



c i d e t e q

CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO  
EN ELECTROQUÍMICA, S.C.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDOS  
HÚMICOS EN EL FUNCIONAMIENTO DE CELDAS DE  
COMBUSTIBLE MICROBIANA.

# Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

*Doctorado en Ciencia y Tecnología  
en la Especialidad de Ingeniería Ambiental*

PRESENTA

M. en C. Catalina González Nava



Santiago de Querétaro, Qro., México, Julio del 2016.

## RESUMEN

Las celdas de combustible microbianas (CCM's) son sistemas bioelectroquímicos capaces de producir energía eléctrica a partir de la degradación de materia orgánica, representando una alternativa ante la limitada disponibilidad de combustibles fósiles y en el tratamiento de residuos. El presente trabajo muestra los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la adición de ácidos húmicos en el funcionamiento de las CCM. Iniciando con el análisis de diferentes materiales carbonaceos para su uso como bioánodos. Se encontró que la tela de carbón genera una mayor producción de densidad de potencia comparada con el fieltro de carbón y que en este material se adhiere una mayor cantidad de microorganismos formando una biopelícula. Posteriormente, se realizó la caracterización microbiana de la biopelícula formada, en este estudio se encontró que a partir de un sedimento de lodos activados es posible obtener una biopelícula electroactiva en la que se encontró predominantemente microorganismos del género *Pseudomonas*, probablemente contribuyendo en gran parte a la generación de energía. A continuación se evaluó la adición de ácido húmico (AH) en la operación de la CCM, se encontró que con una concentración de 0.5 g/L de AH se obtiene un incremento en la potencia de la celda y a concentraciones mayores a 1 g/L de AH no se observó un efecto positivo ya que se puede estar formando una barrera a la transferencia de electrones o se pudieran formar pseudomicelas que disminuyen la disponibilidad de los grupos funcionales. En el estudio de las propiedades redox de los ácidos húmicos mediante técnicas electroquímicas, se encontró que los AH en soluciones acuosas no presentan señales de oxidación y reducción bien definidas, sin embargo, se observa un incremento de corriente como resultado de la oxidación y reducción del electrolito, este incremento en la corriente fue mayor a pH 10 y al incrementar la concentración de AH, a concentraciones mayores a 1g/L ya no se observa este incremento, y finalmente se analizó por espectroscopia de impedancia electroquímica el efecto del ácido húmico en las CCM, donde se encontró que el AH concentra una cantidad de acetato y nutrientes para hacerlos más biodisponibles a los MO.

## ABSTRACT

The microbial fuel cells (MFC's) are bioelectrochemical systems capable of producing electrical energy from the degradation of organic matter. It represent an alternative to the limited availability of fossil fuels and waste treatment. This research show the results obtained in the study of the effect of the addition of humic acids in the MFC operation. The analysis of various carbonaceous materials for bioanodes showed that the growth of biofilm was developed on the surface material, the carbon cloth generates higher output power density compared to the carbon felt and in this material more microorganisms adhere. Subsequently, microbial characterization of the biofilm was made, in this study it was found that from activated sludge is possible to obtain an electroactive biofilm in which predominantly we found *Pseudomonas* and these could be attributed mainly power generation. In the addition of humic acid (HA) in the operation of the MFC was found that with a concentration of 0.5 g/L HA increased and with a concentration greater than 1 g/L is not obtained a positive effect in the power of the cell, may be it is forming a barrier to electron transfer or it is forming pseudomicelles that reduce the availability of functional groups. In the study of the redox properties of humic acids by electrochemical techniques, it was found that HA in aqueous solutions no signs of oxidation and reduction was found, however, a current increase as a result of oxidation and reduction of the electrolyte was observe, this increase in current was greater than pH 10 and to increase the concentration of HA. At concentrations greater than 1g/L this increase was no longer observed, and finally the effect of humic acid was analyzed by electrochemical impedance spectroscopy in MFC, where it was found that the humic acid concentrated acetate and nutrients to make them more bioavailable to the microorganism.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor el Dr. Francisco Rodríguez Valadez por todo el apoyo otorgado, su paciencia, orientación y motivación fueron fundamentales, para poder cumplir esta meta.

Al Dr. Luis Godínez Mora-Tovar, mi coasesor, por compartir sus conocimientos, por su orientación durante toda mi estancia en CIDETEQ, en verdad muchas gracias.

Al Dr. Juan Manríquez Rocha y la Dra. Erika Bustos Bustos, que compartieron conmigo sus conocimientos y tips, por el tiempo de asesoría incondicional, un profundo agradecimiento.

A todos mis revisores de tesis, el Dr. Juan Campos Guillén, Dra. Vanessa Vallejo Becerra, Dra. Bibiana Cercado y Dr. Gerardo Arriaga Hurtado por su tiempo, dedicación y apoyo.

A todos los compañeros y trabajadores en CIDETEQ que me apoyaron técnicamente pero sobre todo que hicieron mi estancia una experiencia inolvidable: Orlando, Jenny, Ricardo, Alma, Marcos, Sacc, Kiri, Juan David, Liz, Brenda, Hugo, Cecy, Itzel, Beto, y Prior que compartieron su tiempo y me dieron su amistad, mil gracias siempre estarán en mi mente y corazón.

A Dios por bendecir mi camino todos los días, por la salud que me permitió completar esta meta, por darme humildad y sabiduría para conducirme en la vida, y por darme una familia tan hermosa y unida que me apoyó en todo momento.

A Mi esposo Jorge y a mis hijos Valentina y Gustavo, que tuvieron comprensión y paciencia todo el tiempo, gracias por todo su amor, son mi inspiración y motor para seguir adelante. Gracias Jorge por compartir conmigo cada momento, por estar en las buenas y las malas, por tus consejos, simplemente te amo y te dedico esta meta con todo mi corazón.

A mis padres José Merced y Catalina por todo su apoyo, su confianza, por impulsarme a ser una mejor persona, por instruirme y motivarme a seguir adelante, gracias por la vida misma, y por el amor. A mi hermana Rosalba y Sobrinas Rosalbita y María Andrea, por acompañarme y compartir este logro, las quiero mucho a las tres.

A mi segundos padres Pepe y Cristina, que me han apoyado siempre incondicionalmente, gracias por cuidar de mis hijos, por ver por ellos y ayudarme a educarlos, un sincero agradecimiento eternamente.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
INDICE DE FIGURAS .....	8
INDICE DE TABLAS .....	11
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	12
II. JUSTIFICACIÓN .....	15
III. HIPÓTESIS .....	17
IV. OBJETIVOS .....	17
a. Objetivo general	
b. Objetivos específicos	
<b>CAPÍTULO I ESTUDIO DE DIFERENTES MATERIALES CARBONACEOS PARA SU USO COMO BIOANODOS.....</b>	<b>18</b>
1.1 Resumen .....	18
1.2 Introducción.....	18
1.3 Metodología experimental.....	19
1.3.1 Configuración y operación de la CCM.....	19
1.3.2 Caracterización de los electrodos de carbón.....	21
1.3.3 Caracterización de la biopelícula en diferentes electrodos de carbón .....	22
1.3.4 Análisis electroquímicos.....	23
1.4 Resultados y discusión.....	23
1.4.1 Caracterización de los electrodos de carbón.....	23
1.4.2 Formación de la biopelícula sobre diferentes materiales de carbón .....	25
1.4.3 Micrografías SEM de la estructura de la biopelícula sobre diferentes materiales de carbón .....	26

1.4.4 Evaluación del desempeño de la biopelícula en las CCM's .....	28
1.5 Conclusiones.....	33

**CAPÍTULO II FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA DE LA BIOPELÍCULA UTILIZANDO UN SEDIMENTO DE LODOS ACTIVADOS..... 34**

2.1 Resumen .....	34
2.2 Introducción.....	34
2.3 Metodología experimental.....	36
2.3.1 Formación de la biopelícula.....	36
2.3.2 Desarrollo de análisis electroquímicos .....	36
2.3.3 Análisis de la comunidad microbiana.....	36
2.4 Resultados y discusión.....	38
2.4.1 Formación de la biopelícula.....	38
2.4.2 Análisis del desempeño de la celda de combustible microbiana con la biopelícula... 40	
2.4.3 Identificación microbiana .....	42
2.5 Conclusiones.....	45

**CAPÍTULO III EFECTO DEL ÁCIDO HÚMICO EN LA OPERACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS..... 46**

Resumen .....	46
3.1 Introducción.....	46
3.2 Metodología.....	47
3.2.1 Obtención de la biopelícula .....	47
3.2.2 Evaluación del efecto de la adición de ácido húmico.....	47
3.2.3 Análisis electroquímicos.....	48

3.3 Resultados y discusión.....	48
3.3.1 Efecto del ácido húmico en la generación del voltaje .....	50
3.3.2 Efecto del ácido húmico en la generación de potencia.....	51
3.3.3 Efecto del ácido húmico en los potenciales de electrodo y voltametría cíclica.....	52
3.4 Conclusiones.....	55

**CAPÍTULO IV ESTUDIO DE PROPIEDADES REDOX DE ACIDOS HUMICOS MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS .....**

4.1 Resumen .....	56
4.2 Introducción.....	56
4.3 Metodología experimental.....	57
4.3.1 Voltametría cíclica de ácidos húmicos .....	57
4.3.2 Cronopotenciometría de corriente nula de ácidos húmicos.....	58
4.4 Resultados y discusión.....	59
4.4.1 Efecto de la velocidad de barrido en el ácido húmico .....	59
4.4.2 Efecto de la concentración del ácido húmico .....	60
4.4.3 Efecto del pH en el ácido húmico.....	60
4.4.4 Análisis del efecto de la concentración mediante cronopotenciometría de corriente nula .....	62
4.5 Conclusiones.....	63

**CAPÍTULO V ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO HÚMICO EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS .....**

5.1 Resumen .....	65
5.2 Introducción.....	65
5.3 Metodología .....	66
5.3.1 Configuración y operación de la CCM.....	66
5.3.2 Análisis electroquímico .....	67

5.4 Resultados y discusión.....	68
5.4.1 Formación de la biopelícula y funcionamiento de la celda .....	68
5.4.2 Estudio del efecto del ácido húmico mediante espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	70
5.5 Conclusiones.....	76
V.    CONCLUSIÓN GENERAL.....	77
VI.   REFERENCIAS.....	78



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de una Celda de combustible microbiana (Rabaey y Vertraete, 2005). ...	12
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de transferencia de electrones, 1: contacto directo (formación de biopelícula), 2: Uso de mediadores redox, 3: Pilis del microorganismo (Pant <i>et al.</i> , 2010). ...	13
<b>Figura 3.</b> Estructura química del ácido húmico (Stevenson, 1994).....	14
<b>Figura 4.</b> Producción de energía en CCM, a través del tiempo. $\Delta$ = sistemas con el cátodo inmerso en agua, $\diamond$ = cátodo inmerso en sedimentos, $\square$ = cátodos expuestos al aire, $\circ$ = sustratos como glucosa y acetato (Logan y Regan, 2006).....	15
<b>Figura 1.1</b> Celda de combustible microbiana de dos cámaras usada en la experimentación ..	21
<b>Figura 1.2.</b> Materiales de carbón utilizados como electrodos en las CCM's .....	22
<b>Figura 1.3.</b> Espectro de Raman de los diferentes materiales de carbón, fieltro de carbón CF, tela de carbón CC1 y CC2 (a), y relación de la estructura cristalina y amorfa en los materiales de carbón (b).....	24
<b>Figura 1.4.</b> Monitoreo de voltaje durante el crecimiento de la biopelícula sobre diferentes materiales de electrodo. Tela de carbón 1 CC1, tela de carbón 2 CC2 y fieltro de carbón CF. ....	25
<b>Figura 1.5.</b> Imágenes SEM de diferentes materiales de carbón sin biopelícula (a) CC1, x25; (b) CC2, x25; (c) CF, x30; (d) CC1, x1000; (e) CC2 x1000; (f) CF, x1000 .....	27
<b>Figura 1.6.</b> Imágenes SEM de la biopelícula establecida sobre diferentes materiales de carbón (a) CC1, x25; (b) CC2, x25; (c) CF, x30; (d) CC1, x1000; (e) CC2, x1000; (f) CF, x1000....	27
<b>Figura 1.7.</b> Curvas de polarización y de potencia de las celdas con diferentes materiales de carbón en el ánodo.....	30
<b>Figura 1.8.</b> Voltametrías cíclicas de las biopelículas formadas en diferentes materiales de carbón, Tela de carbón 1 (CC1), tela de carbón 2 (CC2), fieltro de carbón (CF) .....	32
<b>Figura 2.1</b> Monitoreo de voltaje durante la formación de tres biopelículas electroactivas (BPE), utilizando un sedimento de lodos activados como inóculo y acetato como sustrato .....	39
<b>Figura 2.2</b> Curvas de polarización y de potencia de las biopelículas formadas en las CCM ..	40

<b>Figura 2.3</b> Voltametrías cíclicas características de biopelículas electroactivas Formadas .....	41
<b>Figura 2.4</b> DNA total extraído con cuatro protocolos de extracción (De izquierda a derecha M: Thermo Scientific generuler 1 Kb DNA ladder, 1: DNA purificado con protocolo ZR Fungal/Bacterial (Zymo Research), 2: Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research), 3: Fenol-Cloroformo 1:1 (V/V) (Yokoyama <i>et al.</i> 1999). y 4: Acetato de sodio con EDTA y lisozima a 37° (Varshney <i>et al.</i> 1991).....	42
<b>Figura 2.5</b> Abundancia relativa de filums presentes en la biopelícula .....	44
<b>Figura 2.6</b> Abundancia relativa de géneros microbianos encontrados en la biopelícula.....	45
<b>Figura 3.1</b> Monitoreo de voltaje Vs tiempo con acetato como sustrato y la adición de ácido húmico a una concentración de 0.5 1.0 y 1.5 g/L.....	49
<b>Figura 3.2</b> Curvas de potencia y curvas de polarización sin ácido húmico y a diferentes concentraciones de ácido húmico .....	51
<b>Figura 3.3</b> Voltametrías cíclicas de la biopelícula sin ácido húmico (Bco) y con ácido húmico, a) 0.5 g/L, b) 1.0 g/L, c) 1.5 g/L.....	54
<b>Figura 4.1.</b> Voltametría cíclica con ácido húmico a diferentes velocidades de barrido. pH 7 y concentración 0.5 g/L .....	59
<b>Figura 4.2.</b> Voltametrías cíclicas a diferentes concentraciones de ácido húmico a) ácido húmico Aldrich a 100 mV/s, b) ácido húmico Aldrich a 500 mV/s,c) ácido húmico IHSS a 100 mV/s, d) ácido húmico IHSS a 500 mV/s .....	61
<b>Figura 4.3</b> Voltametrías cíclicas de ácidos húmicos para estudiar el efecto del pH .....	62
<b>Figura 4.4</b> Cronopotenciometría de corriente nula del ácido húmico a diferentes concentraciones. ....	63
<b>Figura 5.1.</b> Monitoreo de voltaje durante la formación de la biopelícula. Las flechas indican la adición de acetato 10 mM.....	68
<b>Figura 5.2</b> Voltametría cíclica de la biopelícula electroactiva formada sobre la superficie del electrodo. ....	69

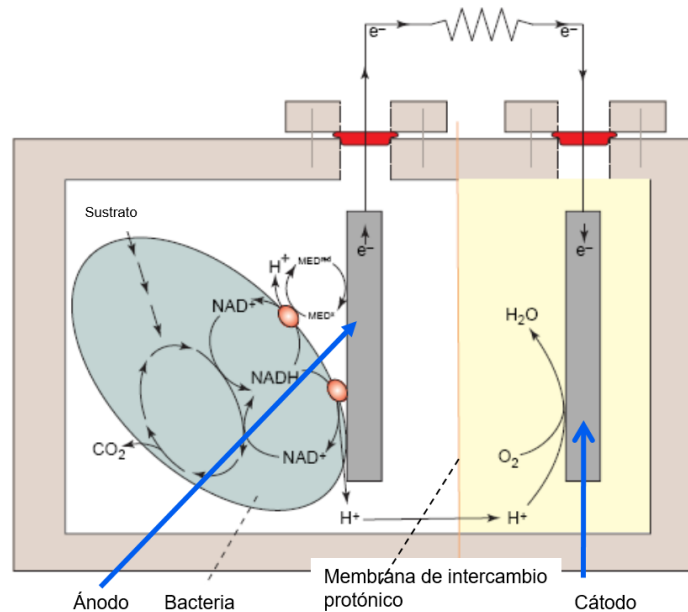
<b>Figura 5.3</b> Conexiones para el análisis de impedancia en celda completa .....	70
<b>Figura 5.4</b> Diagrama de ángulo de fase de la CCM con diferente composición del anolito Nutrientes (N), acetato (AcO), ácido húmico (AH), microorganismos (MO) .....	71
<b>Figura 5.5</b> Diagramas de impedancia de celda completa, (a) Diagrama de Bode de impedancia, (b) diagrama de Nyquist, (c) diagrama de Bode de ángulo de fase, (d) circuito equivalente. R es para resistencia, CPE para elemento de fase constante y W para un elemento de Warburg finito Curva de polarización (a) y de potencia (b) sin ácido húmico y con 0.5 g/L de ácido húmico .....	73
<b>Figura 5.6</b> Curva de polarización (a) y de potencia (b) sin ácido húmico y con 0.5 g/L de ácido húmico .....	76

