calculó el voltaje producido por las celdas a partir de los datos registrados de Intensidad de corriente empleando la ley de Ohm donde  $I$  es intensidad en amperios,  $V$  es el voltaje en voltios,  $Q$  es la carga en coulombs y  $t$  corresponde al tiempo expresado en segundos.

$$I = \frac{V}{R} = \frac{Q}{t} \quad (4)$$

#### 2.3.1.11 Determinación de la potencia

La potencia eléctrica es la relación de paso de energía de un flujo por unidad de tiempo, en otras palabras, la cantidad de energía entregada o absorbida por un elemento en un tiempo determinado. La potencia desarrollada en las celdas es el producto de la diferencia de potencial entre el terminal positivo y negativo y la intensidad de corriente que pasa a través de ella. Por ello se calculó en base a los resultados de voltaje e intensidad de corriente según la fórmula para corriente continua, donde  $P$  es la potencia en watts,  $I$  es intensidad de corriente en amperios y  $V$  es voltaje en voltios.

$$P = VI = \frac{V^2}{R_{ext}} = I^2 R_{ext} \quad (5)$$

Donde:

$P$  = potencia (W) (1 watt = 1 Joules/s)

$V$  = voltaje en (V)

$I$  = corriente eléctrica (A)

$R_{ext}$  = resistencia externa ( $\Omega$ )

#### 2.3.1.12 Determinación de densidad de potencia

Se define la densidad de potencia como la potencia ejercida por cada  $m^2$  de ánodo. La densidad de potencia, denominada DP, se calculó dividiendo la potencia calculada con la ecuación (7) entre el área total de ánodo y se expresa en Watts/ $m^2$

$$P^* = \frac{V^2}{AR_{ext}} = \frac{P}{A} \quad (6)$$

Donde

$P^*$  = densidad de potencia ( $w/m^2$ )

$V$  = voltaje (V)

$P$  = potencia (w)

$A$  = área del electrodo ( $m^2$ )

$R_{ext}$  = resistencia externa ( $\Omega$ )

### 2.3.1.13 Determinación de la densidad de corriente

Se hizo una determinación de la densidad de la potencia en amperios/ $m^2$  mediante la ecuación.

$$J = \frac{q}{At} = \left(\frac{1}{A}\right) \left(\frac{q}{t}\right) = \frac{I}{A} \quad (7)$$

Donde :

$J$  = densidad de corriente ( $A/m^2$ )

$I$  = corriente eléctrica (A)

$A$  = área del electrodo ( $m^2$ )

### 2.3.1.14 Monitoreo de la energía total producida

El potencial de la celda es registrada de forma continua por medio de un multímetro (Multímetro Keysight 34461) conectado a los bornes de la resistencia.

La intensidad ( $I$ ) se calcula a partir del voltaje obtenido ( $E$ ) mediante la ley de Ohm

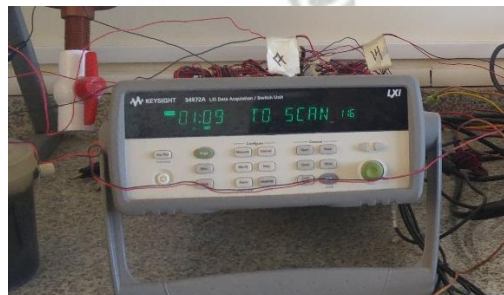


Figura 9 Multímetro Keysight 34461 a exactitud básica % CD, 0.06 AC

Para el registro de datos se conectó con un adquisidor de datos o Data Loggers son equipos electrónicos que permiten capturar y almacenar datos. Estos instrumentos son usados para la monitorización de diferentes variables, normalmente magnitudes eléctricas, temperatura y humedad, a lo largo de un cierto tiempo de periodo.

Es un aparato muy versátil, que se basa en la utilización de un instrumento de medida, un galvanómetro muy sensible que se emplea para las determinaciones.

Para poder medir cada una de las magnitudes eléctricas, el galvanómetro se debe completar con un determinado circuito eléctrico que dependerá de también dos características del galvanómetro: la resistencia interna ( $R_i$ ) y la inversa de la sensibilidad. Esta última es la intensidad que, aplicada directamente a los bornes del galvanómetro, hace que la aguja llegue al fondo de la escala dicho equipo se conectó con puertos cocodrilos a los alambres de cobre de cada una de las celdas conformadas a una computadora para el procesamiento de datos adquiridos en las experimentaciones.

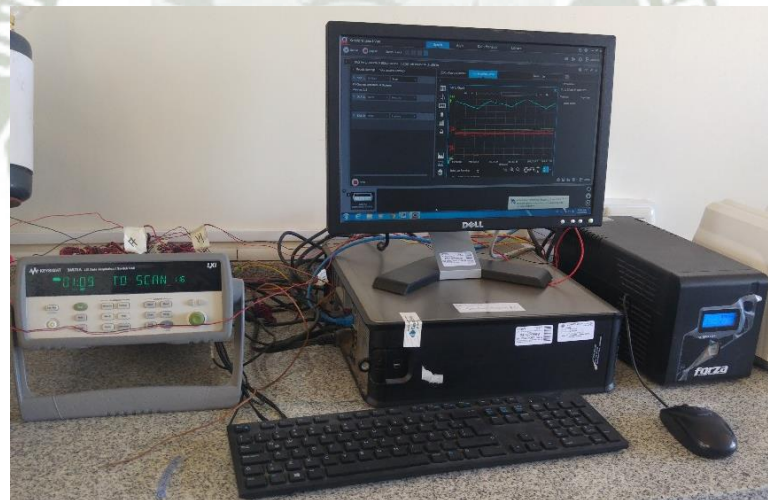


Figura 10 Sistema de monitoreo adquisidor Keysight 34972

Determinación de la generación total de energía experimental ( $W$ , Joules) medido durante el periodo de funcionamiento de la CCM. Esta es la energía que se logra generar aprovechando de un sustrato único. La energía experimental se utiliza para evaluar la energía producida a través del tiempo de operación de la CCM.

$$W = \left( \int_0^t \frac{V^2}{R_{ext}} dt \right) \left( \frac{R_{ext} + R_{int}}{R_{int}} \right) \quad (8)$$

Donde:

W= energía experimental (J)

$\int_0^t \frac{V^2}{R_{ext}} dt$  = energía real generada durante el periodo de tiempo (t) = P. T

V = voltaje de salida de la CCM (V)

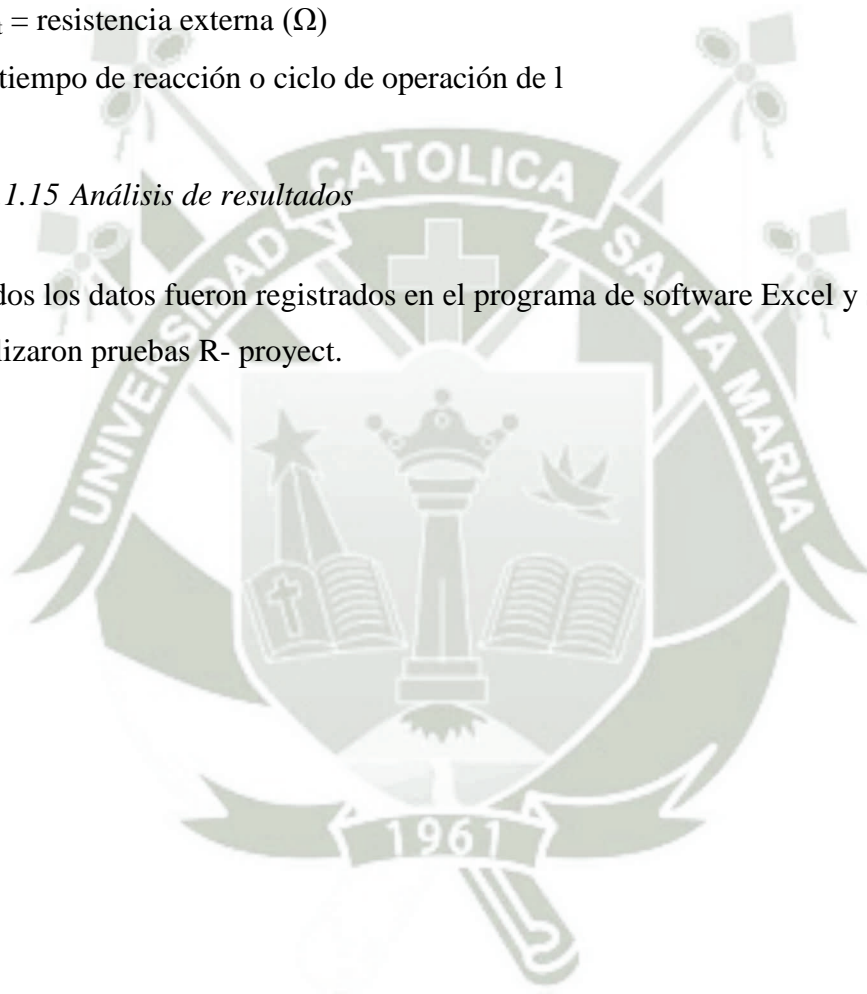
$R_{int}$  = resistencia interna ( $\Omega$ )

$R_{ext}$  = resistencia externa ( $\Omega$ )

t = tiempo de reacción o ciclo de operación de l

#### 2.3.1.15 Análisis de resultados

Todos los datos fueron registrados en el programa de software Excel y se realizaron pruebas R- proyect.



## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Construcción de la estructura de la celda microbiana

Para determinar la estructura de la celda, se tomó en cuenta los siguientes principios:

- Material inerte para evitar alguna conducción de carga.
- Se usó un sistema sin bombas para ahorrar recursos. Por tanto se usó un sistema de tipo Batch y a temperatura ambiente.

Se escogió un modelo de doble cámara por su factibilidad, sin embargo se realizó una mejora para acercarse al diseño de una batería. El material a usar no debe ser conductor, tiene que tener naturaleza inerte de lo contrario reduciría la eficiencia de la celda, debe ser duradero y no corrosivo y de preferencia reciclable, el acrílico es uno de los materiales que cumple esas características, además que nos permite la visión externa del sistema.

Se construyó un prototipo de material de acrílico con las siguientes dimensiones: 6mm de espesor siendo un cuadrado de 8 cm de lado. El diseño de la celda fue de dos cámaras cada una con un volumen de 0.5 L, el par de cámaras estuvo unido a por una membrana intercambiadora de protones MIP activada NaftionR con un diámetro de 3 cm<sup>2</sup> figura 11, teniendo 4 pares de tomas manométricas funcionando como puertos de entrada y salida (parte superior de ambas cámaras) que nos permitirá el ingreso de la solución catódica y el sustrato, además de el paso del cable que conecta a los electrodos.



Figura 11 Diseño de prototipo de la celda de combustible microbiana.

Ambos electrodos ánodo y cátodo fueron hechos de material de grafito de alta densidad con un tamaño de 2.5 cm de ancho por 5 cm de largo y con un área superficial de 12.5 cm<sup>2</sup>. En la tabla 3 se muestra los criterios de diseño de la CCM usando como solución catódica ferricianuro de potasio, con cátodos de grafito de alta densidad de superficie de 12.5cm<sup>2</sup> operado a temperatura ambiente, inoculado con *E. faecium* teniendo un volumen de 0.5 L

**Tabla 3.** Criterios de Diseño de la MFC

<b>Criterios de Diseño de la Microbial Fuel Cell</b>	
<b>Cámara anódica</b>	Solución de ferricianuro de potasio
<b>Inóculo del ánodo</b>	Bacteria <i>E. faecium</i>
<b>Volumen del ánodo y cátodo (L)</b>	0.5
<b>Material de ánodo y cátodo</b>	Placas de grafito de alta densidad
<b>Superficie del área de los electrodos (cm<sup>2</sup>)</b>	12.5
<b>Membrana</b>	Naftion
<b>Temperatura operada (°C)</b>	Temperatura ambiente
<b>PH operado</b>	5 (ánodo) 5 (cátodo)

El material de los electrodos debe tener capacidad de conductividad y no corrosivo. Se usó grafito de alta densidad debido a que en bibliografía indica que es el material de mejor rendimiento y conductividad en una CCM además su estructura asegura una buena superficie de contacto para la adhesión de microorganismos por tanto el metabolismo celular de electrones. Para estandarizar su función se empleó las mismas dimensiones en ambas cámaras.

Las celdas funcionan mejor si no ingresan oxígeno a la cámara anódica, por ello se cerró con válvulas manométricas que además de cerrar sirven de salida para hacer medición de pH y temperatura.

### Unidad experimental

El sistema consiste de dos cámaras separadas de material de acrílico con capacidad de 500 mL. Los electrodos de ambas cámaras son de grafito de alta densidad con una superficie de  $12.5 \text{ cm}^2$ . Están unidas a través de la membrana naftion 117 de  $3 \text{ cm}^2$  teniendo en medio una lámina de acrílico con una ventana del tamaño de la membrana. Incluye caimanes con cables de cobre rotulados para conectar con los electrodos, resistencias externas, termopar para tomar la temperatura y un dispositivo de adquisición de datos.

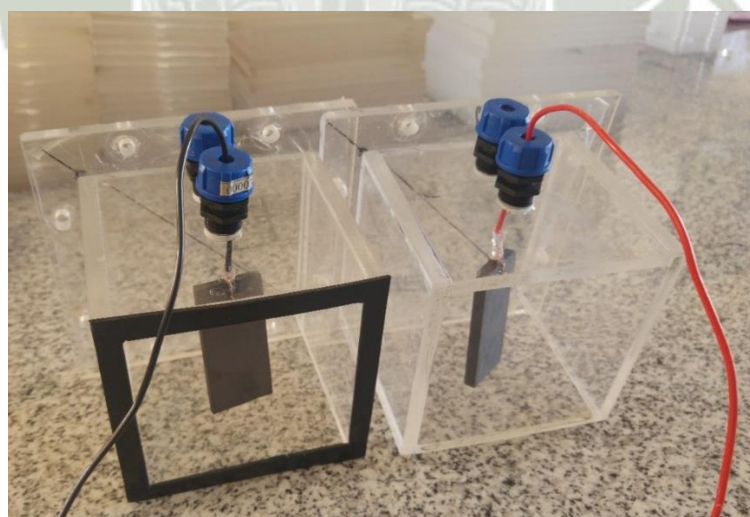


Figura 12 Unidad experimental antes de ser ensamblada.

### Ensamblaje de la celda microbiana

Se construyó 2 celdas empleando como material acrílico de 500 mL de volumen con 8 cm de lado tanto para la cámara anódica como para la cámara catódica.

Cada celda consiste en dos cámaras y separado por un espacio concéntrico donde ingresa la membrana naftion 117, los electrodos de ambas cámaras fueron de grafito de alta densidad, ambos electrodos fueron colocados dentro de cada cámara, se activó la membrana de intercambio iónico para conectar las cámaras entre sí, se emplearon caimanes con cables de cobre para conectar los electrodos a las resistencias externas, al multímetro y al dispositivo de adquisición de datos. La cámara anódica fue cerrada herméticamente sin entrada de aire, de la misma manera la cámara catódica.



Figura 13 Proceso de ensamble de la Celda Microbiana.

Estas celdas armadas fueron empleadas para evaluar el desempeño de generación eléctrica del microorganismo *E. Faecium*, el contenido de la celda se especifica en la Tabla 4 ésta ofrece una vista completa de las características de la celda de acuerdo con su contenido siendo el objetivo de la evaluación la cantidad de electricidad generada por la bacteria con un tiempo de evaluación de 15 días y la resistencia empleada de 100 ohmios.

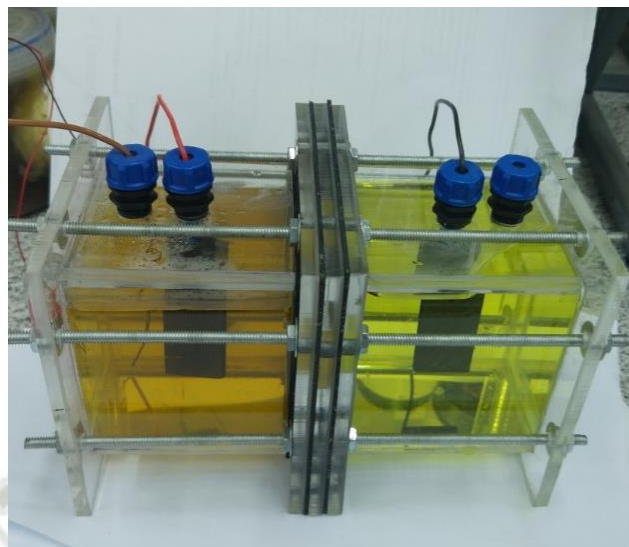


Figura 14 Celda de combustible Microbiana en operación.

Tabla 4. Configuración de las celdas de combustible microbiana para la evaluación del desempeño de generación eléctrica de *E. faecium*.

CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA	
Contenido	
Objetivo de evaluación	Cantidad de electricidad generada en voltios de la bacteria
Tiempo de evaluación	15 días
Resistencia empleada	100 ohm

### 3.2 Aislamiento, identificación y caracterización molecular y morfológica de la bacteria

#### Caracterización morfológica.

##### *Vista macroscópica*

Después del aislamiento y siembra se la cepa en medio agar nutritivo, se hace una caracterización macroscópica cepa y se puede observar en las características de la colonia una forma rizoide, con un borde lobulado, de elevación plana, con superficie plegada, teniendo consistencia cremosa y de color blanquecino.

Tabla 5. Características macroscópicas de *E. faecium*, en la placa petri.

<b>AGAR EN SUPERFICIE</b>	
<b>BACTERIA</b>	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>FORMA</b>	Rizoide
<b>BORDE</b>	Lobulado
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana
<b>SUPERFICIE</b>	Plegada
<b>CONSISTENCIA</b>	Cremosa
<b>COLOR</b>	Blanquecino
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	No permite el paso de la luz
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Opaca

Se sembró la bacteria en una placa Petri contenida de medio de cultivo agar nutritivo, por el método microbiológico de siembra por estría donde con el asa de khol en la superficie de agar se extiende haciendo un camino estriado, después de 24 horas de incubación a 37°C se obtuvo la colonia con características mostradas en la tabla 5.

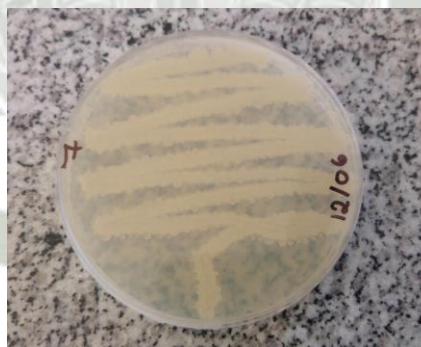


Figura 15 Vista macroscópica de la bacteria *E. faecium*.

#### ***Vista Microscópica***

Se hizo una tinción Gram en el laboratorio con el microscopio de marca Euromex, modelo Iscope para poder observar la bacteria *E. faecium* es una célula Gram-positiva, esférica que puede ocurrir en parejas o cadenas. Las colonias formadas son de 1-2 mm de longitud y parecen húmedas. Las células no son móviles.

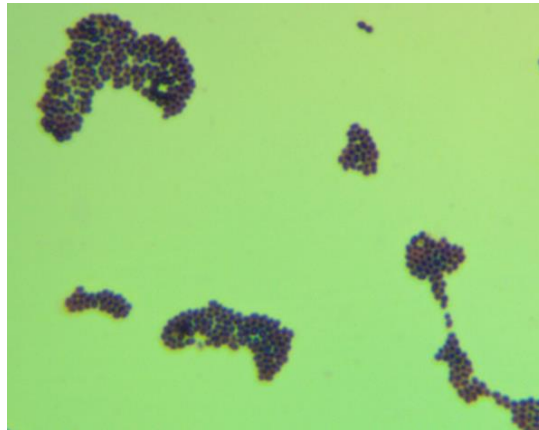


Figura 16 Imagen microscópica a 100x de *E. Faecium*.

### 3.3 Identificación molecular de la bacteria aislada

#### Secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa bacteriana

La secuencia enviada por la empresa DNA Sequencing | Functional Biosciences fue:

```
TCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGG
GATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGC
ATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACC
CGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGA
TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
CGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG
GACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG
GATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGT
TCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG
GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
```

### Análisis bioinformático de la secuencia

La utilización de programas informáticos permitió la construcción del árbol filogenético que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

En nuestro estudio realizamos el agrupamiento de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S del organismo objeto de estudio y de las cepas con quienes presentaban similitud según el alineamiento global mediante BLAST ( (69) (57) y ClustalW (70) (71) (72)

Una vez realizado el análisis de BLAST se pudo hallar que la muestra presenta 100% de similitud con *Enterococcus faecium*.