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Comparación de los diferentes materiales de carbón en el ánodo de las CCM's .....	28
<b>Tabla 1.2.</b> Comparación de parámetros de desempeño de las CCM's con diferentes materiales de carbón en el ánodo .....	31
<b>Tabla 2.1</b> Parámetros de la CCM después de 25 días de haber iniciado el experimento .....	41
<b>Tabla 2.2</b> Composición de la comunidad bacteriana en la biopelícula formada en la CCM..	43
<b>Tabla 3.1</b> Parámetros de desempeño de la CCM a diferentes concentraciones de ácido húmico .....	52
<b>Tabla 5.1.</b> Ajuste de parámetros para los espectros de impedancia de celda completa.....	75

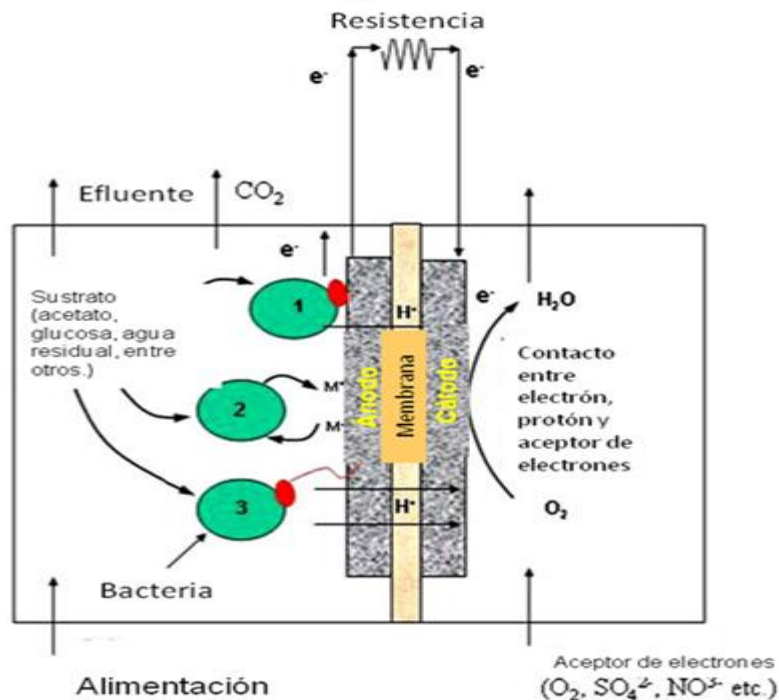
## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las celdas de combustible microbianas (CCM's) son sistemas bioelectroquímicos que utilizan los electrones generados durante el metabolismo de microorganismos para producir energía eléctrica a partir de la energía química de un sustrato (Rabaey y Verstraete, 2005; Sund *et al.*, 2007). Una CCM, está compuesta por un compartimento anódico y un catódico (Figura 1), en el compartimento anódico, se encuentran los microorganismos que oxidan la materia orgánica presente, liberando electrones que son transferidos al ánodo y posteriormente a través de un circuito externo son transferidos al cátodo para producir energía eléctrica (Cusick *et al.*, 2010). En el cátodo se lleva a cabo la reacción de reducción, generándose  $H_2O$  como producto final cuando se encuentra oxígeno disuelto presente en el compartimento catódico.



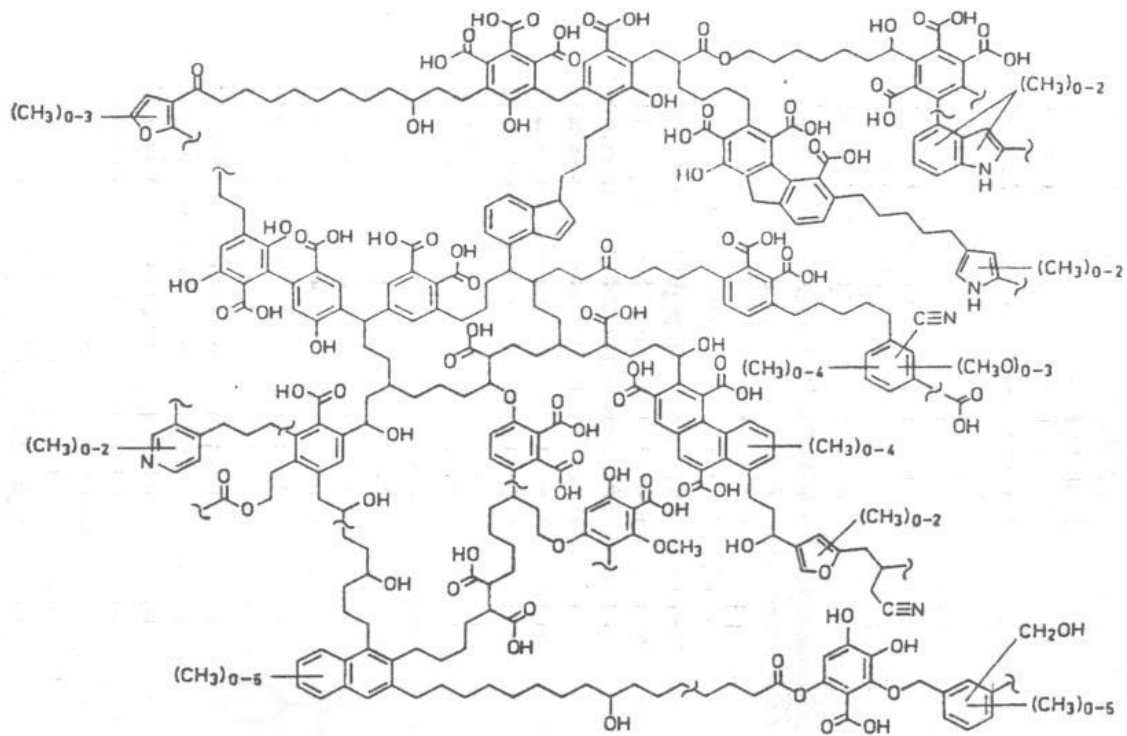
**Figura 1.** Esquema de una Celda de combustible microbiana (Rabaey y Verstraete, 2005).

Los electrones formados en la oxidación del sustrato pueden ser transferidos al ánodo por tres vías, conocidas como contacto directo (formando una biopelícula), por una sustancia transportadora soluble también conocida como mediador redox (Sund *et al.*, 2007) o mediante pilis de los microorganismos (Cusick *et al.*, 2010; Sund *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Mecanismos de transferencia de electrones, 1: contacto directo (formación de biopelícula), 2: Uso de mediadores redox, 3: Pilis del microorganismo (Pant *et al.*, 2010).

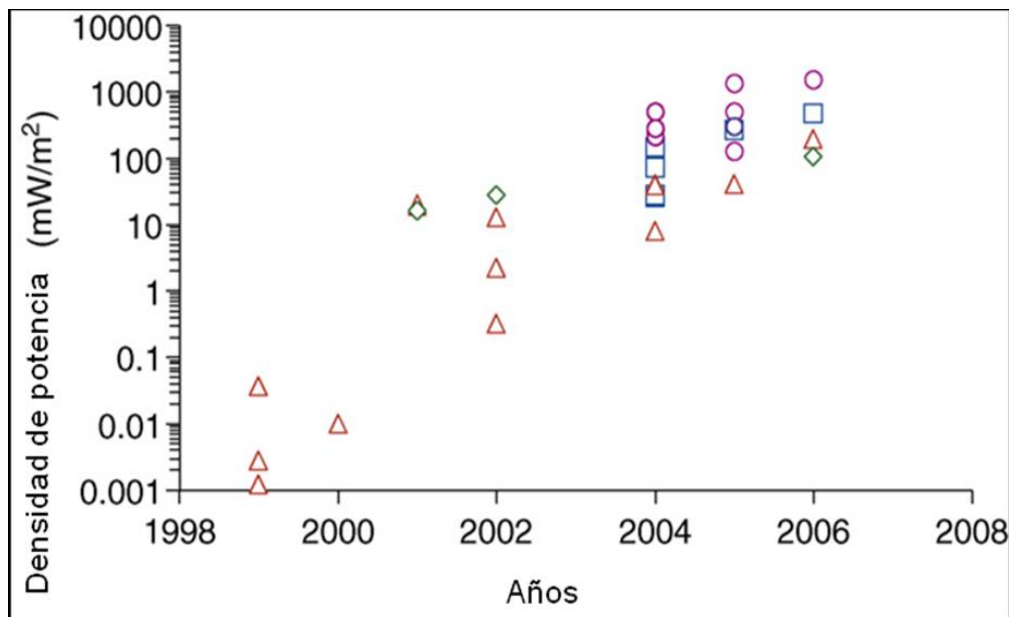
Por otro lado, las sustancias húmicas son compuestos complejos formados por la descomposición de plantas, son resistentes a la descomposición microbiana y en base a su solubilidad bajo condiciones ácidas ó básicas, se dividen en tres grupos: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas. La fracción de ácidos fúlvicos en su forma libre son solubles en agua a todos los valores de pH, la fracción de ácidos húmicos en su forma libre son solubles en agua en soluciones básicas y neutras, mientras que la humina no es soluble en agua (Sutton and Sposito, 2005; Albers *et al.*, 2008). Mediante métodos espectroscópicos se ha sugerido la presencia de elementos estructurales como anillos aromáticos unidos a átomos de oxígeno formando cadenas, y sustituyentes como OH de grupos fenólicos, cetonas, ácidos carboxílicos, aminoácidos y péptidos, sacáridos y aminosacáridos. La presencia de múltiples especies redox han mostrado la capacidad de los ácidos húmicos para aceptar y donar electrones por lo que participan de manera importante en la química redox de especies orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el medio ambiente (Palmer y Wandruszka, 2010),



**Figura 3.** Estructura química del ácido húmico (Stevenson, 1994).

## II. JUSTIFICACIÓN

Los primeros estudios sobre CCM surgen en 1970 donde se estudió el uso de microorganismos como catalizadores en celdas de combustible y desde 1991 se desarrolló el tratamiento de aguas residuales domésticas mediante celdas de combustible microbiana (Rabaey y Verstraete, 2005). En los años recientes, se ha incrementado de manera significativa el número de publicaciones sobre celdas de combustible microbiana a partir de 1998 (Logan y Regan, 2006).



**Figura 4.** Producción de energía en CCM, a través del tiempo.  $\Delta$ = sistemas con el cátodo inmerso en agua,  $\diamond$ = cátodo inmerso en sedimentos,  $\square$  = cátodos expuestos al aire,  $\circ$ = sustratos como glucosa y acetato (Logan y Regan, 2006).

El interés sobre el desarrollo de CCM's radica en la limitada disponibilidad de combustibles fósiles y en la sustentabilidad de sus aplicaciones (Rabaey y Verstraete, 2005; Sund *et al.*, 2007). Las aplicaciones potenciales de estos sistemas podrían ser la producción de energía a partir de compuestos biodegradables y su abastecimiento en lugares que carecen de infraestructura eléctrica, la producción de combustibles y el tratamiento de residuos (Rabaey y Verstraete, 2005; Oh y Logan, 2006). Las ventajas de las celdas de combustible microbiana sobre otras tecnologías, es que producen energía a partir de materia orgánica, la conversión del



sustrato a energía es altamente eficiente, operan a temperatura ambiente, incluso a bajas temperaturas, no requieren de tratamiento de gases, porque prácticamente se libera dióxido de carbono. Como desventajas de esta tecnología, se puede decir que aún se obtiene una baja densidad de potencia comparando con otras tecnologías que son fuentes de energía. Asimismo, el costo que implican para el escalamiento del sistema de electrodos, el uso de una membrana de intercambio protónico, catalizadores, mediadores redox entre otros, podrían representar desventajas. No obstante, incrementar las densidades de potencia de las CCM y una mayor comprensión del sistema representa un área de oportunidad para la investigación y la posibilidad de optimizar la producción de energía (Rabaey y Verstraete, 2005; Sund *et al.*, 2007). Con el objeto de incrementar las densidades de potencia en las CCM, se han estudiado diferentes condiciones de operación, como el uso de mediadores redox para favorecer el transporte de electrones al ánodo (Sund *et al.*, 2007). Los mediadores pueden ser de origen sintético o naturales (Du *et al.*, 2007), los naturales pueden ser metabolitos formados por los mismos microorganismos de la CCM, los cuales, no resultan tóxicos y no representan riesgo de contaminación al medio ambiente (Du *et al.*, 2007; Sund *et al.*, 2007). El estudio de las sustancias húmicas y su actividad en las CCM's puede contribuir a mejorar el funcionamiento de estos dispositivos.

### **III. HIPÓTESIS**

La adición de sustancias húmicas en las celdas de combustible microbianas, puede favorecer la transferencia de electrones generados por los microorganismos para incrementar la generación de energía.

### **IV. OBJETIVOS**

#### a. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de ácidos húmicos sobre el funcionamiento de celdas de combustible microbianas.

#### b. Objetivos específicos

- Caracterizar diferentes materiales de carbón para su uso como bioánodos.
- Establecer las condiciones para obtener una biopelícula electroactiva.
- Caracterizar la población microbiana de la biopelícula.
- Estudiar las propiedades redox de los ácidos húmicos mediante técnicas electroquímicas.
- Evaluar el desempeño de las celdas de combustible microbianas con la adición de ácidos húmicos.
- Evaluar el efecto de la adición del ácido húmico en el funcionamiento de las celdas de combustible microbianas mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.

## CAPÍTULO I

### ESTUDIO DE DIFERENTES MATERIALES CARBONACEOS PARA SU USO COMO BIOANODOS.

#### 1.1 Resumen del capítulo

En este capítulo se presentan los resultados de una metodología rápida y sencilla para la formación de la biopelícula usando diferentes materiales de carbón como electrodos, como son dos telas de carbón identificadas como CC1 y CC2 suministradas por diferentes proveedores, así como fieltro de carbón (CF). La biopelícula se desarrolló y generó energía en menos de 4 días, obteniendo un máximo de 0.3 V en las celdas. Las microscopias de SEM, mostraron que el crecimiento de la biopelícula se desarrolló solo sobre la superficie del material. La tela de CC1 y la tela CC2 presentaron la mayor producción de densidad de potencia y la mayor cantidad de sólidos volátiles (VS). Los resultados sugieren que el mejor material para la formación de la biopelícula es la tela de carbón CC1 ya que se pudo obtener una densidad de potencia de 13.41 mW/m<sup>2</sup> y la biopelícula se logró formar durante las primeras horas de operación.

#### 1.2 Introducción

Las celdas de combustible microbianas (CCM's) representan una nueva alternativa para el tratamiento de agua residual, ya que son capaces de remover la materia orgánica contenida en el agua y generar a su vez una cierta cantidad de energía eléctrica (Logan, 2005). Las CCM están conformadas por un compartimiento anódico y un compartimiento catódico separados por una membrana de intercambio protónico. En la cámara catódica se forma una biopelícula sobre la superficie de un electrodo, cuyos microorganismos son electroquímicamente activos que pueden oxidar la materia orgánica, y a su vez, la de liberar electrones al ánodo los cuales son transportados por una fuerza electromotriz (Logan *et al.*, 2006; Logan, 2007). Posteriormente, son conducidos mediante un circuito externo al compartimiento catódico donde los electrones son transferidos a un receptor final como el oxígeno, nitrato, sulfato y otros (Logan, 2007). Uno de los aspectos más importantes en la operación de las CCM, es la formación de la biopelícula sobre el ánodo, lo cual puede tomar un periodo largo de formación ya que se ha reportado que

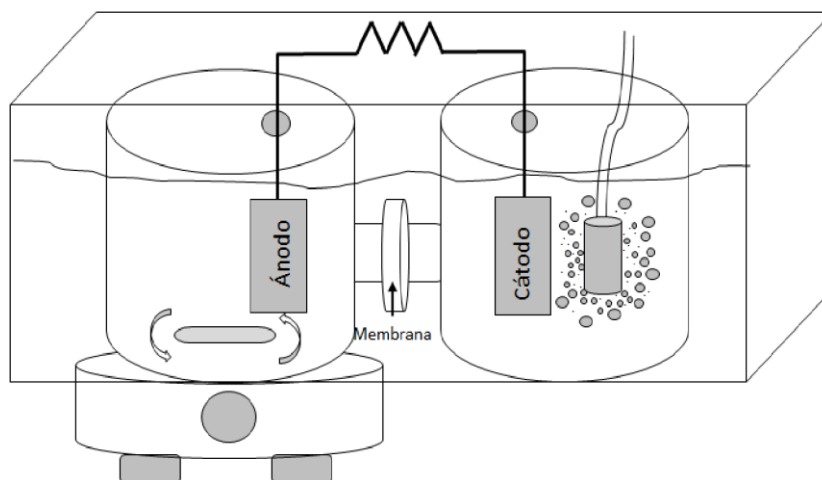
puede tomar desde 4 hasta más de 40 días (Zhao *et al.*, 2012). La imposición de un potencial al ánodo es una de las técnicas propuestas para la disminuir el tiempo de formación de la biopelícula, por lo que se han aplicado potenciales entre -0.2 y 0.6 V Vs Ag/AgCl (Aelterman *et al.*, 2008; Cercado *et al.*, 2013); sin embargo, el desarrollo de esta técnica requiere de disponer de un potenciostato para mantener las condiciones de síntesis. Otra de las técnica utilizadas, es el uso de cultivos puros con microorganismos de los géneros *Rhodospirillum rubrum*, *Geobacter*, *Shewanella*, *Klebsiella*, *Clostridium*, entre otros (Dumas *et al.*, 2008), no obstante, el uso de cultivos puros es complicado ya que se requiere el uso de condiciones estériles, tiempo de incubación más el tiempo de formación de la biopelícula (Dumas *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2009), además de que se ha reportado una producción baja de energía (Nevin *et al.*, 2008). Por otro lado, la biopelícula requiere ser soportada sobre un material conductor que permita el crecimiento de los microorganismos. Entre los materiales posibles, el carbón representa importantes ventajas debido a su biocompatibilidad, bajo costo, buena conductividad y estabilidad química (Logan *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2011). Los electrodos de carbón pueden ser de diversas configuraciones, como lo son las estructuras planas (papel carbón, platos de grafito y tela de carbón), electrodos de carbón de poro grueso (carbón vítreo reticulado, fieltro de carbón y espuma de carbón) estructuras empacadas (grafito granular, barra de grafito, carbón activado granular y cubos de grafito) y cepillos de grafito (Wei *et al.*, 2011). Con la finalidad de desarrollar un método que permita la síntesis de biopelículas en periodos cortos de tiempo y fáciles de implementar a bajo costo, este trabajo evaluó la formación de biopelículas en diferentes materiales de carbón, como tela y fieltro de carbón, usando un inóculo de lodos activados procedentes de una planta de tratamiento de aguas residuales sin la aplicación de un potencial externo.

### **1.3 Metodología experimental**

#### **1.3.1 Configuración y operación de la CCM.**

Los experimentos sobre los diferentes materiales para ser usados como bioánodos fueron desarrollados en CCM's de acrílico de tipo H, con dos compartimentos y membrana de intercambio protónico (Nafion 117, Dupont), con el volumen de operación de 375 mL en cada compartimento (Figura 1.1). Como materiales para el bioánodo se usó tela de carbón 1 (CC1) suministrada por Electrochem, tela de carbón 2 (CC2) suministrada por grupo Roe y el fieltro

de carbón (CF) obtenido con este último proveedor. Los electrodos se construyeron usando un trozo del material con dimensiones de 6 cm de largo por 3 cm de ancho. Como cátodo se utilizó tela de carbón CC1 del mismo tamaño, con la finalidad de mantener este parámetro constante en todos los experimentos y debido a que es un material que ha sido utilizado satisfactoriamente como cátodo en CCM's en trabajos previos (Zhang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013). Para la formación de la biopelícula, el compartimiento anódico se llenó con 150 mL de un inóculo obtenido del reactor biológico de la planta de tratamiento de aguas residuales de Cideteq, para luego agregar 223 mL de acetato de sodio 10 mM (Richter *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2011; Choi y Chae, 2013) y 0.4 mL de cada una de las siguientes soluciones de nutrientes: solución de sulfato de magnesio, 22.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en agua destilada y aforada a 1 L, solución de cloruro de calcio, 27.5 g  $CaCl_2$  en agua destilada y aforada a 1 L, y buffer de fosfato pH 7.2, 8.5 g  $KH_2PO_4$ , 21.75 g  $K_2HPO_4$ , 33.4 g  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  y 1.7 g  $NH_4Cl$  en 500 mL de agua destilada y aforada a 1 L (American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2012). Posteriormente, durante la duración de la pruebas el compartimiento anódico se mantuvo en agitación utilizando un agitador magnético (IKA aquid color White, USA). Por otra parte, el compartimiento catódico fue llenado con agua destilada y se mantuvo en aireación durante todo el experimento usando una bomba (Elite 800). Las celdas se mantuvieron a temperatura ambiente constante de 25° C utilizando un baño de temperatura (Wisd Laboratory instrument). Todas las soluciones en la cámara anódica se burbujearon con nitrógeno gas por 15 minutos antes de utilizarlas con la finalidad de desplazar el aire y oxígeno presente (Logan, 2005; Patil *et al.*, 2011). El voltaje (V) de las celdas fue medido cada 60 minutos usando una resistencia externa de 5 K $\Omega$  y un sistema de adquisición de datos conectado a una PC. La corriente (I) fue calculada utilizando la ley de Ohm,  $I=V/R$  y la potencia (P) con la ley de Joule  $P=VI$  (Choi y Chae, 2013). Toda vez que se observó un agotamiento del sustrato, se agregó una cantidad de acetato de sodio para mantener una concentración de 10 mM en la solución.



**Figura 1.1** Celda de combustible microbiana de dos cámaras usada en la experimentación.

### 1.3.2 Caracterización de los electrodos de carbón.

Para la caracterización de los diferentes materiales de carbón, se midió el ángulo de contacto entre la superficie de cada material y la gota de un líquido hidrofílico (agua desionizada), usando un microscopio (Kruss-DSA30) y el software Drop Shape Analysis DSA 4 (versión 1.1). Cada material de carbón se cortó en piezas de  $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ , las piezas fueron montadas en el microscopio y se colocó una gota de agua sobre la superficie con un volumen de  $5\ \mu\text{L}$ ; las mediciones fueron realizadas con el software mencionado, y el valor promedio reportado se obtuvo a partir de 10 mediciones (He *et al.*, 2012). Con el fin de identificar la estructura de los materiales de carbón, se realizó una espectroscopia de Raman, usando trozos de electrodos de  $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ , los cuales fueron montados en el DXR Raman (Thermo Scientific). Las mediciones fueron hechas a  $480\text{ nm}$  como fuente de excitación, el láser que se utilizó fue de  $1000\ \mu\text{m}$  de diámetro con una potencia de  $10\text{ mW}$ . El espectro se obtuvo en un rango de  $70\text{ a }3400\text{ cm}^{-1}$  con un promedio de 100 escaneos. A partir de los espectros obtenidos, las intensidades de las bandas D y G fueron cuantificadas para cada material, así como la relación  $I_{pD}/I_{pG}$ . La presencia de la banda D en el espectro de Raman, está relacionada con una estructura amorfa del carbón en la muestra, mientras que la banda G indica la presencia de una organización cristalina del carbón o anillos aromáticos (Bañuelos *et al.*, 2014). Y la relación  $I_{pD}/I_{pG}$  representa la proporción de cambio entre el material amorfo y cristalino.

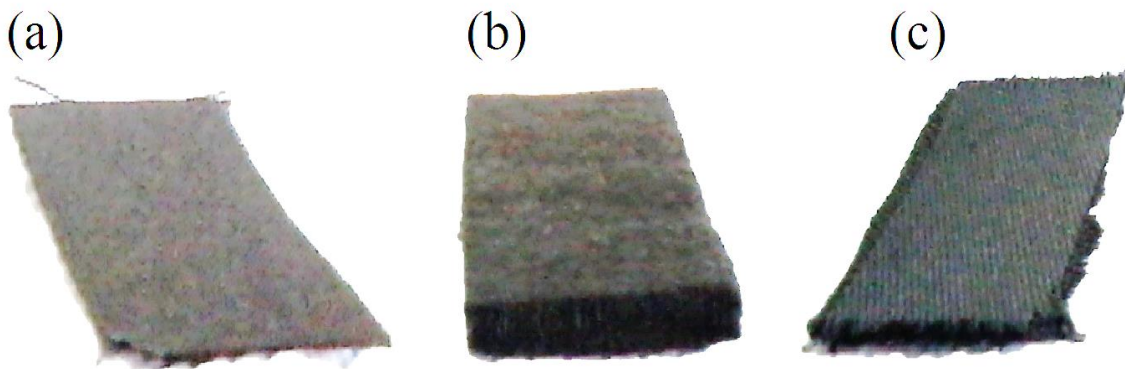
La medición del área superficial de los electrodos, se realizó mediante el método de relación de capacitancias (Alves *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2008). De acuerdo a esta metodología, se realizaron voltametrías cíclicas utilizando un sistema de tres electrodos en una solución de ácido sulfúrico 0.5 M y velocidad de barrido de 20 a 200 mV/s (Alves *et al.*, 1998). Entre cada voltametría se aplicó una agitación turbulenta y el área superficial se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$A = C_{dl} / C_{st}$$

A: área de la superficie (cm<sup>2</sup>)

$C_{dl}$ : capacitancia de la doble capa (F)

$C_{st}$ : valor de referencia para la capacitancia ( $C_{st}=60 \mu\text{F cm}^{-2}$  para superficies sólidas rugosas (Trasatti y Petrii, 1991).



**Figura 1.2.** Materiales de carbón utilizados como electrodos en las CCM's: (a) Tela de carbón 1 (CC1); (b) Filtro de carbón (CF); (C) Tela de carbón 2 (CC2).

### 1.3.3 Caracterización de la biopelícula sobre diferentes electrodos de carbón.

El crecimiento de los microorganismos sobre diferentes materiales de carbón fue analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las biopelículas fueron fijadas siguiendo la metodología reportada por Zhang *et al.*, 2011, de acuerdo a la cual se cortaron piezas de electrodos de 2 cm × 2 cm donde ya se tenía el crecimiento microbiano, los cuales fueron inmersos durante 1 hora en una solución preparada con 0.5 g de collodion (SPI-CHEM) en 40 mL de una solución de acetato de amil collodion. Posteriormente, las biopelículas fueron

deshidratadas utilizando un gradiente de soluciones de etanol (30, 50, 70, 80,90 y 100%) posteriormente fueron secadas en la oscuridad durante una noche. Las piezas con biopelícula fueron colocadas en el plato de aluminio y fijadas con cinta adhesiva e inmediatamente se realizó la microscopía electrónica de barrido. Para determinar la cantidad de biomasa presente en los electrodos, se midieron los sólidos volátiles (SV) presentes en las muestras del película/electrodo. Para realizar esta medición, tres electrodos de cada material con la misma área de superficie, con y sin biopelícula fueron secados a 105° C por 24 horas en una estufa (Thermo Scientific) y posteriormente pesados; a continuación se llevaron a 550° C por 20 minutos en la mufla (Wisd Laboratory 800C), y nuevamente fueron llevados a 105° C determinando el peso del material nuevamente. La cantidad de SV se calculó por diferencia de peso de cada electrodo con y sin biomasa (Peixoto *et al.*, 2011).

#### **1.3.4 Análisis electroquímicos.**

Después del crecimiento de la biopelícula en el ánodo, se utilizó la voltametría cíclica para caracterizar la biopelícula, el análisis se realizó en una ventana de potencial de -1.0 a 1.0 V y una velocidad de barrido de 20 mV/s. Todos los experimentos se realizaron con un potenciostato (BASi Epsilon-EC, Bioanalytical Systems, Inc.), un electrodo de referencia Ag/AgCl (0.209 V Vs NHE). Las curvas de polarización se obtuvieron mediante la técnica de Voltametría Lineal de Barrido (LSV, por sus siglas en inglés) a una velocidad de barrido de 1 mV/s (Liu *et al.*, 2012). La densidad de corriente y densidad de potencia fueron calculadas utilizando el área de la superficie anódica medida. Y el potencial de electrodo se midió utilizando un sistema de tres electrodos, usando como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl.

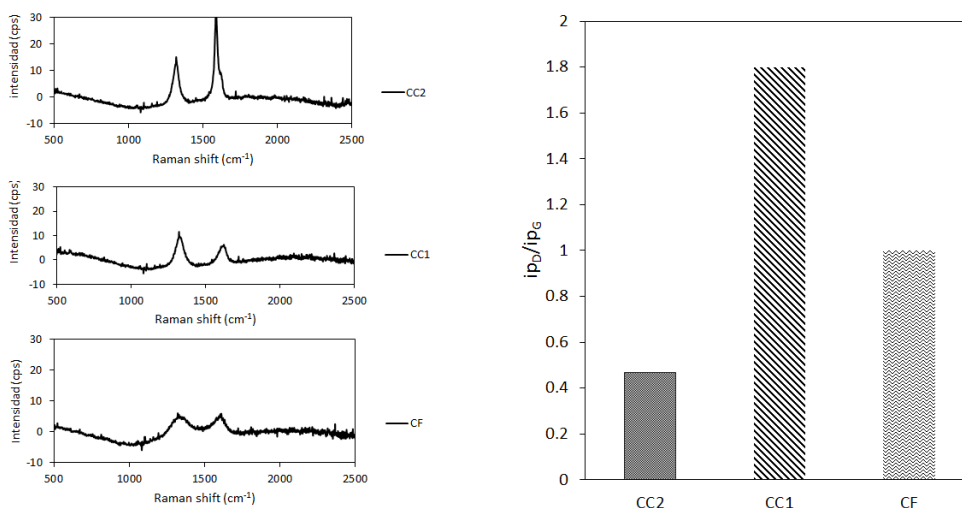
### **1.4 Resultados y discusión**

#### **1.4.1 Caracterización de los electrodos de carbón.**

En la Figura 1.3 se muestra el espectro de Raman obtenido con los tres materiales de carbón. Como se muestra en la Figura 1.3a, el espectro presenta dos picos localizados a 1320 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ , los cuales están asociados con los defectos amorfos del carbón (D) y la parte cristalina o anillos aromáticos (G) respectivamente (Bañuelos *et al.*, 2014). La relación entre la parte amorfa y cristalina del carbón se calculó con la relación entre la intensidad de pico  $i_{pD}/i_{pG}$  como se muestra en la figura 1.3b. La relación fue 1.8 para CC1, 0.46 para CC2 y 1.0 para CF, indicando



que el material CC2 contiene una pequeña cantidad de material amorfo y una mayor cantidad de material cristalino, el material CC1 presentó una mayor cantidad de material amorfo mientras que CF presentó ambas estructuras de carbón en cantidades iguales. Las diferencias encontradas en  $i_{pD}/i_{pG}$  pueden estar asociadas con las diferencias en las condiciones de preparación de cada uno de los materiales. La estructura cristalina en la composición del carbón puede proporcionar una mayor conductividad (Kinoshita, 1998), por lo que la CCM con CC2 podría presentar un mejor desempeño.

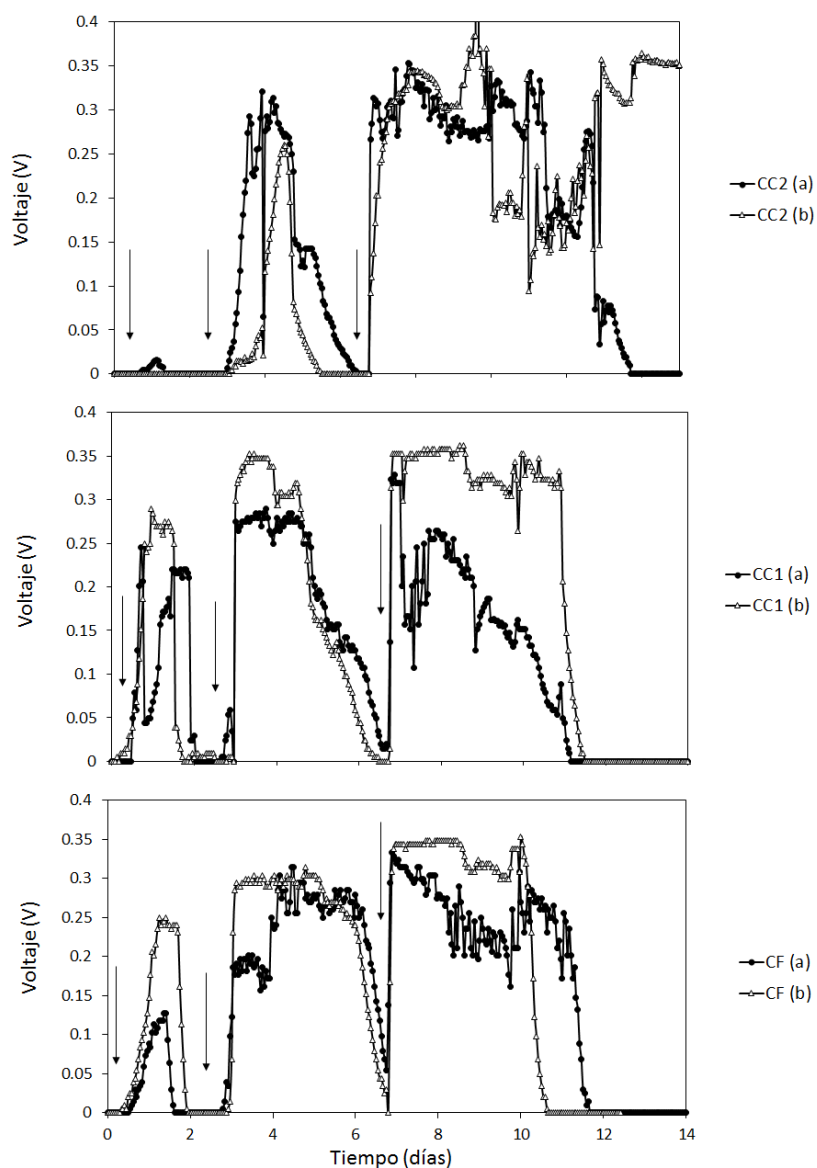


**Figura 1.3.** Espectro de Raman de los diferentes materiales de carbón, fieltro de carbón CF, tela de carbón CC1 y CC2 (a), y relación de la estructura cristalina y amorfa en los materiales de carbón (b).