Una vez realizado el análisis mediante BLAST se pudo hallar que: Adicionalmente a partir de los resultados antes descritos se extrajo los microorganismos con mayor similitud para su posterior procesamiento de alineamiento y filogenia, cuyos datos resumen más importantes como el porcentaje de identidad y el código de acceso que figura en la siguiente tabla.

Tabla 6. Bacterias con mayor similitud con la cepa aislada.

Nº	Descripción	Max Scor e	Identida d	Accession
1	<i>Enterococcus faecium</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: Rubing-L8	1216	100%	LC269185. 1
2	Uncultured bacterium clone S2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1216	100%	KY363813. 1
3	<i>Enterococcus faecium</i> strain R1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1216	100%	KY235921. 1
4	Bacterium QHB31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1216	100%	KJ629294.1
5	<i>Enterococcus sp.</i> 43-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1216	100%	KC819130. 1

A partir de la información de la tabla 6 se procedió a realizar el árbol filogenético de cada cepa bacteriana dando como resultado lo siguiente:

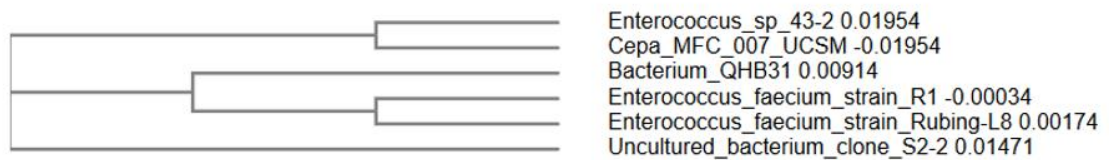


Figura 17 Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del RNAr 16S de la cepa aislada y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.

### Cinética de *E. Faecium*

Se realizó una curva de cinética de crecimiento bacteriano en caldo nutritivo por 24 horas, tomando medición en intervalos de 1 hora, cada una de éstas se leyó en espectrofotómetro para tomar sus absorbancias. Previamente preparado los patrones de escala de Mc Farland, usando la ley de Lambert y Beer se transformó a unidades de concentración, haciendo una comparación del crecimiento en relación con el tiempo como muestra en la Figura 18 donde se describe que en las primeras horas la fase logarítmica pasando a una fase exponencial entre las horas 5 a 12, luego de la hora 12 se observa una reducción en el ritmo de crecimiento para pasar a la fase de muerte.

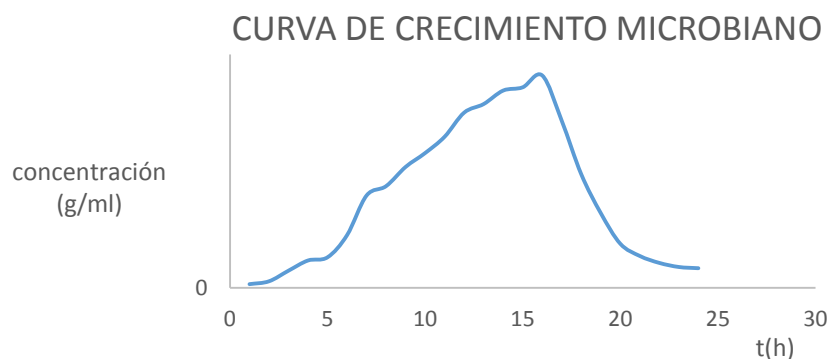


Figura 18 Curva de cinética de crecimiento de *Enterococcus Faecium* durante 24 horas.

### 3.4 Evaluación de la generación de electricidad de la cepa aislada

#### Determinación de pH

Previamente al uso del inóculo de *E. faecium* se realizó una medida de pH para determinar una buena conservación. Se realizó la medición del pH usando cinta de pH, debido a que el uso del potenciómetro podría contaminar la muestra, además la capacidad de volumen de la celda microbiana resulta insuficiente como para sacar y cubrir por completo el electrodo del potenciómetro. Un pH neutro o cercano nos permite asegurar un buen desempeño de las enzimas producidas por los microorganismos, tal como menciona (73) . Se obtuvo un pH 5 se asume que hay un buen rendimiento de metabolismo celular.

Tabla 7. Promedio de resultados de pH con la temperatura.

<i>t(h)</i>	<i>pH</i>	<i>T(°C)</i>
24	5	22,84
48	4	22,01
72	5	18
96	5	20
120	5	21,5
144	6	20
168	4	18,5
192	5	19
216	4	21,3
240	5	17

### Determinación de voltaje

La diferencia de potencial registrada en la celda de combustible microbiana como se muestra en la figura 19, donde se observa un rendimiento considerable generado en las celdas arriba de 0.7 voltios poco tiempo después que es conectado, eso se puede deber al uso de sustrato altamente vitaminado donde la bacteria puede realizar una respiración celular óptima y se torna constante en relación al tiempo, siendo un tiempo monitoreado de 10.000 minutos. Se ha podido comprobar un buen rendimiento de energía del microorganismo *E. faecium* comparando con un reporte científico (74).

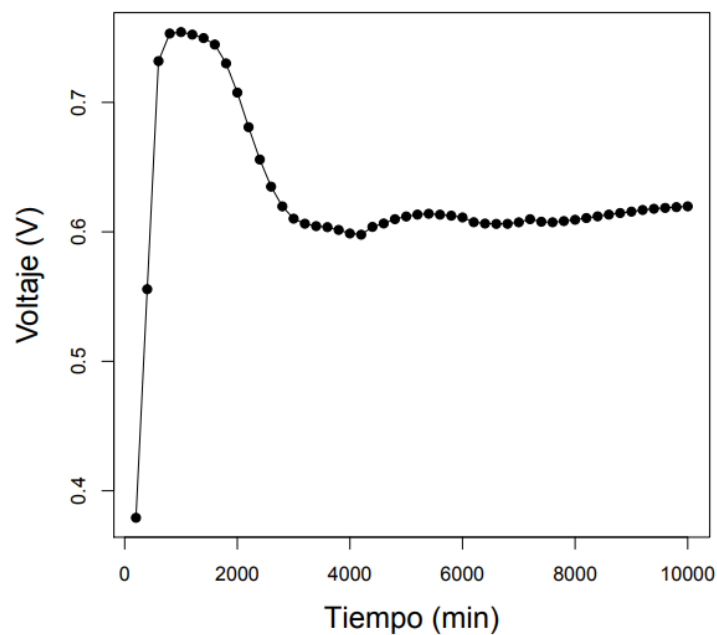


Figura 19 Resultados de la evaluación del efecto del microorganismo en términos de Voltaje.

La producción de electricidad catalizada por los microorganismos es un fenómeno derivado de su propio metabolismo, a partir de las reacciones que permiten degradar materia orgánica en la naturaleza.

La diferencia radica en la separación del aceptor final de electrones naturales que se encuentra en su ambiente original, el cual es reemplazado en las celdas por un aceptor artificial (los electrodos) de tal modo que la única vía de respiración celular es transfiriendo los electrones de la materia orgánica oxidada hacia el ánodo. En las celdas estudiadas, este cambio no representa un fuerte estrés a la comunidad microbiana debido a que la fuente de alimentación se encontraba en el mismo inóculo y el consorcio se encontraba adaptado al consumo de los residuos de alimento del ganado. Por otro lado Hassan et al. (2016) (75) realizaron sus experimentos con cepas bacterianas como *Bacillus subtilis*, obteniendo una densidad de corriente de  $64\text{mA/m}^2$  en un proceso degradativo del compuesto 2,4 diclorofenol generando una densidad de poder de  $9.5\text{mW/m}^2$ , donde utilizaron el persulfato de potasio como catolito, llegando a una corriente pico de 1.1 mA sobre un potencial de 0.45 V.

#### **Determinación de la intensidad de la corriente**

El primer parámetro de producción eléctrica evaluado fue la intensidad de la corriente. El adquirente de Datos, Keysight Technologies 3472A LX1 Data Acquisition/Switch unit permite registrar la corriente eléctrica en términos de amperaje indicando el valor de la resistencia externa colocada. En esta investigación se trabajó con  $100\ \Omega$  de resistencia como lo hizo Lin- Chun Wul 2014 (74) y durante todo el proceso de la operación de la celda no se cambió la resistencia externa como en otros estudios reportados.

Otros autores reportan haber trabajado con valor de resistencias entre 10 a 1000 dependiendo del tipo de celda y del periodo de operación de la celda. En la figura 20 muestra la intensidad de la corriente registrada en Datos, Keysight Technologies 3472A LX1 Data Acquisition/Switch unit durante el periodo de la operación de la celda. Cada uno de los puntos representa a un valor importante de amperaje.

Se observa que desde el inicio de la operación empezó a registrar amperaje cercano a 0.002 amperios, y fue subiendo de manera drástica en las siguientes

horas y donde se puede ver que su máxima producción fue arriba de 0.007 amperios en los primeros 2000 minutos luego entrando en una fase exponencial.

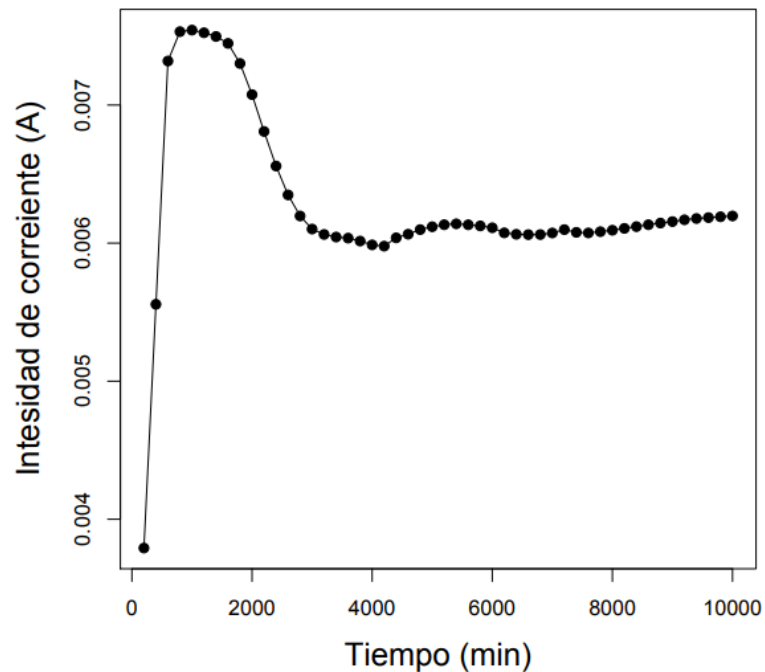


Figura 20 Resultados de la determinación de intensidad de corriente.