En relación al ángulo de contacto, el resultado obtenido para CC1 fue de  $166^\circ \pm 4$ , mientras que para CC2 fue de  $167^\circ \pm 6$  y para CF de  $170^\circ \pm 4$ . De acuerdo a lo anterior, los resultados no muestran diferencias significativas entre los diferentes materiales de carbón, presentan una alta hidrofobicidad y rugosidad. Las propiedades hidrofobia/hidrofílico en los materiales de carbón podrían ser benéficos para la adhesión de microorganismos, pero estos resultados indican que no deberían esperarse diferencias de la formación de la biopelícula.

### 1.4.2 Formación de la biopelícula sobre diferentes materiales de carbón.

En la figura 1.4 se muestra la generación de voltaje a través del tiempo durante la operación de las CCM's, observándose que se puede alcanzar un voltaje cercano a 0.3 V, resultado similar en lo reportado por Yang *et al.*, 2012. Así mismo en la Figura 1.4 se observó que en todos los casos, la respuesta de voltaje se obtuvo antes de los primeros cuatro días de operación, y particularmente en el caso de las celdas con los materiales CC1 y CF, presentaron una generación de voltaje incluso en las primeras horas después de haber iniciado el experimento.



**Figura 1.4.** Monitoreo de voltaje durante el crecimiento de la biopelícula sobre diferentes materiales de electrodo. Tela de carbón 1 CC1, tela de carbón 2 CC2 y fieltro de carbón CF.

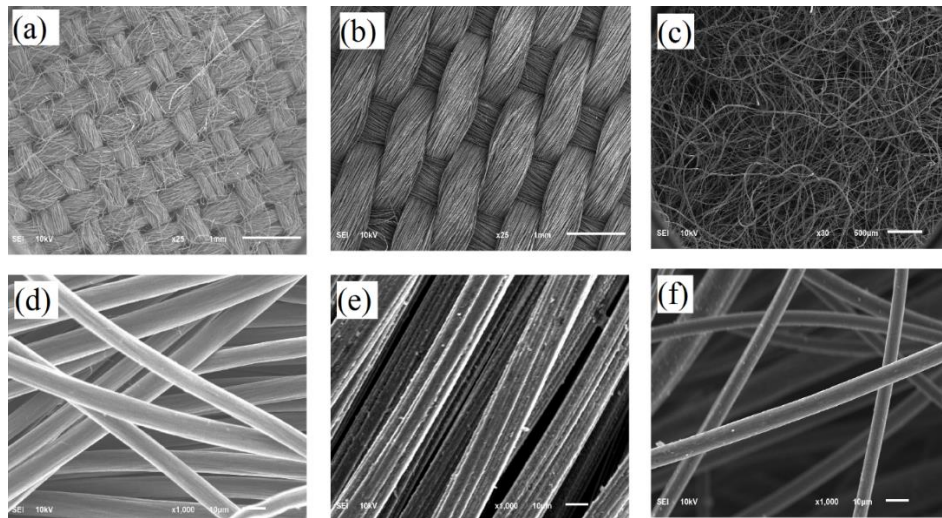
La generación de voltaje está relacionada al crecimiento de la biopelícula, ya que los microorganismos producen y transfieren electrones al electrodo, por lo que, el voltaje es el resultado de la formación de la biopelícula sobre la superficie del electrodo. (Yang *et al.*, 2012). En la misma figura 1.4, se observa como el voltaje generado en la celda decae hasta valores cercanos a cero, y después de agregar nuevamente el acetato (La adición de sustrato se indica por la flecha descendente en el gráfico) se vuelve a generar un potencial cercano a 0.3 V

### **1.4.3 Micrografía SEM de la estructura de la biopelícula sobre diferentes materiales de carbón.**

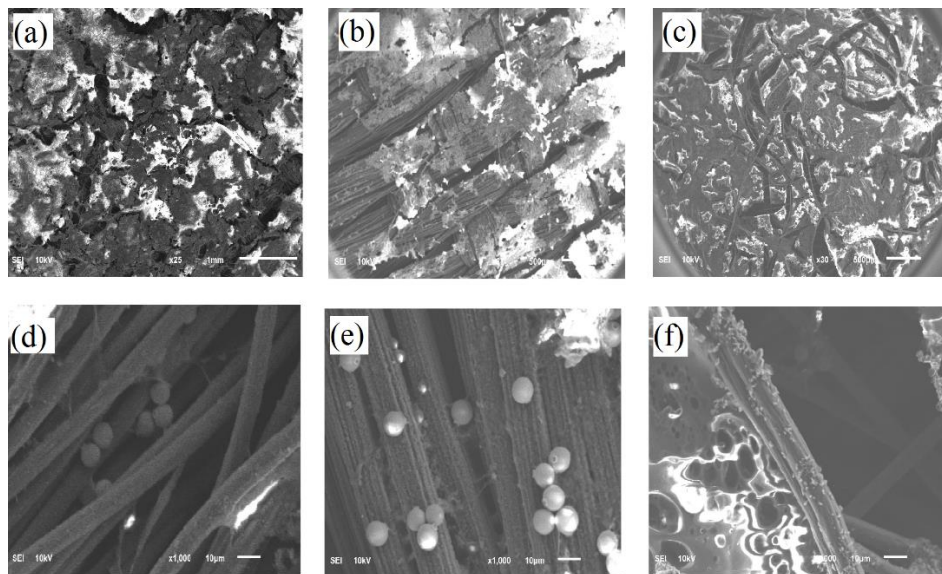
Las biopelículas formadas sobre los diferentes materiales de electrodo se observaron al microscopio SEM con el fin de ver el aspecto que adquirieron. En la figura 1.5 se muestran los tres diferentes materiales usado como soporte para la formación de la biopelícula, donde se puede observar como las telas de carbón CC1 y CC2 muestran una organización similar en las fibras que la conforman, sólo que las que corresponden a la CC2 son más gruesas. Por otra parte, el fieltro de carbón muestra un arreglo desorganizado de sus fibras, las cuales son significativamente más finas que las anteriores, con poros que pudieran contribuir con una formación diferente de la biopelícula.

La figura 1.6 muestra las imágenes SEM de las biopelículas sobre la superficie de los diferentes materiales de carbón, observándose como la que se formó sobre la tela de carbón CC1 presenta una superficie lisa y uniforme (figura 1.6a), mientras que la biopelícula en los materiales CC2 (figura 1.6b) y CF (figura 1.6c) no presentan una cobertura total y es notable la presencia de huecos y marcas de la rugosidad y porosidad del material. De acuerdo a estos resultados, se determinó que la tela CC1 es el material que generó mejores resultados, ya que se ha reportado que la presencia de huecos en la biopelícula podría disminuir el contacto y transferencia de electrones y con ello disminuir el desempeño de la CCM (Zhang *et al.*, 2011). En las imágenes de SEM con mayor amplificación (figuras 1.6d, 1.6e y 1.6f) se observó como la biopelícula se desarrolló principalmente en la superficie de los materiales, mientras que dentro de los poros del material solo se encontró un pequeño crecimiento, estos resultados concuerdan con los reportados en trabajos anteriores donde han utilizado carbón vítreo (Torres *et al.*, 2009) y tela de carbón y grafito (Zhang *et al.*, 2011) como soporte. Estas limitaciones en el crecimiento de

las biopelículas se han atribuido a la limitada cantidad de sustrato que puede introducirse dentro del material de electrodo, lo que genera limitaciones en el desarrollo por carencia de sustrato. En cuanto a la forma de la biomasa adherida, en las telas CC1 y CC2 (figura 1.6d y 1.6e) se identifica la presencia de microorganismos esféricos, en tanto que en el CF (figura 1.6f) no se observa una morfología característica.



**Figura 1.5.** Imágenes SEM de diferentes materiales de carbón sin biopelícula (a) CC1, x25; (b) CC2, x25; (c) CF, x30; (d) CC1, x1000; (e) CC2 x1000; (f) CF, x1000.



**Figura 1.6.** Imágenes SEM de la biopelícula establecida sobre diferentes materiales de carbón (a) CC1, x25; (b) CC2, x25; (c) CF, x30; (d) CC1, x1000; (e) CC2, x1000; (f) CF, x1000.

#### 1.4.4 Evaluación del desempeño de la biopelícula en las CCM's.

Para poder evaluar el desempeño de las biopelículas, lo primero que se hizo fue la medición del área superficial del electrodo, para verificar si este era un factor determinante en el desempeño de la CCM. Las áreas calculadas se reportan en la tabla 1.1, donde se puede observar que el CF presentó un área significativamente más grande con 190.5 cm<sup>2</sup>, comparada con los 10.1 cm<sup>2</sup> y 8.1 cm<sup>2</sup> determinados para las telas CC2 y CC1. Sin embargo, al cuantificar la cantidad de biopelícula, determinada como la cantidad de sólidos volátiles por unidad de área de superficial del electrodo (SV/cm<sup>2</sup>), se observa que la película sintetizada en la tela CC2 fue la que presentó el mayor valor ya que se determinaron 7.9 mg/cm<sup>2</sup>, seguida de tela CC1 con 4.7 mg/cm<sup>2</sup> y del fieltro con 1.5 mg/cm<sup>2</sup>. De acuerdo a lo anterior, el mejor soporte para el crecimiento de la biopelícula es la tela de carbón CC2, a pesar de que CF presentó la mayor área superficial. Estos resultados coinciden con lo observado en las microcopias de la figura 1.6 donde se observa que el crecimiento de la biopelícula ocurre preferentemente en la superficie del electrodo, de manera que el área interior poco se aprovecha para el crecimiento microbiano.

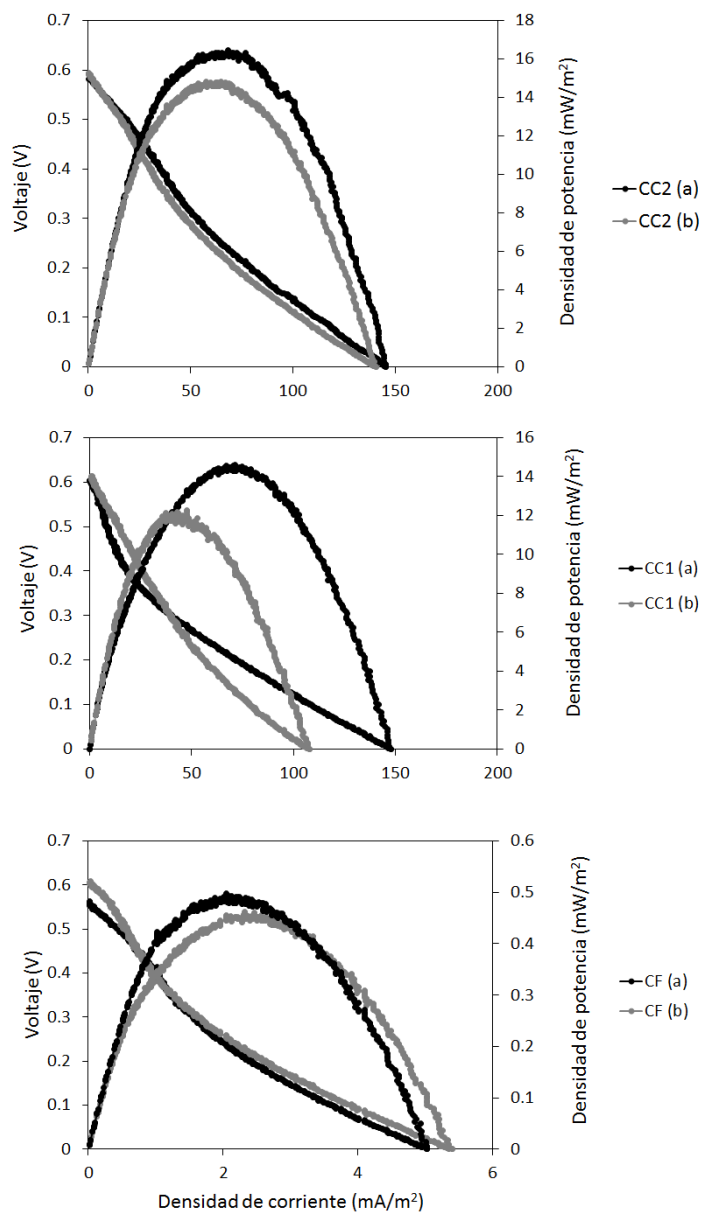
**Tabla 1.1.** Comparación de los diferentes materiales de carbón en el ánodo de las CCM's.

	CC1	CC2	CF
Área de superficie del electrodo (cm <sup>2</sup> )	8.2	10.2	190.6
SV en ánodo (mg/cm <sup>2</sup> )	4.8 ± 0.1	8.0 ± 0.9	1.6 ± 0.3
E <sub>ánodo</sub> (V Vs Ag/AgCl)	-0.58 ± 0.006	-0.58 ± 0.002	-0.55 ± 0.028
E <sub>cátodo</sub> (V Vs Ag/AgCl)	-0.01 ± 0.014	-0.03 ± 0.004	-0.01 ± 0.013
pH	9.0 ± 0.2	8.7 ± 0.04	8.5 ± 0.3
Conductividad (mS/cm)	3.3 ± 0.06	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.3

Durante los potenciales de celda alcanzados con una resistencia externa de 5 K $\Omega$  (circuito cerrado) como resultado del crecimiento de la película y funcionamiento estable de las CCM's, se procedió a evaluar los potenciales anódicos, el cual fue de -0.58 V en CC1, -0.58 V en CC2 y -0.54 V Vs Ag/AgCl en CF (Tabla 1.1). Estos resultados fueron similares a los reportados en otros estudios con valores entre -0.30 y -0.42 V Vs Ag/AgCl, los cuales son consecuencia de la electroactividad de los microorganismos (Martín *et al.*, 2013). También el potencial catódico presentó valores similares en los tres materiales, -0.01 V en CC1, -0.02 V en CC2 y 0.01 V Vs Ag/AgCl en CF. La diferencia de potencial entre el ánodo y cátodo favoreció la operación de la celda, ya que un alto potencial de celda es obtenido cuando el potencial anódico es más negativo y el potencia catódico es más positivo lo cual coincide con lo reportado con Zhao *et al.*, 2012. Los valores de pH y conductividad en el compartimiento anódico no mostraron diferencias significativas entre las celdas con los diferentes materiales anódicos, ya que se mantuvieron valores de pH entre 8.49 y 8.94, así como los valores de conductividad que se mantuvieron con valores entre 2.96 mS/cm y 3.25 mS/cm, por lo que en este caso, ni los valores de pH y conductividad fueron factores que determinaron la repuesta a la formación de la biopelícula.

Para evaluar el desempeño de las celdas se realizaron curvas de polarización, las cuales se muestran en la figura 1.7. Los resultados obtenidos muestran que con el tipo de electrodos y con la configuración de la celda utilizada, es posible obtener un potencial a circuito abierto aproximadamente de 0.6 V en las tres celdas CC1, CC2 y CC3. Sin embargo, la máxima densidad de corriente se obtuvo en las celdas con electrodos de tela de carbón CC1 y CC2, con los que se alcanzó 150 mA/m<sup>2</sup> y 145 mA/m<sup>2</sup>, respectivamente. Mientras que la celda con electrodo de fieltro de carbón (CF) solo se alcanzó 5 mA/m<sup>2</sup>. La potencia máxima obtenida por unidad de área en las CCM's con diferentes materiales de carbón en el ánodo se muestra en las curvas de polarización de la Figura 1.7 y los valores máximos se resumen en la Tabla 1.2. De acuerdo a esta tabla, la celda con la tela CC1 presentó un valor de 13.4 mW/m<sup>2</sup>, la celda con la tela CC2 un valor de 15.6 mW/m<sup>2</sup> en tanto que para el CF se determinó un valor de 0.5 mW/m<sup>2</sup>. La densidad de potencia obtenida en las celdas comparadas con resultados de otros trabajos es baja, ya que es estos experimentos no se utilizó ningún tipo de catalizador como el platino, no se realizó ningún pretratamiento de los electrodos y la configuración de la celda no tuvo la distribución óptima de sus componentes; no obstante, nos permitió observar el efecto de los

diferentes materiales utilizados como soporte para el bioánodo. Al respecto, los resultados mostraron que el mejor desempeño de la celda fue cuando se usaron las telas de carbón CC2 y CC1 como ánodo, ya que en el caso de CF la biopelícula se formó solo en la superficie del material como se muestra en la Figura 1.6.



**Figura 1.7.** Curvas de polarización y de potencia de las celdas con diferentes materiales de carbón en el ánodo.

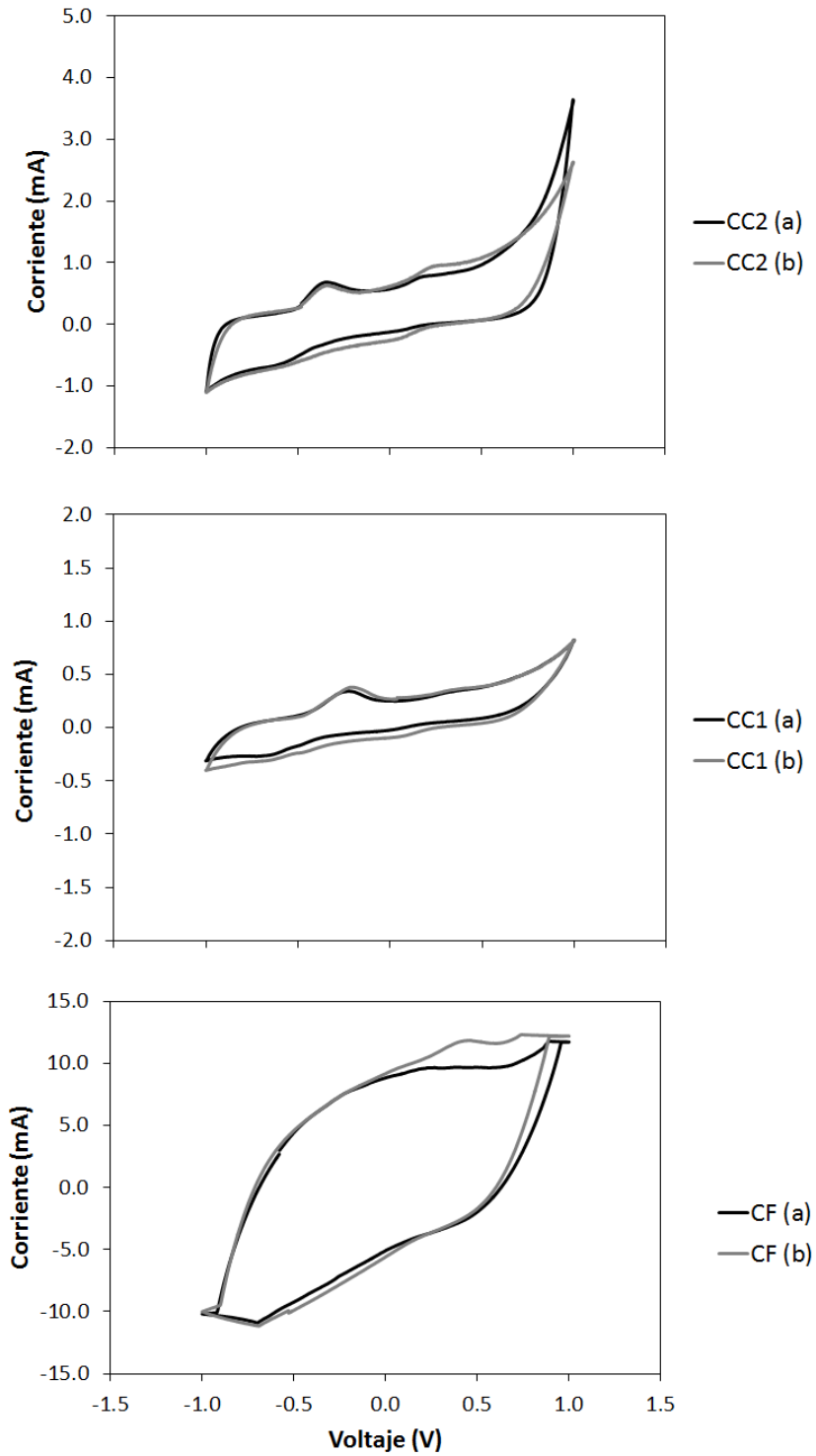
**Tabla 1.2.** Comparación de parámetros de desempeño de las CCM's con diferentes materiales de carbón en el ánodo.

	<b>CC1</b>	<b>CC2</b>	<b>CF</b>
<b><math>j</math> (mA/m<sup>2</sup>)</b>	145	150	5
<b><math>R_{int}</math> (K<math>\Omega</math>)</b>	5.9 $\pm$ 1.9	4.1 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.9
<b><math>P_{max}</math> (mW/m<sup>2</sup>)</b>	13.4 $\pm$ 1.7	15.6 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.03

Por otro lado, las celdas con electrodos CC2 mostraron la resistencia interna más baja (4.11 K $\Omega$ ) comparado con CC1 y CF que presentaron una resistencia de 5.95 y 5.93 K $\Omega$  respectivamente (Tabla 1.2). Este factor coincide con la máxima potencia obtenida por la celda con tela CC2, ya que una menor resistencia puede favorecer la transferencia de electrones.

Adicionalmente, se realizaron voltametrías cíclicas con el fin de evaluar el comportamiento electroactivo de la interfase entre la biopelícula y el electrodo, resultados mostrados en la figura 1.8. Como puede observarse, se presentan algunas señales de oxidación y reducción como resultado de la actividad electroquímica de las biopelículas (Zhao *et al.*, 2012). La aparición de picos en los voltamperogramas pueden estar asociados a la bioelectrooxidación del acetato a -0.26 y -0.16 V Vs SHE (Zhang *et al.*, 2011), a la producción de mediadores redox con señales en los potenciales -0.10 y -0.18 V Vs SHE (Zhang *et al.*, 2011), o a la respuesta de los sitios de transferencia de electrones relacionados con los citocromos presentes en la membrana celular de los microorganismos (Patil *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2013).





**Figura 1.8.** Voltametrías cíclicas de las biopelículas formadas en diferentes materiales de carbón, Tela de carbón 1 (CC1), tela de carbón 2 (CC2), fieltro de carbón (CF).

## 1.5 Conclusiones

Se desarrolló una metodología rápida, fácil y de bajo costo para la formación de biopelícula en CCM's usando tres diferentes materiales, tela de carbón (CC1 y CC2) y fieltro de carbón (CF), como inóculo se utilizó el sedimento de una planta de tratamiento de aguas residuales. En todos los casos, se observó un voltaje de respuesta antes de los primeros cuatro días de operación de las CCM's, en el caso de las celdas con CC1 y CF, se obtuvo una respuesta de voltaje en las primeras 6 horas de operación y el voltaje máximo obtenido en todos los casos fue aproximadamente de 0.3 V. Las telas de carbón CC1 y CC2 presentaron la mayor cantidad de sólidos volátiles por metro cuadrado debido a que el crecimiento de la biopelícula fue principalmente en la superficie del material como se mostró en las imágenes SEM. Así mismo CC1 y CC2 presentaron la mayor densidad de potencia (13.4 y 15.6 mW/m<sup>2</sup> respectivamente) y densidad de corriente (145 y 150 mA/m<sup>2</sup> respectivamente) comparadas con CF. Las diferencias en densidad de corriente y densidad de potencia entre CC1 y CC2 pueden ser debidas a la presencia de una mayor cantidad de material cristalino en CC2 como se muestra en los resultados de RAMAN, lo cual puede proporcionar una mayor conductividad al material y favorecer la transferencia de electrones. Sin embargo, el mejor material para la formación de la biopelícula fue la tela de carbón CC1, ya que presentó una formación de biopelícula en menor tiempo. En cuanto a las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de los materiales, estas fueron similares, por lo que no se observó un efecto importante para la formación de la biopelícula.

## CAPÍTULO II

### FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA DE LA BIOPELÍCULA UTILIZANDO UN SEDIMENTO DE LODOS ACTIVADOS.

#### 2.1 Resumen del capítulo

Se realizó la identificación microbiana de la biopelícula formada en una celda de combustible microbiana de dos cámaras tipo H, utilizando como inóculo el sedimento formado en un reactor de lodos activados y acetato de sodio como sustrato. La biopelícula se analizó después de obtener cuatro ciclos de voltaje con un valor máximo alcanzado aproximadamente de 0.4 V, y utilizando la plataforma de secuenciación masiva de Illumina HiSeq 2000 para determinar la categoría taxonómica a través del gen 16S rRNA, se encontró una gran diversidad microbiana. Se identificó en la biopelícula al género *Pseudomonas* como la más abundante (81%), mientras que otros géneros bacterianos, por ejemplo *Clostridium*, *Streptococcus* y *Paracoccus* presentaron una abundancia relativa > 1%. El consorcio microbiano establecido en la biopelícula generó una densidad de potencia máxima entre 4.3 y 8.1 mW/m<sup>2</sup>, indicando que el género *Pseudomonas* es probablemente el principal microorganismo asociado a la generación de energía.

#### 2.2 Introducción

Para la generación de energía eléctrica en las celdas de combustible microbianas (CCM's), los electrones producidos por la degradación del sustrato pueden ser transferidos al ánodo por mecanismos directos o mediados. La transferencia de electrones directa, implica un contacto físico de los microorganismos con el electrodo, favoreciendo una interacción con los citocromos presentes en la membrana celular o con los pilis de los microorganismos. Por otra parte, el mecanismo de transferencia de electrones mediado, se realiza por la acción de compuestos redox que producen los microorganismos o que son colocados en el compartimento anódico (Cusick *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2013). De estos dos mecanismos, el que se ha identificado como el más importante en la operación de las CCM ha sido el contacto directo (Zhao *et al.*, 2012).

Por lo anterior, es importante entender y conocer aspectos como la estructura, mecanismos de transferencia y composición de la biopelícula. El estudio de biopelículas con cultivos puros, favorece el desarrollo de investigaciones básicas, conocimiento específico sobre el funcionamiento del microorganismo en la CCM, así como la reproducibilidad de los resultados obtenidos (Yang *et al.*, 2012). Entre los microorganismos que se han identificado con la habilidad de transferir electrones se encuentran del género *Shewanella*, *Geobacter*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Rhodospirillum rubrum*, e incluso han desarrollado bibliotecas cromosómicas de estos microorganismos (Du *et al.*, 2007). Sin embargo, para aplicaciones reales el uso de cultivos mixtos permite evitar condiciones de esterilidad y usar sustratos mixtos como aguas residuales (Nevin *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). Los cultivos mixtos pueden ser obtenidos del sedimento del lecho marino y lagos, suelo y lodos activados (Du *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012), pero el desarrollo de las especies predominantes en la formación de la biopelícula varían con las condiciones de operación (Kim *et al.*, 2008). En este capítulo, se muestra la identificación bacteriana en la biopelícula, utilizando una CCM tipo H, con un inóculo de lodos activados, alimentados con acetato a una temperatura de 25°. Los resultados generados a través de la plataforma de secuenciación masiva de Illumina HiSeq 2000 para determinar la categoría taxonómica a través del gen 16S rRNA muestran la diversidad de bacterias establecidas en la biopelícula, seguido de análisis electroquímicos como curvas de polarización para medir el desempeño de la CCM y la electroactividad de la biopelícula mediante voltametría cíclica.

## 2.3 Metodología experimental

### 2.3.1 Formación de la biopelícula.

Los experimentos fueron desarrollados en CCM's de acrílico tipo H con dos compartimentos separados con membrana de intercambio protónico (Nafion 117, Dupont) y todos los electrodos utilizados, tanto ánodo como cátodo fueron de tela de carbón suministrada por Electrochem con dimensiones de 6 cm de largo por 3 cm de ancho. Se formaron 3 biopelículas sobre el ánodo utilizando el procedimiento descrito en el capítulo 1. La formación de la biopelícula fue monitoreada mediante la medición de voltaje cada 60 minutos utilizando un sistema de adquisición de datos.

### 2.3.2 Desarrollo de análisis electroquímicos

Al final del cuarto ciclo del monitoreo de la biopelícula, se evaluó el desempeño de las celdas con las biopelículas formadas. Las curvas de polarización se obtuvieron mediante la técnica de Voltametría Lineal de Barrido (LSV, por sus siglas en inglés) a una velocidad de barrido de 1 mV/s (Liu *et al.*, 2012). La densidad de corriente y densidad de potencia fue calculada utilizando el área de la superficie anódica. Y el potencial de electrodo se midió utilizando un sistema de tres electrodos. La voltametría cíclica se realizó en una ventana de potencial de -1.0 a 1.0 V Vs Ag/AgCl y una velocidad de barrido de 20 mV/s. Todos los experimentos se realizaron con un potenciostato (BASi Epsilon-EC, Bioanalytical Systems, Inc.) y un electrodo de referencia Ag/AgCl (0.209 V Vs NHE).

### 2.3.3 Análisis de la comunidad microbiana

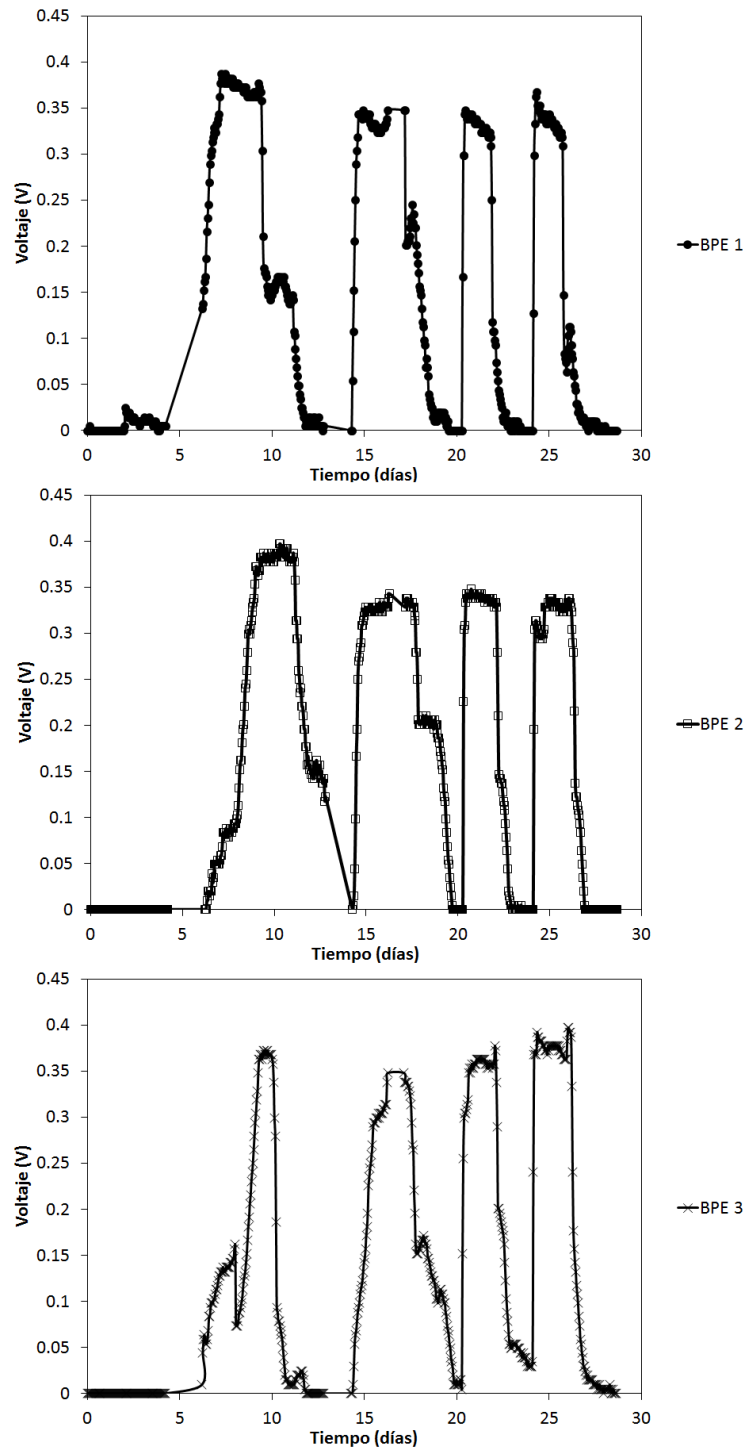
Para investigar la estructura de la comunidad microbiana presente en la biopelícula formada en los tres electrodos de tela de carbón, se removió la biopelícula y se homogeneizó con 10 mL de anolito. Con la finalidad de obtener el DNA total que representara la mayor diversidad de microorganismos, se utilizaron cuatro protocolos de extracción que se mencionan a continuación: protocolo establecido por el kit ZR Fungal/Bacterial DNA de marca Zymo Research, el protocolo del kit Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research), protocolo con Fenol-