### Determinación de la potencia

Definimos a la potencia como la cantidad de energía entregada o absorbida por un elemento en un tiempo determinado y se expresa en Watts. La curva de la potencia se observa en la figura 21 donde se observa el mismo comportamiento que los otros gráficos. Normalmente los investigadores del área obtienen los datos de potencia con el solo fin de obtener la densidad de potencia, que es un valor mucho más específico debido a que toma en cuenta el área del ánodo. Según Logan, el desempeño total de una celda es evaluada de muchas maneras, pero principalmente a través de la potencia (9)

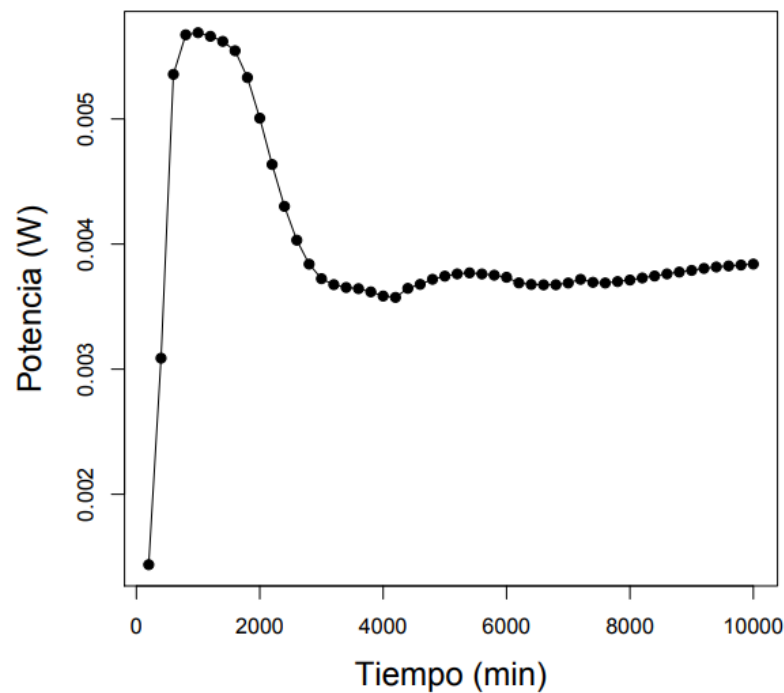


Figura 21 Resultado de la determinación de la potencia.

### **Determinación de la densidad de la potencia**

La densidad de potencia es uno de los parámetros más importantes a evaluar en una celda de combustible microbiana debido a que describe específicamente el desempeño de la MFC. Además, es un parámetro que permite comparar diseños de celdas debido a que normaliza los datos de potencia proyectándolos a la superficie del ánodo, ya que allí es donde ocurren las reacciones biológicas. La máxima densidad de potencia que registró es de  $4.5 \text{ w/ m}^2$  en el sistema armado. Como se muestra en un reporte científico realizado por Li-Chun Wu (73) usando el mismo microorganismo teniendo un rendimiento de  $0.1213 \text{ w/ m}^2$

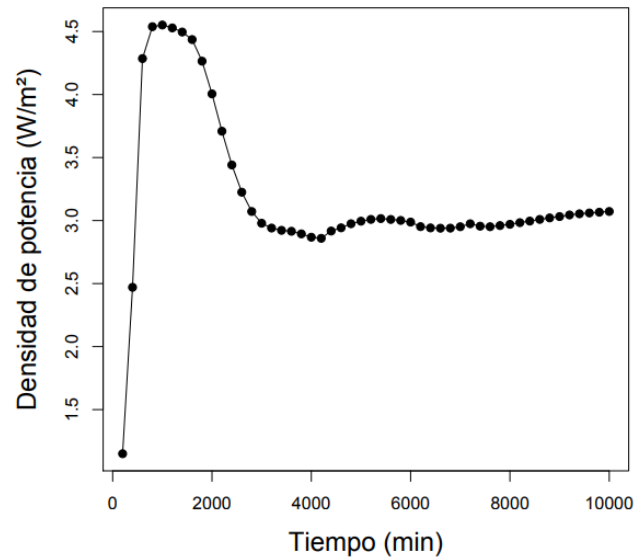


Figura 22 Muestra la densidad de potencia con relación al tiempo.

### Determinación de densidad de corriente

Un parámetro altamente evaluado en el área de celdas de combustible microbianas es la densidad de corriente, que indica la corriente producida por  $m^2$  de electrodo. Se muestra una densidad de corriente con un pico de 6.0 amperios/ $m^2$  mostrando después de los 2000 minutos una constante. En tanto (76) Sun y et al.(2015) con la cepa *Geobacter Sulfurreducens* obtuvieron una densidad de corriente máxima de  $(690 \pm 30) mA/m^2$ , teniendo al acetato como sustrato, así como (77) utilizaron glicerol para la producción de biodiesel en una Celda de Combustible Microbiana generando electricidad como producto agregado utilizando cultivo mixto y una cepa pura( *E. coli* W3110- ATCC27325) para su evaluación, donde el primer cultivo mixto generó una densidad máxima de potencia de  $11.7 mW/m^2$  y la de cepa de *E.coli* 3110 genero  $9.8mW/m^2$  , como las referencias antes descritas se pueden encontrar otras similares han realizado estudios sobre la capacidad electrogénica de diferentes cepas bacterianas.

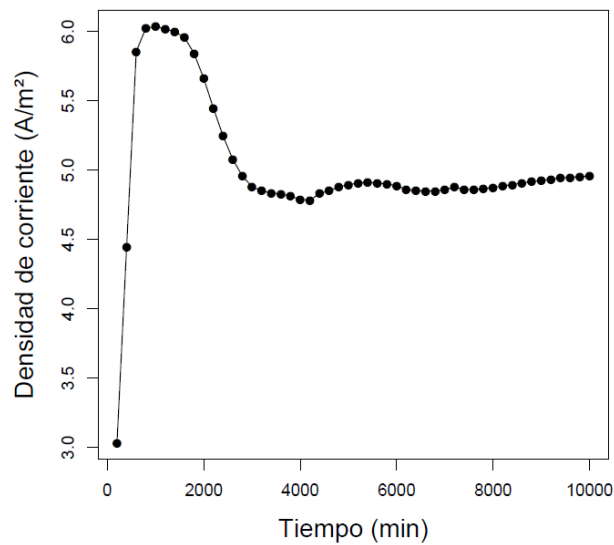


Figura 23 Muestra la densidad de corriente con relación al tiempo.

### Determinación de la energía total producida

Este parámetro permitió observar los Joules de energía que producidos en la celda, en este resultado se reporta la máxima cantidad de energía total producida. En la figura 25 muestra un diagrama de caja de bigotes. La parte rectangular de la gráfica se extiende desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior cubriendo la mitad central de la energía total producida, La línea central dentro de cada caja indica la localización de la mediana de los Joules producidos, los bigotes se extienden desde la caja hasta los valores mínimo y máximo. Los puntos alejados son aquellos que quedan a más de 1.5 veces del rango intercuartílico por arriba o por debajo de la caja. Puntos muy alejados son aquellos que quedan a más de 3.0 veces el rango intercuartílico por arriba o por abajo de la caja, y se muestran como pequeños cuadrados con un signo más en su interior. En este caso, no hay puntos alejados ni puntos muy alejados.

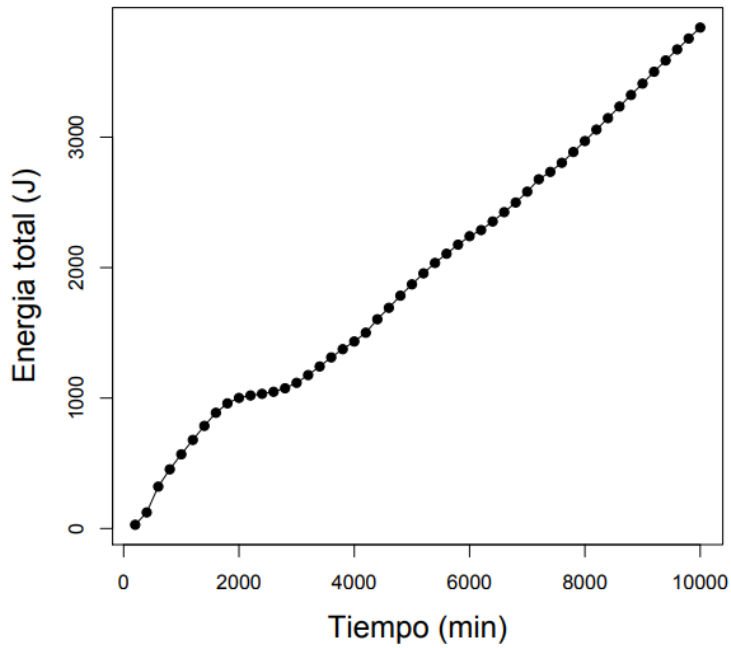


Figura 24 Muestra la relación entre la energía total y el tiempo.