Cloroformo 1:1 (V/V) reportado por Yokoyama *et al.*, 1999. Y el de Acetato de Sodio con EDTA y lisozima a 37° C reportado por Varshney *et al.*, 1991. Para la confirmación de la presencia de ADN se utilizó de cada protocolo de extracción 3 µL de ADN, el cual se colocó en un gel de agarosa preparado al 1%, se realizó una electroforesis a 80 Volts por 80 minutos y posteriormente se observó el resultado con luz UV. Confirmada la presencia del ADN se procedió a concentrar las cuatro muestras utilizando el procedimiento de DNA Clean y Concentrator (Zymo Research), para lo cual se utilizó 100 µL de ADN de cada protocolo y la secuenciación del ADN genómico concentrado se realizó utilizando la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq 2000 en el Instituto Macrogen de Korea (Seoul, República de Korea) en un formato de secuencias en pares (paired-end) de 100 bases de longitud. Las secuencias biológicas en formato FASTQ fue ensamblada con el programa Velvet 1.2.10 con un tamaño óptimo de k-mer de 51 (Zerbino y Birney, 2008), produciendo 417,034 conteos con un tamaño promedio de 346.9 bp con un máximo de 124,400 bp y cobertura promedio de 10.31X. El metagenoma reconstruido fue alineado a la base de datos de secuencias no-redundantes del NCBI (NR) para su anotación funcional. Los valores de identidad del nucleótido de cada lectura fueron utilizados para generar histogramas de frecuencias. Con un 94% o más el ploteo fue considerado como secuencia representativa para la identificación de especies (Konstantinidis y Tiedje, 2005). Adicionalmente, se compararon los fragmentos crudos fusionando los pares en una sola secuencia en formato Fasta y comparando contra las secuencias 16S y 18S de genes de rRNAs obtenidas del GenBank del NCBI mediante la similitud usando BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). La asignación del filum de las secuencias de rRNA se realizó utilizando MEGAN v5 (Huson *et al.*, 2011) donde adicionalmente se calculó el enriquecimiento y rarefacción de las muestras biológicas.

## 2.4 Resultados y discusión

### 2.4.1 Formación de biopelícula

El desarrollo de la biopelícula establecida en los electrodos de la CCM fue monitoreada por la medición de voltaje. En la Figura 2.1 se muestra una fase de adaptación en la cual no se observa producción de voltaje durante los primeros 5 días después de haber iniciado la operación, posteriormente se observó un rápido incremento de voltaje hasta alcanzar un máximo de 0.4 V aproximadamente, proceso que duró 7.3 días en el caso de la biopelícula BPE 1, y 9.5 días para las biopelículas BPE 2 y BPE 3. Posteriormente se observó una disminución de voltaje hasta 0.005 V en un periodo de 3.3 días en la biopelícula BPE1, una disminución a 0.0 V en 3.2 días para BPE 2 y 0.0 V en 2 días para BPE 3, posteriormente se reprodujeron 3 ciclos de voltaje con 0.35 V aproximadamente con una duración de 2 días aproximadamente cada uno al colocar acetato, lo cual representa un comportamiento característico de una biopelícula electroactiva formada sobre el electrodo (Yang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Durante el cuarto ciclo de alimentación, se procedió a analizar el desempeño de la celda y posteriormente el análisis de la composición de la comunidad microbiana establecida en la biopelícula.

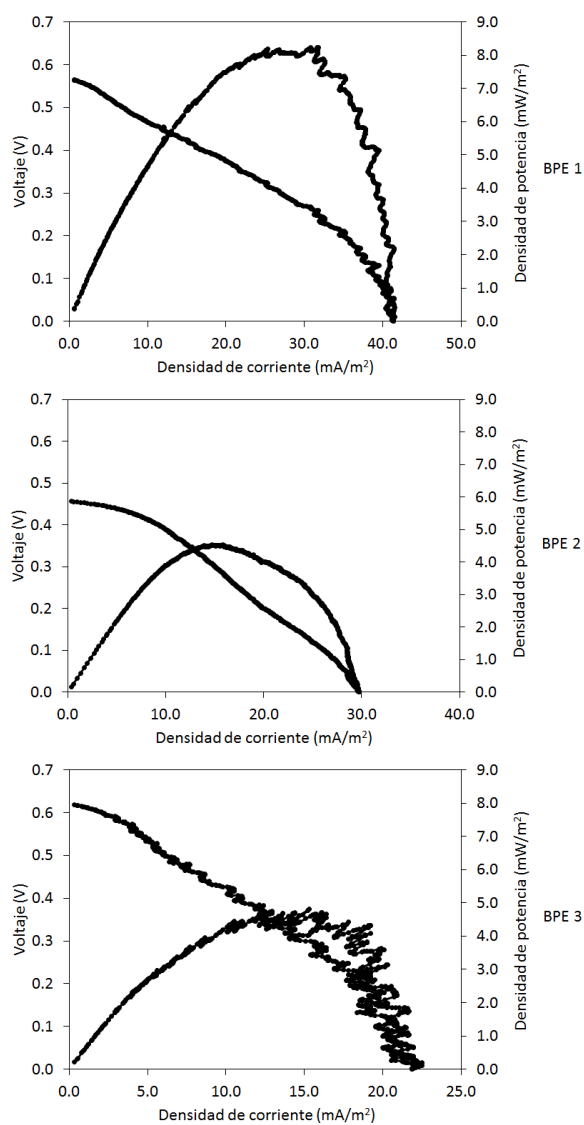


**Figura 2.1** Monitoreo de voltaje durante la formación de tres biopelículas electroactivas (BPE), utilizando un sedimento de lodos activados como inóculo y acetato como sustrato.



## 2.4.2 Análisis del desempeño de la celda de combustible microbiana.

En el desempeño de las celdas con las biopelículas formadas, las curvas de polarización y de potencia (Figura 2.2) mostraron un potencial a circuito abierto fue de 0.56 V en la BPE 1, 0.46 V en la BPE 2 y 0.62 V en la BPE 3. Una densidad de corriente máxima entre 22.5 y 41.4 mA/m<sup>2</sup> como se resume en la Tabla 2.1. La potencia máxima obtenida fue entre 4.3 y 8.1 mW/m<sup>2</sup>.



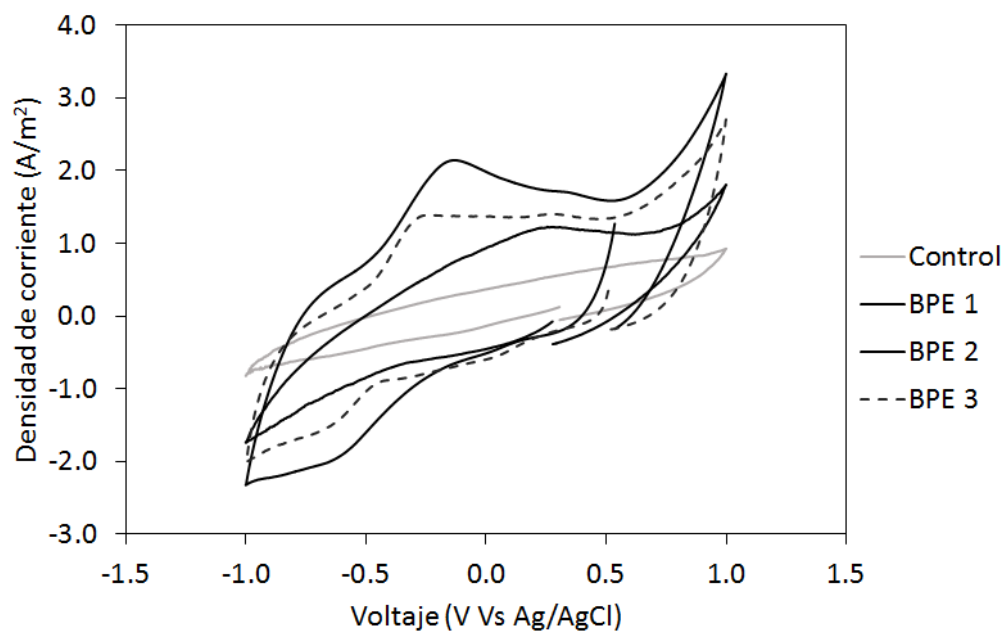
**Figura 2.2** Curvas de polarización y de potencia de las biopelículas formadas en las CCM.

**Tabla 2.1** Parámetros de la CCM después de 25 días de haber iniciado el experimento.

Biopelícula electroactiva	$E_{\text{ánodo}}$ (V Vs Ag/AgCl)*	$E_{\text{cátodo}}$ (V Vs Ag/AgCl)*	$R_{\text{int}}$ (K $\Omega$ )	$P_{\text{max}}$ (mW/m <sup>2</sup> )	$j_{\text{max}}$ (mA/m <sup>2</sup> )
<b>BPE 1</b>	-0.483	0.075	15.4	8.1	41.4
<b>BPE 2</b>	-0.607	0.018	21.6	4.5	29.7
<b>BPE 3</b>	-0.512	0.047	34.3	4.3	22.5

\*El electrodo de referencia Ag/AgCl fue colocado junto al electrodo de trabajo durante cada medición.

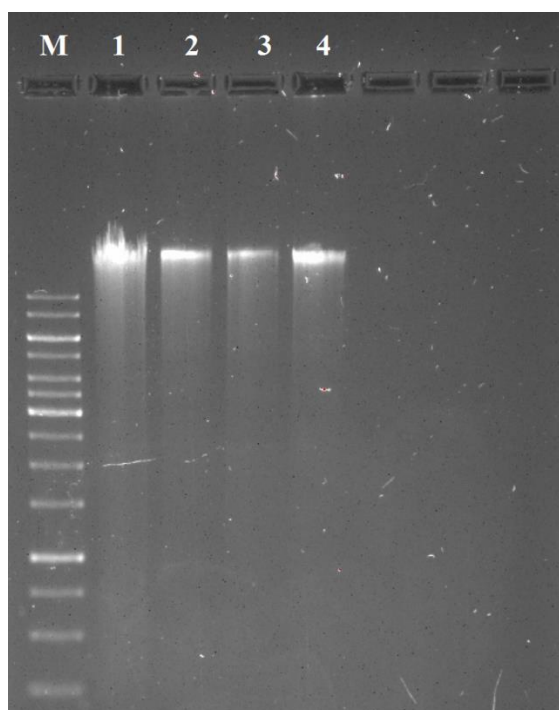
Las biopelículas electroactivas, presentaron un potencial anódico de -0.483, - 0.607 y -0.512 V Vs Ag/AgCl los cuales son valores característicos como consecuencia de la actividad exoelectrónica de los microorganismos (Martín *et al.*, 2013), mientras que el potencial catódico presentó valores entre 0.018 y 0.075 V Vs Ag/AgCl que favoreció la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo para la operación de las celdas (Zhao *et al.*, 2012). Los voltamperogramas cíclicos que se muestran en la Figura 2.3 muestran señales de oxidación y reducción de la actividad electroquímica de los microorganismos que formaron la biopelícula.



**Figura 2.3** Voltametrías cíclicas características de biopelículas electroactivas formadas.

### 2.4.3 Identificación microbiana

En la Figura 2.4 se observa la presencia del DNA extraído en cada protocolo de extracción, una vez que se aseguró la obtención del DNA, se procedió a concentrar las cuatro muestras de DNA para su secuenciación. La diversidad microbiana obtenida se muestra en la Tabla 2.1, en la cual se observa el listado de géneros microbianos encontrados y el filum al que pertenecen, identificándose la presencia de 13 filums: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Euryarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, *Thermotogae*, *Thaumarchaeota*, *Korarchaeota*, y *Aquificae*. Siendo el filum *Proteobacteria* el que presenta una mayor cantidad de géneros microbianos, como se observa en la Figura 2.5 a.

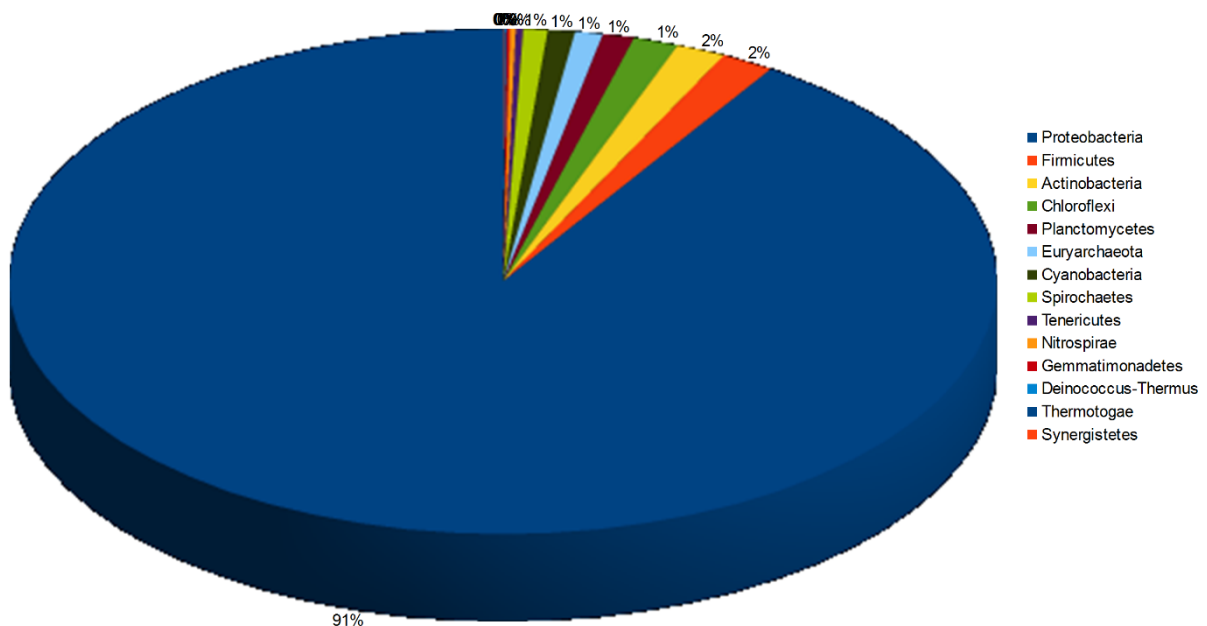


**Figura 2.4** DNA total extraído con cuatro protocolos de extracción (De izquierda a derecha M: Thermo Scientific generuler 1 Kb DNA ladder, 1: DNA purificado con protocolo ZR Fungal/Bacterial (Zymo Research), 2: Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research), 3: Fenol-Cloroformo 1:1 (V/V) (Yokoyama *et al.* 1999). y 4: Acetato de sodio con EDTA y lisozima a 37° (Varshney *et al.* 1991).

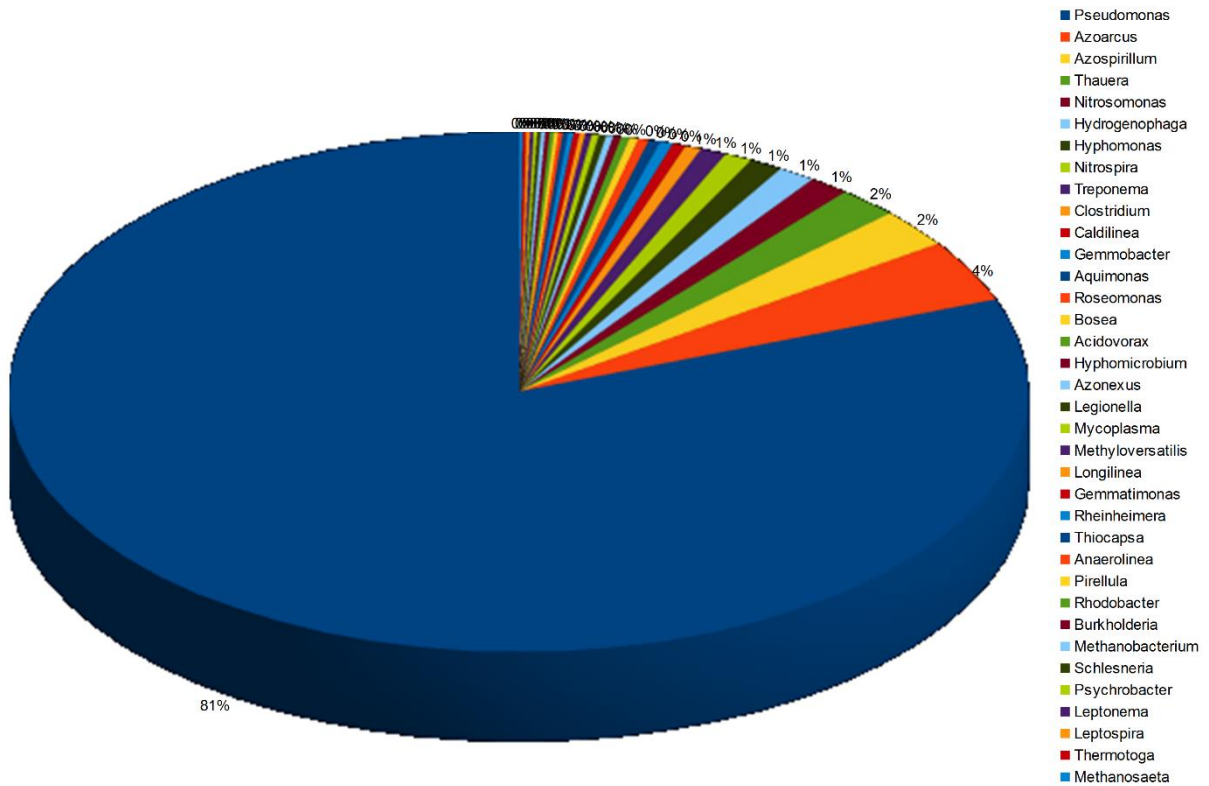
**Tabla 2.2** Composición de la comunidad bacteriana en la biopelícula formada en la CCM.

<b>Filum</b>	<b>Genero</b>
<b><i>Proteobacteria</i></b>	<i>Azonexus, Pseudoxanthomonas, Pseudomonas (81%), Azoarcus (4%), Azospirillum (2%), Thauera (2%), Nitrosomonas (1%), Hydrogenophaga (1%), Hyphomonas (1%), Gemmobacter, Aquimonas, Roseomonas, Bosea, Acidovorax, Hyphomicrobium, Legionella, Methyloversatilis, Rheinheimera, Rhodobacter, Burkholderia, Thiocapsa, Brevundimonas, Psychrobacter, Methylobacterium, Sphingobium, Comamonas, Mesorhizobium, Hirschia, Oleomonas, Ferrovibrio, Ehrlichia, Achromobacter, Bartonella, Devosia, Paracoccus, Sphingomonas, Pseudacidovorax, Dechloromonas, Propionivibrio, Thiobaca, Thiocystis, Cedecea, Cellvibrio, Nevskia, Caulobacter, Defluviimonas, Acetobacter, Asaia, Stella, Zavarzinia, Rhodospirillum, Anaplasma, Sphingopyxis, Cupriavidus, Lampropedia, Zoogloea, Acidithiobacillus, Lamprocystis, Lampropedia, Lonsdalea, Dyella, Silanimonas.</i>
<b><i>Firmicutes</i></b>	<i>Clostridium, Streptococcus, Mycoplasma, Oenococcus, Turicibacter, Acholeplasma, Listeria, Paenibacillus, Hazenella, Eubacterium, Helcococcus, Acetonema, Selenomonas.</i>
<b><i>Chloroflexi</i></b>	<i>Caldilinea, Longilinea, Anaerolinea, Levilinea, Dehalococcoides.</i>
<b><i>Planctomycetes</i></b>	<i>Pirellula, Schlesneria, Planctomyces, Bythopirellula, Gemmata.</i>
<b><i>Euryarchaeota</i></b>	<i>Methanobacterium, Methanosaeta, Methanospirillum, Methanosarcina.</i>
<b><i>Cyanobacteria</i></b>	<i>Calothrix</i>
<b><i>Spirochaetes</i></b>	<i>Spirochaeta, Treponema (1%), Leptonema, Leptospira, Turneriella.</i>
<b><i>Nitrospirae</i></b>	<i>Nitrospira (1%)</i>
<b><i>Gemmatimonadetes</i></b>	<i>Gemmatimonas</i>
<b><i>Thermotogae</i></b>	<i>Thermotoga</i>
<b><i>Thaumarchaeota</i></b>	<i>Nitrososphaera</i>
<b><i>Korarchaeota</i></b>	<i>Candidatus, Korarchaeum</i>
<b><i>Aquificae</i></b>	<i>Hydrogenobaculum</i>

El análisis filogenético mostró la abundancia relativa representada en porcentaje para cada filum (Figura 2.5), la comunidad predominante fue *Proteobacteria* (91%), seguida de *Firmicutes* (2%), *Actinobacteria* (2%) y otros filums que fueron presentados en abundancias menores. Las curvas de rarefacción y los diferentes índices de diversidad basados en la secuenciación del rRNA, indicaron un estimado de 100 géneros. Los análisis taxonómicos (Figura 2.6) indicaron que el género *Pseudomonas* fue el más común (81%), seguido por *Azoarcus* (4%), *Azospirillum* (2%), *Thauera* (2%) y otros géneros bacterianos presentados en menor abundancia. Los análisis correspondientes basados en el metagenoma y la asignación taxonómica por las lecturas de 16S rRNA, mostraron que el voltaje obtenido en la CCM podría estar asociado principalmente por *Proteobacteria*, específicamente el género *Pseudomonas* que ha sido reportado como un microorganismo exoelectrógeno (Rabaey y Verstraete, 2005; Du *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008). Algunos otros géneros fueron encontrados en estas biopelículas como *Clostridium*, *Streptococcus* y *Paracoccus* que han sido identificados también en la generación de voltaje (Rabaey y Verstraete, 2005; Du *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Kiely *et al.*, 2010; Pant *et al.*, 2010).



**Figura 2.5** Abundancia relativa de filums presentes en la biopelícula.



**Figura 2.6** Abundancia relativa de géneros microbianos encontrados en la biopelícula.

## 2.5 Conclusiones

El voltaje máximo obtenido en las celdas, las densidades de corriente y la forma de los voltamperogramas cíclicos, presentaron el comportamiento típico de una biopelícula electroactiva, la caracterización microbiana, mostró una comunidad predominante de *Proteobacteria* (91%) con microorganismos principalmente del género *Pseudomonas* (81%), por lo que la generación de energía podría estar asociada principalmente a las *Pseudomas* encontradas en la biopelícula. Estos resultados muestran que es posible obtener una biopelícula electroactiva con microorganismos del género *Pseudomonas* principalmente a partir de un inóculo del sedimento de un reactor de lodos activados utilizando acetato como sustrato y una temperatura de 25° C.

## CAPITULO III

### EFFECTO DEL ÁCIDO HÚMICO EN LA OPERACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

#### Resumen

El efecto del ácido húmico en la operación de celdas de combustible microbianas fue investigado a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 g/L), la adición de 0.5 g/L presentó la mayor generación de voltaje (0.7 V), la mayor densidad de corriente (52.64 mA/m<sup>2</sup>) y la mayor densidad de potencia (10 mW/m<sup>2</sup>), estos resultados demuestran que a concentraciones de 0.5 g/L, el ácido húmico puede actuar como facilitador a la transferencia de electrones, mientras que a concentraciones mayores de 1.0 g/L de ácido húmico no favoreció el desempeño de la celda de combustible microbiana, ya que se puede estar formando una barrera a la transferencia de electrones o formar pseudomicelas que disminuyen la disponibilidad de los grupos funcionales con capacidad de aceptar y donar electrones.

#### 3.1 Introducción

Las celdas de combustible microbianas (CCM) son sistemas bioelectroquímicos que utilizan microorganismos exoelectrógenos (que liberan electrones) para la degradación de un sustrato y producir electricidad (Sund *et al.*, 2007); los electrones liberados pueden ser transferidos al ánodo por contacto directo, usando un mediador redox o por nanofibras, que son estructuras propias del microorganismo (Cusick *et al.*, 2010). Desde 1980 se descubrió que la densidad de potencia obtenida en celdas de combustible microbiana (CCM) puede incrementar con la adición de mediadores de electrones, ya que los mediadores en un estado oxidado pueden fácilmente ser reducidos por la captura de electrones provenientes de la membrana microbiana para posteriormente ceder los electrones al ánodo. Un mediador en CCM's debe poseer las siguientes características: tener solubilidad en el anolito, ser no biodegradable ni tóxico para los microorganismos y ser de bajo costo. Se han utilizado mediadores de electrones sintéticos y naturales (Du *et al.*, 2007). Los mediadores redox naturales no resultan tóxicos para los

microorganismos y no representan riesgo de contaminación al medio ambiente (Sund *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2007).

Las sustancias húmicas son compuestos complejos formados por la descomposición de plantas, son resistentes a la descomposición microbiana y contienen grupos funcionales con propiedades redox (Palmer y Wandruszka, 2010), por lo que su aplicación en celdas de combustible microbianas podría facilitar la transferencia de electrones en las CCM's (Huang y Angelidaki, 2008). Estudios previos en los que se ha probado el ácido húmico con glucosa y xilosa han demostrado un efecto positivo al incrementar la densidad de potencia producida (Thygesen *et al.*, 2009), incluso el incremento en la densidad de potencia ha sido comparado utilizando mediadores redox como la antroquinona disulfonato (AQDS), safranina O, resazurina y azul de metileno (Sund *et al.*, 2007), por lo que su estudio puede contribuir a entender, explicar y proponer la aplicación de los ácidos húmicos en el funcionamiento de una CCM.

### **3.2 Metodología**

#### 3.2.1 Obtención de la biopelícula

Para la formación de la biopelícula, se utilizó el procedimiento descrito en el Capítulo I, en el que se utilizó 150 mL de inóculo, acetato de sodio 10 mM como sustrato y nutrientes 1 mL/L. La alimentación se hizo por lotes y la adición de sustrato se realizó toda vez que se observó el agotamiento de este, este procedimiento se repitió durante 2 ciclos; en el segundo ciclo se realizaron análisis de voltametría cíclica, curva de polarización y de potencia, así como la medición del potencial de electrodo.

#### 3.2.2 Evaluación del efecto de la adición de ácido húmico

Una vez que la biopelícula se encontró formada, se colocó el ácido húmico en las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 g/L en la solución del anolito y se continuó suministrando sustrato cada vez que se observó agotamiento en el monitoreo del voltaje. Al final de la prueba, se realizaron análisis de voltametría cíclica, curva de polarización y de potencia, así como la medición del potencial de electrodo.



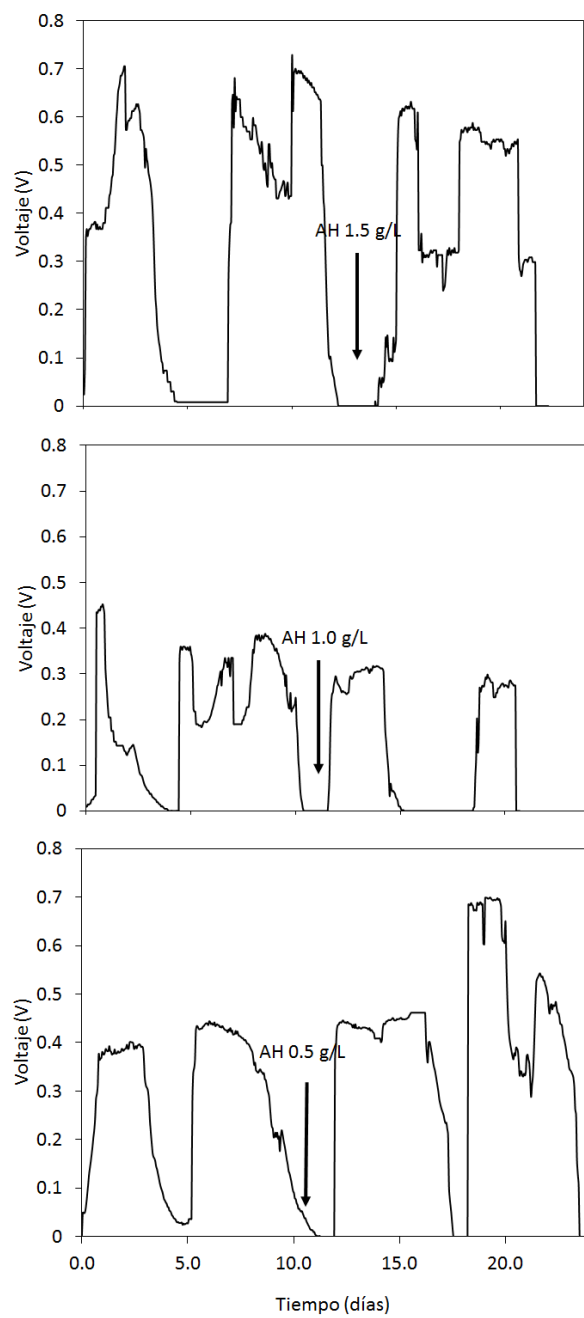
### 3.2.3 Análisis electroquímicos.

Los análisis de voltametría cíclica se realizaron en una ventana de potencial de -1.0 a 1.0 V y una velocidad de barrido de 20 mV/s. Todos los experimentos se realizaron con un potenciostato (BASi Epsilon-EC, Bioanalytical Systems, Inc.), un electrodo de referencia Ag/AgCl (0.209 V Vs NHE). Las curvas de polarización se obtuvieron mediante la técnica de Voltametría Lineal de Barrido (LSV, por sus siglas en inglés) a una velocidad de barrido de 1 mV/s (Liu *et al.*, 2012). La densidad de corriente y densidad de potencia fue calculada utilizando el área de la superficie anódica. Y el potencial de electrodo se midió utilizando un sistema de tres electrodos.

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Efecto del ácido húmico en la generación de voltaje.

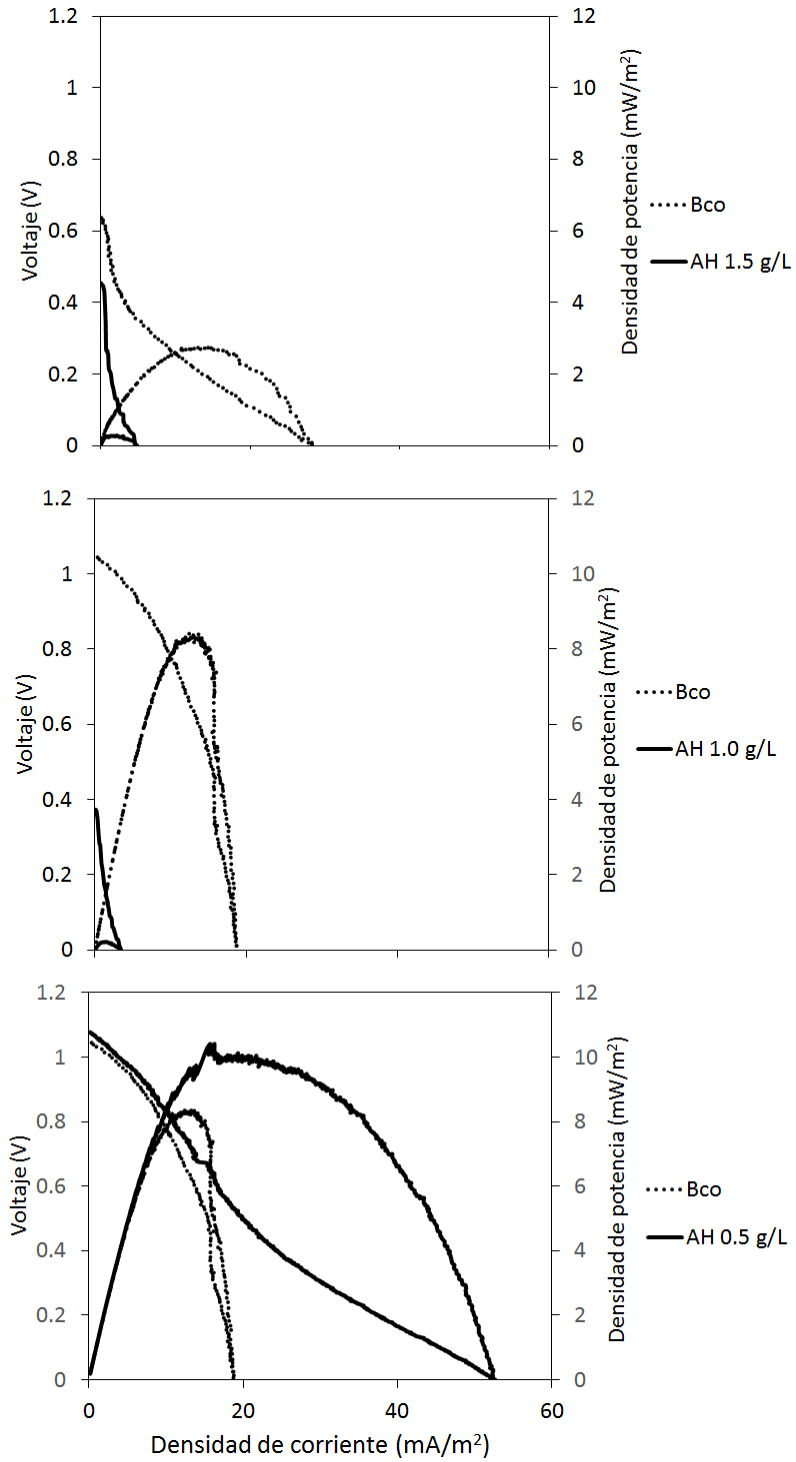
En la Figura 3.1 se muestra que el mayor incremento de voltaje se obtiene con la adición de 0.5 g/L de ácido húmico (AH), aunque no se obtuvo un efecto inmediato, se observó un incremento desde un voltaje de 0.4 V hasta un voltaje de 0.7 V en el ciclo posterior a la introducción del AH. Las concentraciones más altas de AH de 1.0 y 1.5 g/L, no presentaron un incremento en el voltaje obtenido. Estos resultados indican que una concentración de 0.5 g/L de AH es suficiente para facilitar la transferencia de electrones e incrementar el voltaje obtenido para una concentración 10 mM de acetato. Mientras que las concentraciones de 1.0 y 1.5 g/L pudieran estar formando una capa que probablemente actúe como una barrera a la transferencia de electrones y afectar la generación de voltaje en la CCM como se ha observado en estudios previos con el uso de xilosa y AH comercial (Feificova *et al.*, 2005; Huang y Angelidaki, 2008). Por otro lado, se ha reportado que a altas concentraciones de AH la interacción entre sus grupos funcionales da lugar a la formación de pseudomicelas en medios acuosos, generando una conformación de la molécula donde se evita la disponibilidad de los grupos funcionales aceptores y donadores de electrones (Stevenson, 1994; Baalousha *et al.*, 2005), lo cual, pudiera evitar el efecto positivo en la generación de voltaje en una CCM.