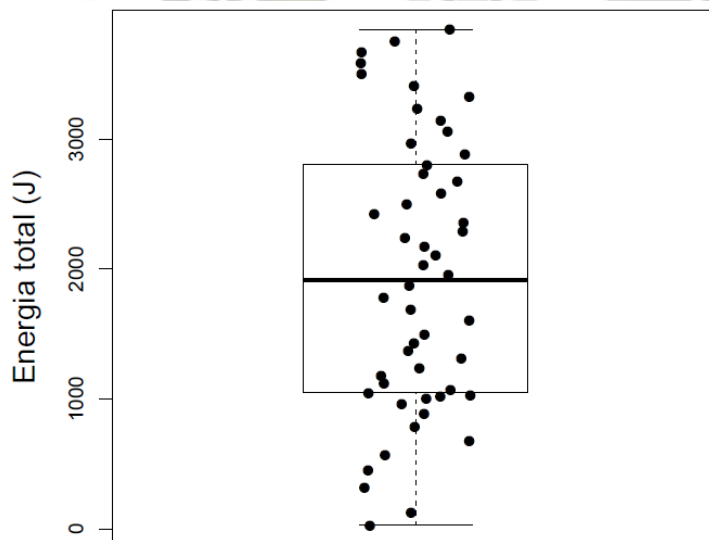


Figura 25 Diagrama de caja de Bigotes de la Energía Total Producida

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

#### Conclusiones

**Primero:** Se analizó el desempeño de la eficiencia para generar energía eléctrica de *E. faecium* en un sistema Bioelectroquímico

**Segundo:** Se implementó la celda de combustible microbiana a escala de laboratorio en dos cámaras concéntricas, tipo Batch con membrana de intercambio iónico Nafion 117 con un volumen de 480 mL.

**Tercero:** Se aisló, identificó y caracterizó morfológica y molecularmente un agente microbiano nativo *E. faecium* y se evaluó su desempeño bioelectroquímico.

**Cuarto:** Se evaluó el desempeño bioelectroquímico del agente microbiano obteniéndose 0,6 v de voltaje, 0.6 mA de intensidad de corriente, 4 mW de potencia, 3,5 W/m<sup>2</sup> de densidad de potencia, 5,3 A/m<sup>2</sup> de densidad de corriente y 3 kJ de energía producida funcionando el sistema de manera continua.

#### Sugerencias

**Primero:** Se recomienda usar una celda de combustible microbiana de mayor tamaño para poder generar mejor electricidad.

**Segundo:** Se recomienda probar con distintos tipos de inóculo en futuras investigaciones, con el fin de generar mejor producción eléctrica.

**Tercero:** Se recomiendo probar con temperaturas optimas de crecimiento de la bacteria para ver Si hay un mejor desempeño.

**Cuarto:** Se recomienda evaluar el sistema Bioelectroquímico a mayor volumen de área de electrodo para tener mayor cantidad de rendimiento eléctrico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luzzi A,B,aMM. Reasearch Towards the Realisation of Hydrogen Energy Systems.. Nature. 2004 Jul; 414(353).
2. DU Z. A estate of the art review on microbial fuel. Revista Científica: Biotechnology. 2007 May; 25(464-482).
3. B L. Microbial Fuel Cells. Hoboken. 2008 Aug; 5(1).
4. Al-Gwaiz M(GM, Chao X(X, Wu O(OQ. Understanding How Generation Flexibility and Renewable Energy Affect Power Market Competition. M&SOM-MANUFACTURING & SERVICE OPERATIONS MANAGEMENT. 2016 Feb; 19(1).
5. Mansoorian H(HJ, Mahvi A(AH. Evaluation of dairy industry wastewater treatment and simultaneous bioelectricity generation in a catalyst-less and mediator-less membrane microbial fuel cell. JOURNAL OF SAUDI CHEMICAL SOCIETY. 2016 Jan; 20(1 (88-100)).
6. Mastwijk H(HC), Timmermans R(RAH), Van Boekel M. The Gauss-Eyring model: A new thermodynamic model for biochemical and microbial inactivation kinetics. FOOD CHEMISTRY. 2017 DEC; 237(331-341).
7. Boylestad RL. Introduccion Al Analisis De Circuitos Edicion 10 Robert L. Boylestad". Instituto Tecnológico y tic Estudios Superiores de Monterrey. 2004 Dec; 1(4).
8. Charles K. Alexander MNOS. Fundamentos de los Circuitos Electricos. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES. 2006 Ag; 3(1).
9. Bruce E Logan BHRRUSJKS. Microbial fuel cells: methodology and technology. Environmental science & technology. 2006;; p. 5181-5192.
10. Sleutels T. H. J. A. HHVM,RRA,BCJN. Ion transport resistance in Microbial Electrolysis Cells with anion and cation exchange membranes. Hydrogen Energy. 2009 Abr; 34(3612-3620).
11. Pant D,VBG,DL,aVK. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. Bioresource Technology. 2010 Sep; 101(1533-1543).
12. m.a. niño galeano clsdaltjrr. consideraciones de caracterización de una celda de combustible con electrodo de grafito de platino y membrana de intercambio protónico pem. 2007;; p. 1.

13. DoE U. FCT Fuel Cells for Transportation. 2009;: p. 1.
14. keller J,aRK. Experiences from MFC pilot plant operation. USA;: 2008.
15. Logan HR. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. environmental Science Technology. 2006;: p. 40.
16. Dutta. RYaK. Spontaneous electrochemical removal of aqueous sulfide. water reseach. 2008;: p. 42.
17. Rabaey K,LG,SSD,aVW. microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. Biotechnology Lett. 2003;: p. 25, 1531-1535.
18. Rabaey Kea. Microbial Fuel Cells for Sulfide Removal. Environmental Science & Technology. 2006 dec; 40(17).
19. Oh S,MB,aLBE. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. Environment Science Technology. 2004 Feb; 38(4900-4904).
20. Logan BE,aRJM. Microbial fuel cells--challenges and applications. Enviorement Science Technology. 2006b Jan; 40(5172-5180).
21. Min B. CS,aLBE. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. Water Research. 2005 Jan; 39(1675-1686).
22. Min. B,aLB. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. Environ. Sci, Technol. 2004 May; 38(5809-5814).
23. Aelterman P,RK,HTPBN,aVW. Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. Environmental Science & Technology. 2006 Jan; 40(3388-3394).
24. Zuo Y,XD,RJM,aLBE. Isolation of the exoelectrogenic bacterium Ochrobactrum anthropi YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. Appl. Environ. Microbiol. 2008 Aug; 74(3130-3137).
25. Scott K,CI,HD,LJB,aBD. Power from marine sediment fuel cells: the influence of anode material. Journal of Applied Electrochemistry. 2008 Jan; 38(1313-1319).
26. Wrana N. SR,CN,LDB. Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrodrigenesis. Journal clean. 2010 Feb; 18(105-111).
27. Oh S.T. KJR,PGC,LTH,KC,SWT. Sustainable wastewater treatment: How might microbial fuel cells contribute. Biotechnol. Adv.. 2010 mar; 28(871-

- 881).
28. Min B,SCyBEL. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research*. 2005;; p. 39.
  29. Du Z,HLyTG. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 2007;; p. 42.
  30. Li WW,GPSXWLyHQY. Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*. 2011;; p. 244-252.
  31. Borole AP,CYHTVDLyCA. Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;; p. 71-80.
  32. Huang L. JMRyXQ. Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*. 2011;; p. 316-323.
  33. Sharma VyPPK. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010;; p. 179-188.
  34. Reimers CE,TLM,FS,aWW. Harvesting Energy from the Marine Sediment–Water Interface. *Environmental Science Technology*. 2000;; p. 192-195.
  35. Rabaey K,LG,SSD,aVW. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency.. *Biotechnol. Lett.*. 2003 jan; 25(1531-1535).
  36. Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science*. 2002;; p. 483-485.
  37. Oh, S.-E., and Logan, B.E. Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;; p. 70,162-169.
  38. LIU H,Yo. Technol.,Power generation in fed- batch microbial fuel cell as a function of ionic strength temperature, and reactor configuration. *Environ. Sci. Technology*. 2005 Jun; 39(5488-5493).
  39. Pant D,VBG,DL,aVK. review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*. 2010;; p. 101.

40. Ter Heijne A,HHV,dWV. A Bipolar Membrane Combined with Ferric iron reduction as an alternative for platinum-based cathodes in microbial fuel cells. *Environmental Science Technology*. 2006;; p. 40.
41. Logan B.E. CD,CS,HHVM,STHJA,JAW,RRA. Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter. *Environ. Science Technology*. 2008;; p. 42.
42. Harnisch, F. y Schroder, U. Selectivity versus mobility: Separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem*. 2009;; p. 2,921-926.
43. Zhang X. Preparation and characterization of proton exchange membranes for direct methanol fuel cells. Ph.D. Thesis. España: Universitat Rovira I Virgili, Department of Chemical Engineering; 2005. Report No.: 1.
44. Wei J. LP,HX. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour technology*. 2001;; p. 102.
45. Rozendal R.A. HHVM,RK,KJ,BCJN. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnology*. 2008;; p. 450-459.
46. Rismani-Yazdy Hyoca. Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. *Bioresource Technology*. 2011;; p. 278-283.
47. Wang C,WCyRH. Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010;; p. 7217-7223.
48. Luo Y,RZGLJLMLyCZ. Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;; p. 759-764.
49. Hoyos B.A. AIRyCMM. Ánodos de Pt-Ru y Pt-Ir para celdas de combustible alimentadas con metano y propano directo. *Información Tecnológica*. 2007;; p. 41-46.
50. Ramirez N,AROAYRC. , Espectroscopia de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico. *Biotecnología aplicada*. 2009 Jan; 26(65-71).
51. Chang I.S. MH,BO,JJK,PHI,NKH,KBH. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006 Apr; 16(163-177).

52. Reguera Gyoca. Biofilm and nanowire production leads to increases current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied Environmental Microbiology*. 2006 Sep; 72(7345-7348).
53. Rosenbaum M,FAMVyLA. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved. *Bioresource Technology*. 2011 mar; 102(224-233).
54. Rittmann B. Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2006 marz; 24(261-268).
55. LOVLEY D,R. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs and more. *Geobiol. Extracellular*. 2008 Jun; 6(225-231).
56. Huang L. JM,RyXQ. Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Biosurce Technology*. 2011 Jun; 102(1)(316-323).
57. Zhang Z. SS,WL,aMW. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;: p. 7(1-2):203-14.
58. Liu Z. LJ,ZS,SZ. Study of operational performance and electrical response on. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;: p. 45.
59. Sharma YyBL. Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC). *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010 jan; 35(3789-3797).
60. Shimoyama Tyoca. Electricity generation from model organic wastewater in a cassette-electrode microbial fuel cell. *Applied Microbiological Biotechnology*. 2008 jan; 80(325-330).
61. Luo Y,RZGLJLMLyCZ. Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*. 2010 mar; 176(759-764).
62. Pant D,VBG,DL,aVK. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production.. *Bioresource Technology*. 2010 jun; 101(1533-1543).
63. Sharma Y,yBL. Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC. *Applied Microbiological Biotechnology*. 2008 Apr; 80(325-330).
64. Liu W. HS,ZA,WA. Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge. *J. Hydrogen*. 2012

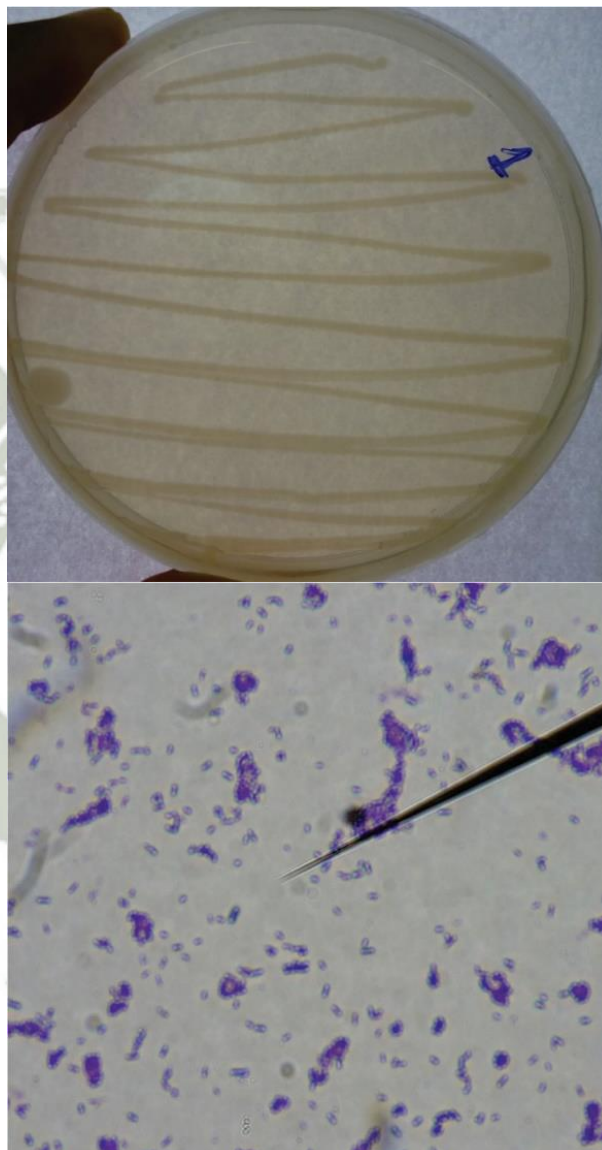
- ene; 37(13859-13864).
65. Watanabe K. Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008 Jan; 6(528-536).
  66. Bretschger O,JBOWEPSIyKEN. Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. *Microbial Ecology*. 2010 Jun; 59(415-427).
  67. Onggo SPaH. Effect of various concentration of Sulfuric acid for Naftion Membrane Activation on the Performance of Fuel Cell. Research center for Physics, indonesian institute of sciences (LIPI). 2015;; p. 1711 (1-6).
  68. Kim J.R. MB,LBE. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005 oct; 68(23-30).
  69. Morgulis A. CG,RY,MTL,AR,SAA. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*. 2008;; p. 24:1757-1764.
  70. Sievers F. WA,DDG,GTJ,KK,LW,LR,MH,RM,SJ,TJD,HD. Molecular Systems Biology. Article number: doi:10.1038/msb.2011.75. 2011;; p. 539.
  71. Goujon M MHLWVFSSPJLR. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI doi:10.1093/nar/gkq313. *Nucleic acids research*. 2010;; p. 38 Suppl: W695-9.
  72. McWilliam H. LW,UM,SS,PYM,BN,CAP,LR. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI.. *Nucleic acids research*. 2013;; p. 41(Web Server issue):W597-600 doi:10.1093/nar/gkt376.
  73. Jiahuan Tang TLYYaLZ. Effective Control of Bioelectricity Generation from a Microbial. Hindawi Publishing Corporation. 2014;; p. 1-8.
  74. Li-Chun Wu1 aCHHHWaYCC. High Bioelectricity Generation by Microbial Fuel Cells (MFCs) Inoculated. *Advanced Materials Research*. 2014;; p. 838-841.
  75. Hassan M(MA. A promising N-doped carbon-metal oxide hybrid electrocatalyst derived from crustacean's shells: Oxygen reduction and oxygen evolution. *envioment. technol*. 2010 sept; 38(185-189).
  76. Sun G. SD,TA,DG,FD,MAS. Inocula selection in microbial fuel cells based on anodic biofilm abundance of *Geobacter sulfurreducens*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2015;; p. 24 (3), 379-387.

77. Reiche A.,Kirkwood K.M. Comparison of Escherichia coli and anaerobic consortia derived from compost as anodic biocatalysts in a glycerol-oxidizing microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2012;; p. 123,318–323.
78. Ghangrekar. *ciencias ambientales Inglaterra*: X; 2011.
79. valero tv. *diseño de una celda de MFC Chile* : Chile ; 2012.

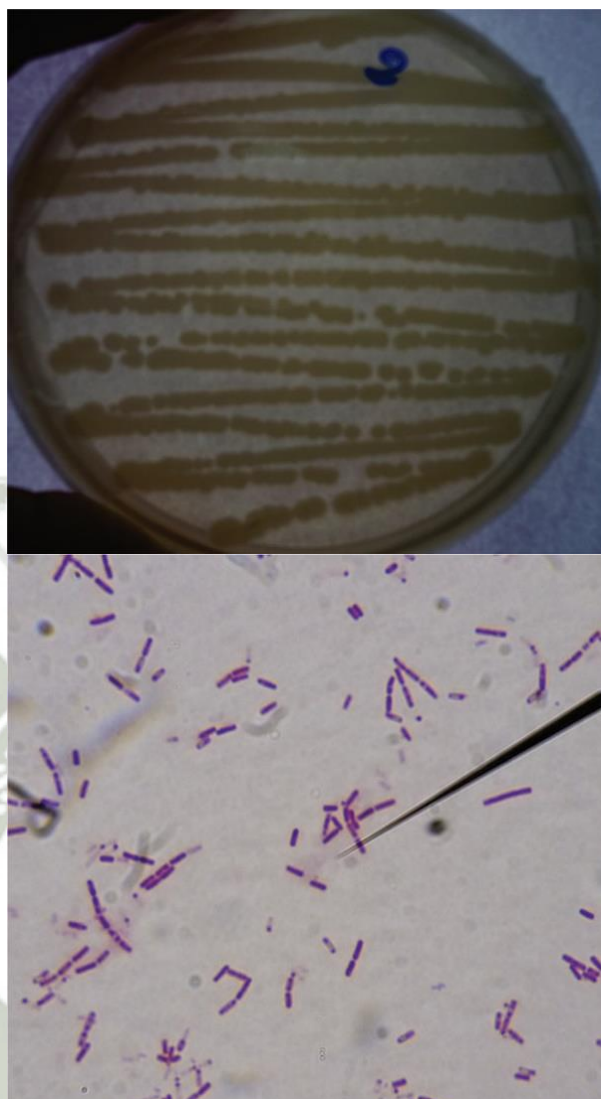


## ANEXOS

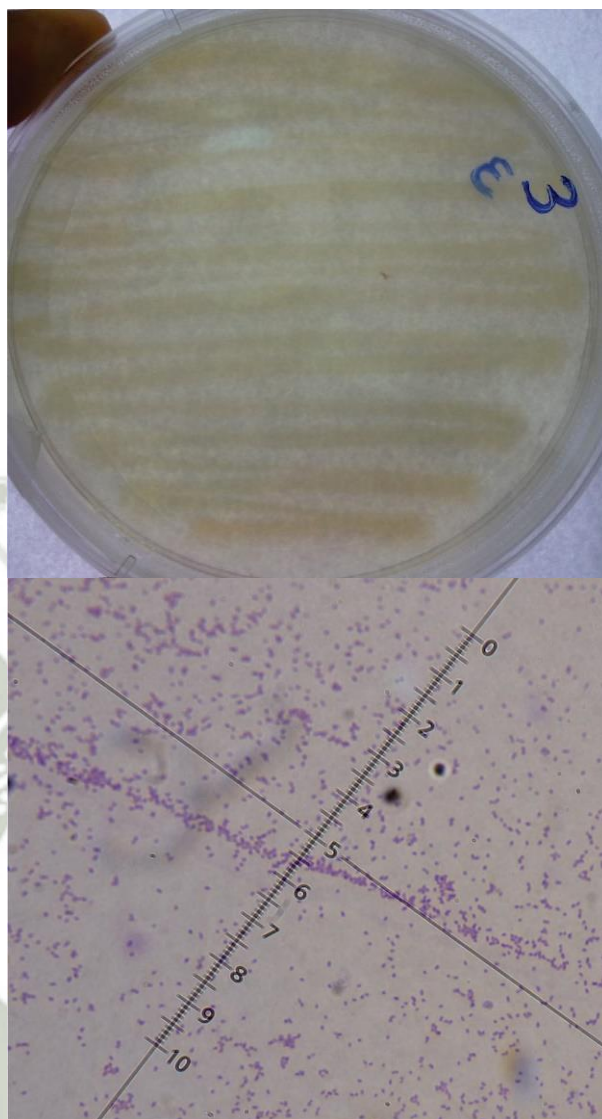
**Anexo 1: cepas aisladas y caracterizadas morfológicamente a partir de la materia orgánica.**



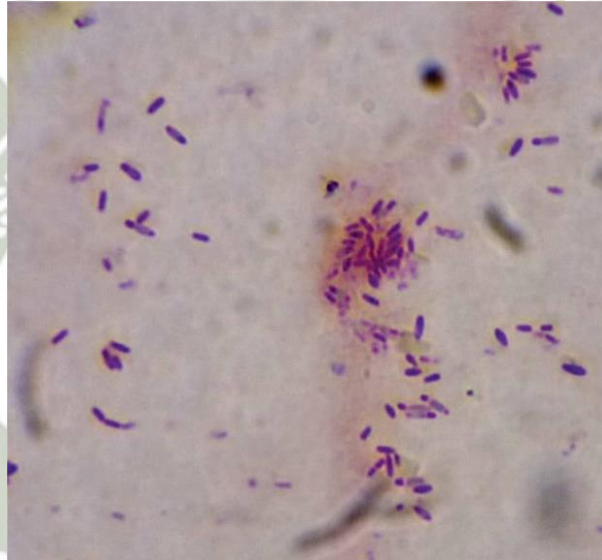
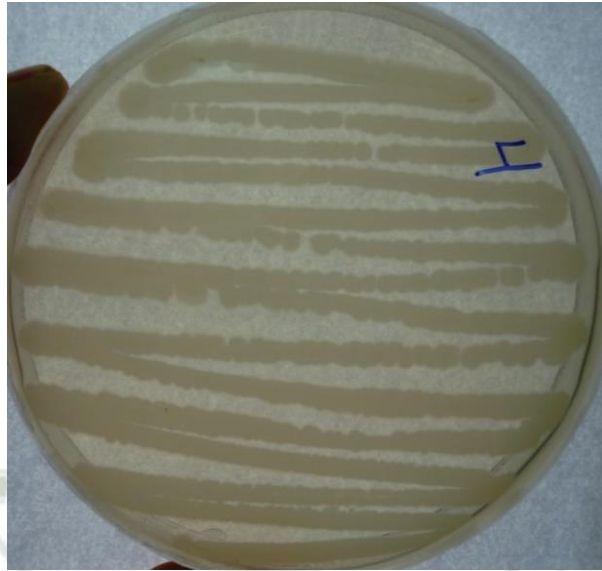
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Forma de Colonia: Ovalada Color de Colonia: Crema	Bacilos Gram +	SI



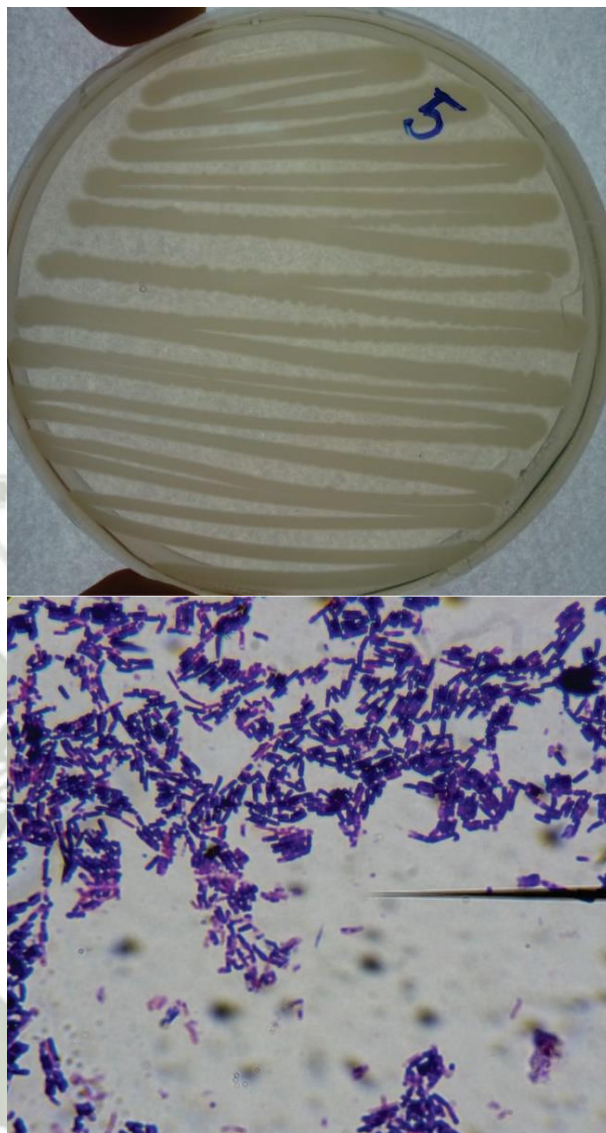
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Forma de Colonia: Ovalada Color de Colonia: Crema	Bacilos Gram +	SI



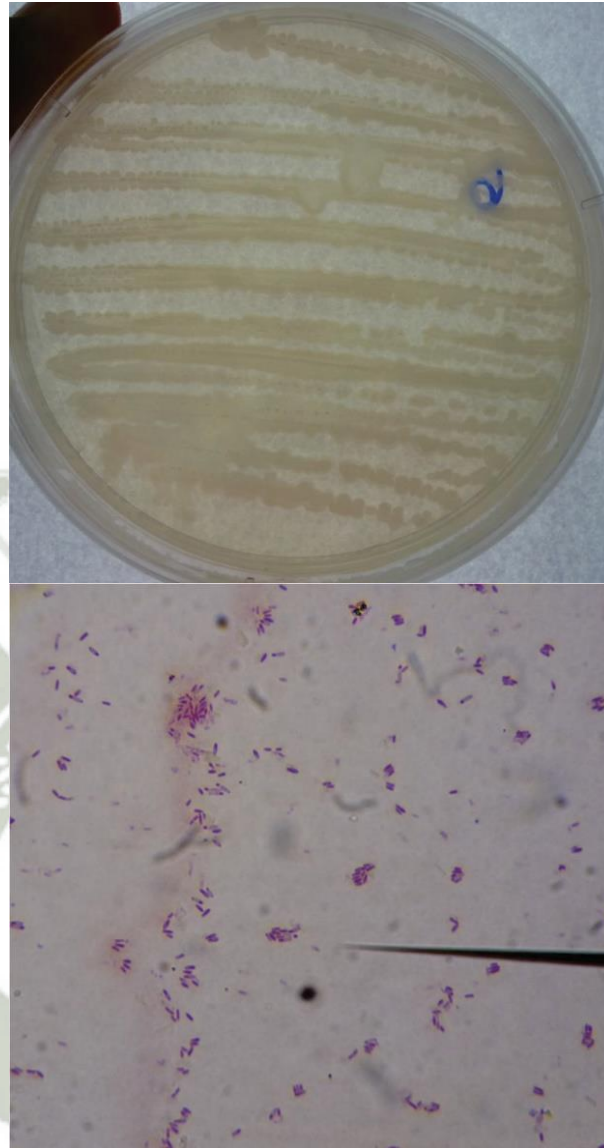
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Forma de Colonia: Puntiforme Color de Colonia: Verde	Cocos Gram +	SI



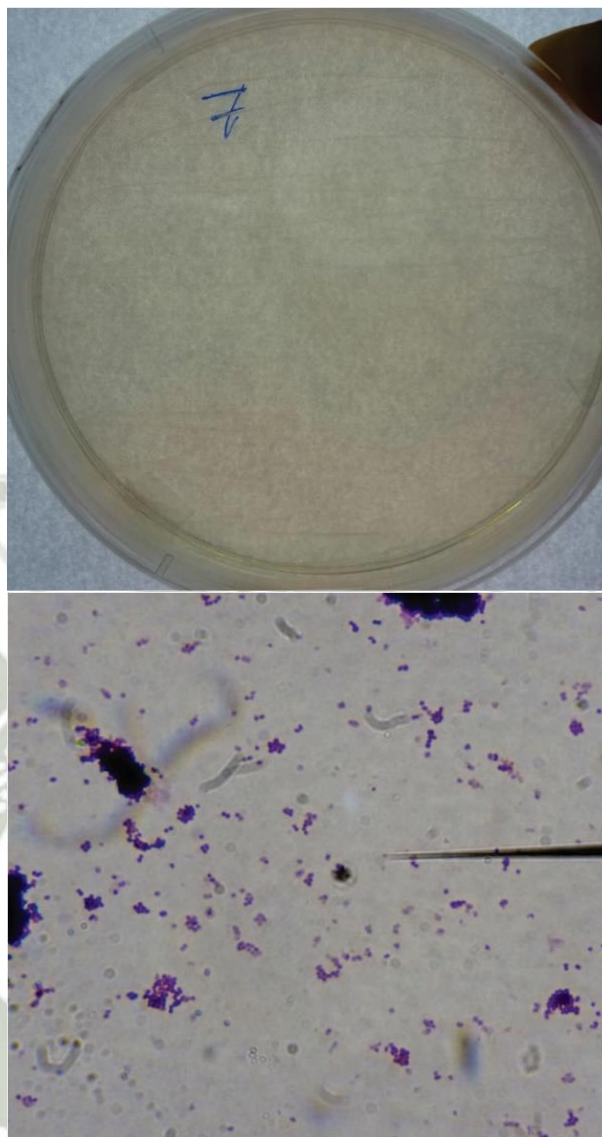
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Porcino Forma de Colonia: Ovalada Color de Colonia: Crema	Bacilos Gram -	SI



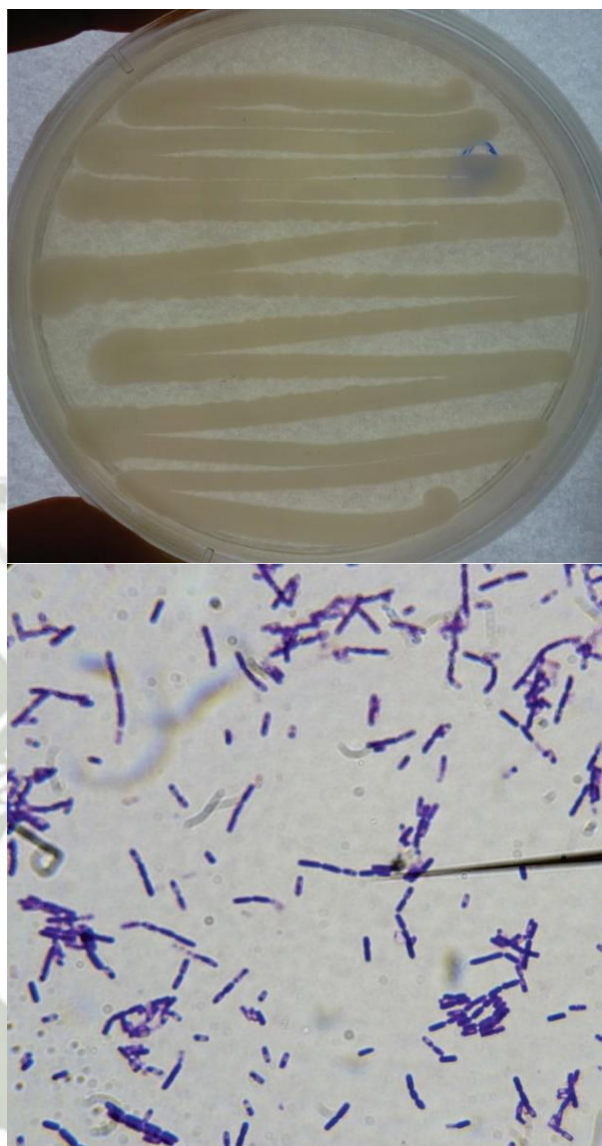
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Porcino Forma de Colonia: Ovalada Color de Colonia: Blanca	Streptobacilos Gram +	SI



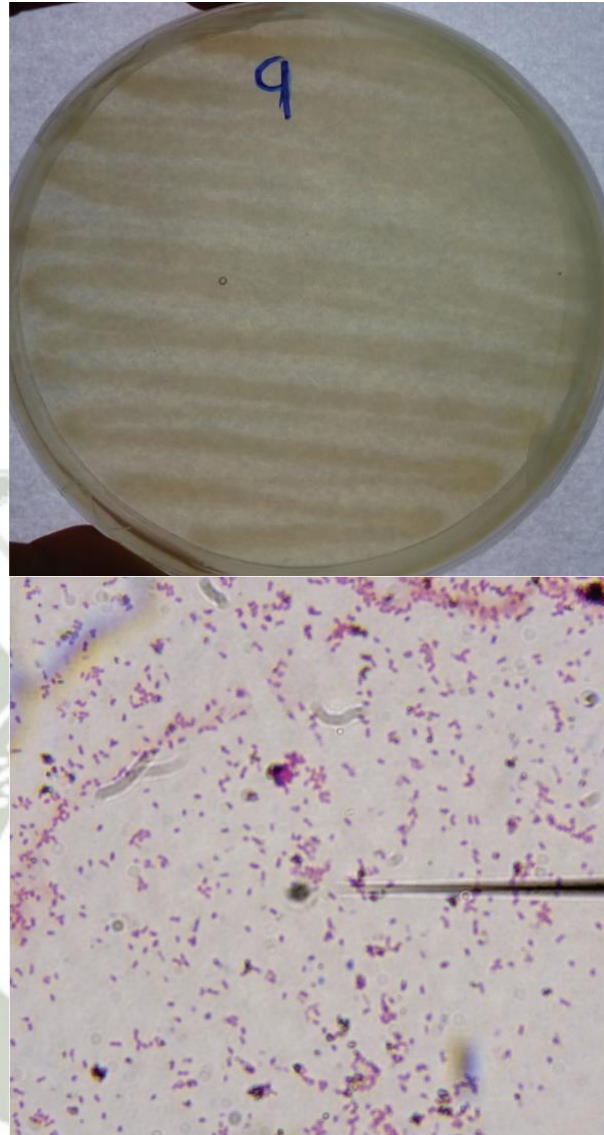
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Porcino Biomasa: Porcicola Forma de Colonia: Cerebroide Color de Colonia: Blanca	Bacilos Gram -	SI



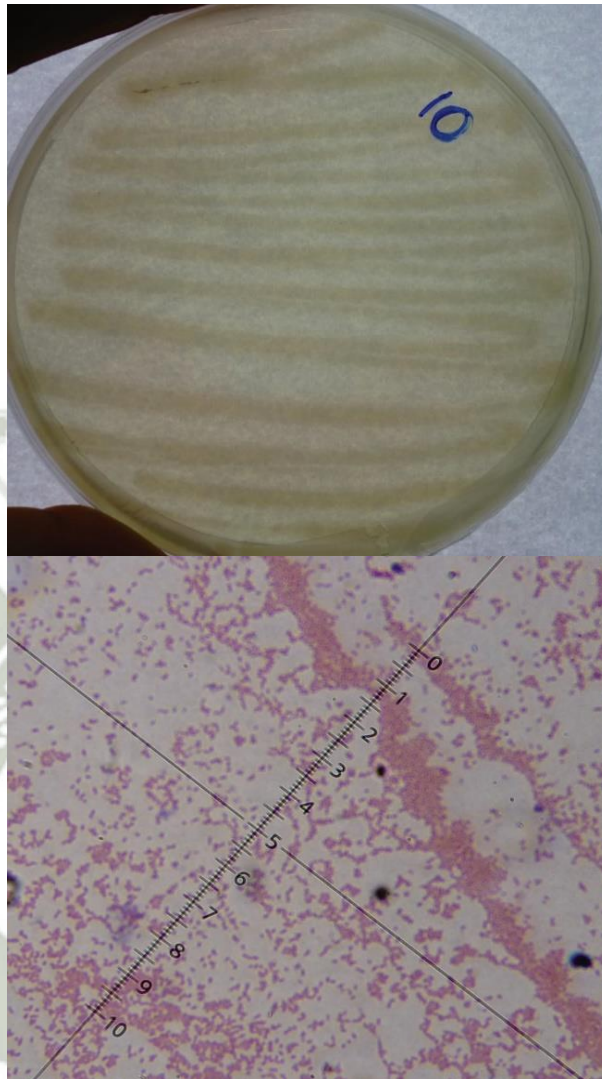
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Porcino Biomasa: Porcicola Forma de Colonia: Lineal Color de Colonia: Crema	Cocos Gram +	SI



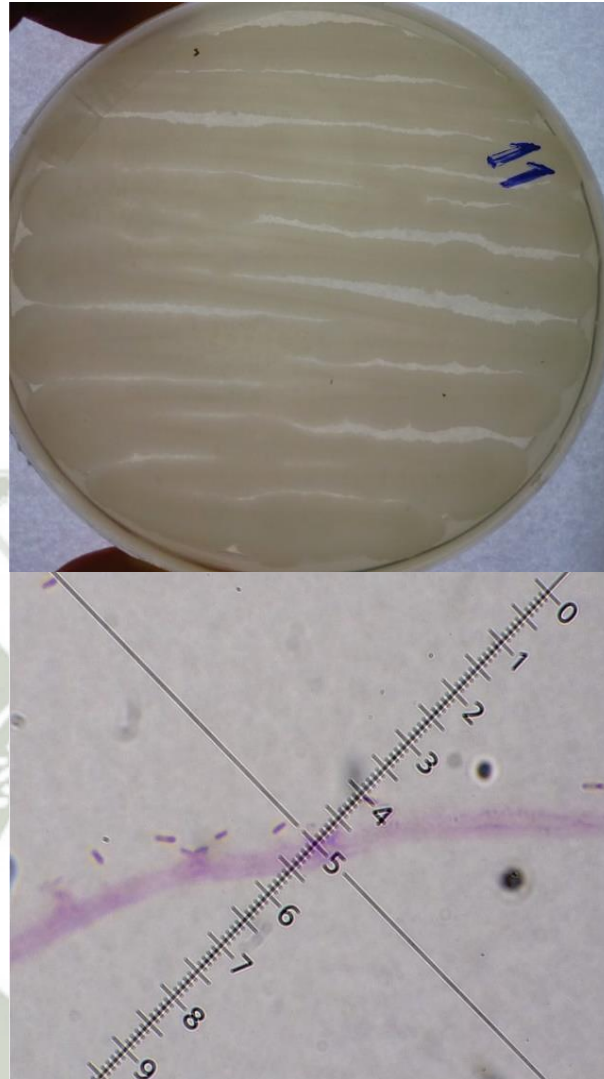
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Porcino Biomasa: Porcicola Forma de Colonia: Puntiforme Color de Colonia: Verde	Streptobacilos Gram +	SI



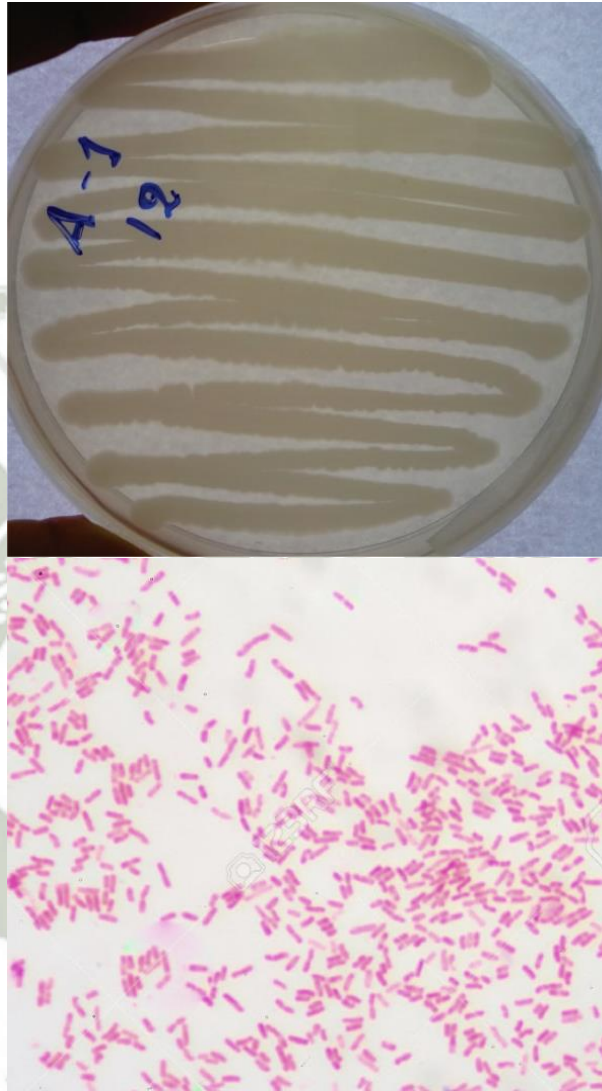
Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Forma de Colonia: Puntiforme Color de Colonia: Roja	Cocos Gram +	SI



Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Forma de Colonia: Puntiforme Color de Colonia: Verde	Micrococos Gram -	SI



<b>Placa</b>	<b>Tinción</b>	<b>Anaerobia Facultativa</b>
Biomasa: porcicola Forma de Colonia: Ovalada Color de Colonia: Crema	Bacilos Gram +	SI



Placa	Tinción	Anaerobia Facultativa
Biomasa:porcicola Forma de Colonia: Ovalda Color de Colonia: Blanca	Bacilos Gram -	SI

Anexo 2 Diseño en programa Autocad previo al ensamblaje de la CCM