**Figura 3.1** Monitoreo de voltaje Vs tiempo con acetato como sustrato y la adición de ácido húmico a una concentración de 0.5 1.0 y 1.5 g/L.

### 3.3.2 Efecto del ácido húmico en la generación de potencia.

Adicional al incremento de voltaje que se observó en la Figura 3.1 con la adición de 0.5 g/L de AH también presentó un incremento en la densidad de potencia (Figura 3.2). Particularmente, aumentó de 8.36 mW/m<sup>2</sup> sin AH a 10 mW/m<sup>2</sup> con 0.5 g/L de AH, lo cual puede relacionarse con un incremento en la densidad de corriente, de 18.82 mA/m<sup>2</sup> sin AH a 52.64 mA/m<sup>2</sup> con 0.5 g/L de AH, como se muestra en la Tabla 3.1. Asimismo, la presencia de los AH disminuyó la resistencia interna ( $R_{int}$ ) de la CCM de 16.60 a 5.96 K $\Omega$ . La disminución de la resistencia interna puede ser atribuida principalmente en este caso a una mejor transferencia de electrones en la superficie del electrodo y en el electrolito. Por otro lado, en las celdas con concentraciones altas de ácido húmico y que no presentaron un incremento en el voltaje tampoco presentaron incremento en la densidad de potencia y densidad de corriente (Figura 3.2), lo cual pudo ser debido al incremento en la resistencia interna de la celda, a una concentración de 1.0 g/L de AH, la  $R_{int}$  incremento de 16.52 K $\Omega$  a 30.60 K $\Omega$  y con la concentración de 1.5 g/L de AH, incrementó de 5.67K $\Omega$  a 25.42K $\Omega$  (Tabla 3.1).



**Figura 3.2** Curvas de potencia y curvas de polarización sin ácido húmico y a diferentes concentraciones de ácido húmico.

**Tabla 3.1** Parámetros de desempeño de la CCM a diferentes concentraciones de ácido húmico.

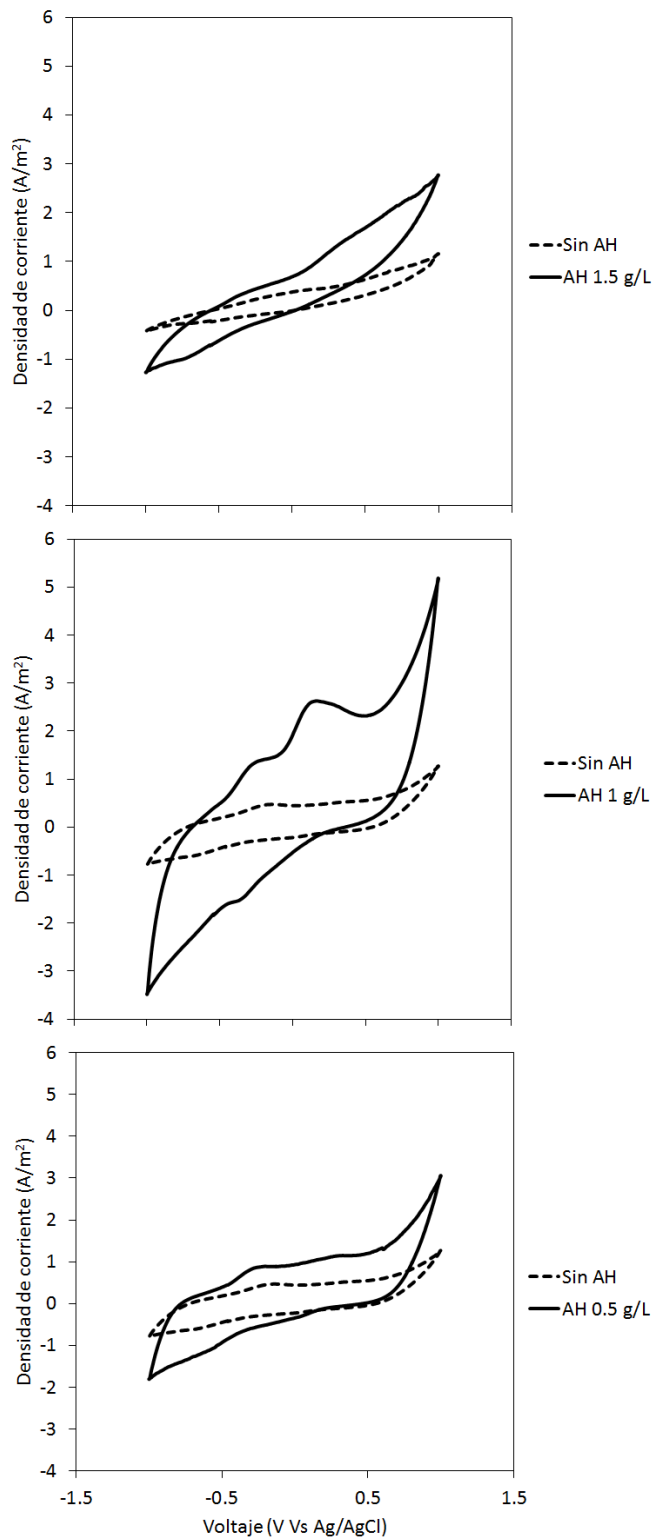
Parámetro	Sin AH	AH	Sin AH	AH	Sin AH	AH
		0.5 g/L		1.0 g/L		1.5 g/L
$E_{\text{ánodo}}$ (V Vs Ag/AgCl)	-0.50	-0.52	-0.46	-0.17	-0.56	-0.32
$E_{\text{cátodo}}$ (V Vs Ag/AgCl)	0.02	-0.16	0.05	-0.12	0.05	-0.18
$P_{\text{max}}$ (mW/m <sup>2</sup> )	8.36	10.0	8.19	0.29	2.71	0.26
$J_{\text{max}}$ (mA/m <sup>2</sup> )	18.82	52.64	28.82	4.92	28.82	4.92
$R_{\text{int}}$ (K $\Omega$ )	16.60	5.96	16.52	30.60	5.67	25.42

### 3.3.3 Efecto del ácido húmico en los potenciales de electrodo y voltametría cíclica.

El potencial anódico ( $E_{\text{ánodo}}$ ) y catódico ( $E_{\text{cátodo}}$ ) fue medido en la fase estable del monitoreo del voltaje, justo antes de adicionar el ácido húmico y en el segundo ciclo después de la adición, los resultados obtenidos se describen a continuación: antes de agregar el AH,  $E_{\text{ánodo}}$  y  $E_{\text{cátodo}}$  presentaron valores similares en todos los casos,  $E_{\text{ánodo}}$  de -0.50, -0.46 y -0.56 V Vs Ag/AgCl mientras que en  $E_{\text{cátodo}}$  presentó valores de 0.02, 0.05 y 0.05 V Vs Ag/AgCl, como se muestra en la Tabla 3.1. Posterior a la adición de ácido húmico, el  $E_{\text{ánodo}}$  presentó diferencias en los valores obtenidos de -0.52 V Vs Ag/AgCl con la concentración de 0.5 g/L de AH, -0.17 V Vs Ag/AgCl (1.0 g/L AH) y -0.32 V Vs Ag/AgCl (1.5 g/L AH), y respecto a  $E_{\text{cátodo}}$  se obtuvieron

valores similares de  $-0.16 \text{ V Vs Ag/AgCl}$  (0.5 g/L AH),  $-0.12 \text{ V Vs Ag/AgCl}$  (1.0 g/L AH) y  $-0.18 \text{ V Vs Ag/AgCl}$  (1.5 g/L AH). Estos resultados demuestran que la presencia del ácido húmico fue evidente por el cambio en los valores de  $E_{\text{ánodo}}$  y  $E_{\text{cátodo}}$  obtenidos antes y después de agregar el ácido húmico. El mejor desempeño de la CCM se obtuvo con la adición de AH de 0.5 g/L, como se observó en el monitoreo de voltaje (Figura. 3.1) y potencia generada (Figura 3.2), lo cual fue favorecido por los valores de potencial que presentó la CCM,  $E_{\text{ánodo}} -0.52 \text{ V Vs Ag/AgCl}$  y  $E_{\text{cátodo}} -0.16 \text{ V Vs Ag/AgCl}$ . Trabajos previos, han reportado potenciales anódicos entre  $-0.30$  y  $-0.42 \text{ mV Vs Ag/AgCl}$ , resultado de la mayor actividad exoelectrónica de los microorganismos que proliferaron en la superficie de los electrodos (Martin *et al.*, 2013), y se ha demostrado que el funcionamiento óptimo de la celda es obtenido cuando el potencial anódico es lo más negativo posible y el cátodo lo más positivo (Zhao *et al.*, 2012), el potencial negativo del ánodo es debido a los electrones transferidos al ánodo procedentes de la biocatálisis, por lo que el potencial anódico desempeña un papel importante en el desempeño de la celda, y determina la energía teórica ganada por la biocatálisis (Zhao *et al.*, 2012).

En las voltametrías cíclicas de la Figura 3.3, es evidente la presencia del AH por el incremento en la corriente de todos los voltamperogramas, como resultado de un efecto dinámico que presenta el ácido húmico al aumentar la transferencia de electrones, con ello, se favoreció la definición de las señales de oxidación y reducción, las cuales, podrían ser debidas a la biomasa activa que realiza la bioelectrooxidación del acetato, la producción de mediadores por parte de los microorganismos presentes en la biopelícula (Zhang *et al.*, 2011) y/o la respuesta de los sitios de transferencia de electrones que se refieren a los citocromos presentes en la membrana celular de los microorganismos (Patil *et al.*, 2011 y Martin *et al.*, 2013).



**Figura 3.3.** Voltametrías cíclicas de la biopelícula sin ácido húmico (Bco) y con ácido húmico, a) 0.5 g/L, b) 1.0 g/L, c) 1.5 g/L.

### **3.4 Conclusiones**

El mejor desempeño de la CCM en términos de voltaje, densidad de corriente y potencia se obtuvo con la adición de 0.5 g/L de AH, lo que puede confirmar que el AH favorece la transferencia de electrones, no obstante, la adición de concentraciones mayores a 1.0 g/L de AH disminuye el desempeño de la CCM posiblemente debido a la formación de una capa sobre la superficie del electrodo que funciona como una barrera a la transferencia de electrones o posiblemente se llegan a formar pseudomicelas en la solución acuosa que disminuye la disponibilidad de los grupos funcionales con capacidad para aceptar y donar electrones.



## CAPÍTULO IV

### ESTUDIO DE PROPIEDADES REDOX DE ÁCIDOS HÚMICOS MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

#### 4.6 Resumen del capítulo

En este estudio, se utilizó la Voltametría cíclica para caracterizar las propiedades redox de los ácidos húmicos. Primeramente se analizó el ácido húmico a diferentes velocidades de barrido en un pH de 7 con una concentración de 0.5 g/L y un electrodo de trabajo de carbón vítreo. Los voltamperogramas obtenidos no mostraron señales de reacciones de oxidación y reducción bien definidas, por lo que, se procedió a utilizar concentraciones más altas de ácidos húmicos, entre 0.5 y 3.0 g/L, y finalmente un pH de 10, ya que se ha reportado que a pH básico incrementan las propiedades redox. Nuevamente, los voltamperogramas no mostraron señales de oxidación y reducción, sin embargo, se observó que al aumentar las concentraciones del ácido húmico hubo un incremento de la corriente; a pH 10 también se observó una mayor corriente comparado con un pH 7. La ausencia de las señales de oxidación y reducción puede ser debido a las condiciones de análisis trabajadas, ya que las condiciones de trabajo fueron elegidas en base a las condiciones de operación de una celda de combustible microbiana para poder correlacionar los resultados. Los análisis de cronopotenciometría de corriente nula mostraron que el ácido húmico presenta un potencial reductor, el cual varía con la concentración de ácido húmico, a mayor concentración tiende a potenciales positivos.

#### 4.7 Introducción

Los ácidos húmicos son compuestos orgánicos complejos formados por la descomposición microbiana de plantas (Thygesen *et al.*, 2009), su estructura molecular está formada por anillos aromáticos unidos a átomos de oxígeno formando cadenas con sustituyentes como OH de grupos fenólicos, cetonas, ácidos carboxílicos, amino ácidos y péptidos, sacáridos, amino sacáridos entre otros. La presencia de múltiples especies redox ha mostrado la capacidad de los ácidos húmicos para aceptar y donar electrones, estas especies redox se han clasificado como grupos quinonas y grupos no quinonas, donde los grupos no quinoides son responsables del 21-56% de la capacidad de transferencia de electrones (Ratasuk, 2004). Entre los grupos no quinoides se

pueden encontrar los grupos carboxilos, fenólicos, carbonilos, metoxilos, enólicos y catecoles (Stevenson, 1994; Ratasuk, 2004; Palmer y Wandruszka, 2010), mientras que los tioles y disulfuros pueden realizar reacciones redox reversibles para la formación de sulfóxidos (Ratasuk, 2004 y Fimmen *et al.*, 2007). La capacidad oxido reducción de los ácidos húmicos está en función del contenido de grupos funcionales, lo cual depende de la diferente composición de los sustratos que degradan los microorganismos para la formación de los ácidos húmicos (Stevenson, 1994; Ratasuk, 2004; Palmer y Wandruszka, 2010), o del incremento de la concentración de ácidos húmicos que genera una mayor cantidad de grupos funcionales con propiedades redox (Palmer y Wandruszka, 2010). El pH en los ácidos húmicos afecta el grado de disociación de grupos ácidos, ocasionando plegamiento de la molécula y una mayor exposición de grupos funcionales, por lo que la capacidad reductora puede variar en diferentes pH (Matthiessen, 1995).

## **4.8 Metodología experimental**

### **4.8.1 Voltametría cíclica de ácidos húmicos**

Para evaluar las propiedades redox del ácido húmico se realizaron pruebas de voltametría usando un Potenciostato Epsilon (modelo 263-A, EG y G. USA) y una celda electroquímica, equipada con un electrodo auxiliar de platino, un electrodo de referencia Ag/AgCl (NaCl 3M), un electrodo de trabajo de carbón vítreo, y usando una ventana de potencial de -1.0 a +1.0 V. Las condiciones de trabajo que se estudiaron fueron la velocidad de barrido, la cual se realizó a 20, 40, 60, 80 y 100 mV/s y usando diferentes concentraciones de ácido húmico de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 g/L. Se realizaron pruebas a diferentes valores de pH, usando un buffer de fosfatos para establecer un pH de 7 y un buffer de NaOH/NaHCO<sub>3</sub> para realizar pruebas a pH 10. Se utilizó el ácido húmico de Sigma Aldrich y un estándar de la IHSS (International Humic Substance Society). Antes de cada medición, las soluciones experimentales fueron aireadas con nitrógeno gas ultra puro por 15 minutos.

#### 4.8.2 Cronopotenciometría de corriente nula de ácidos húmicos

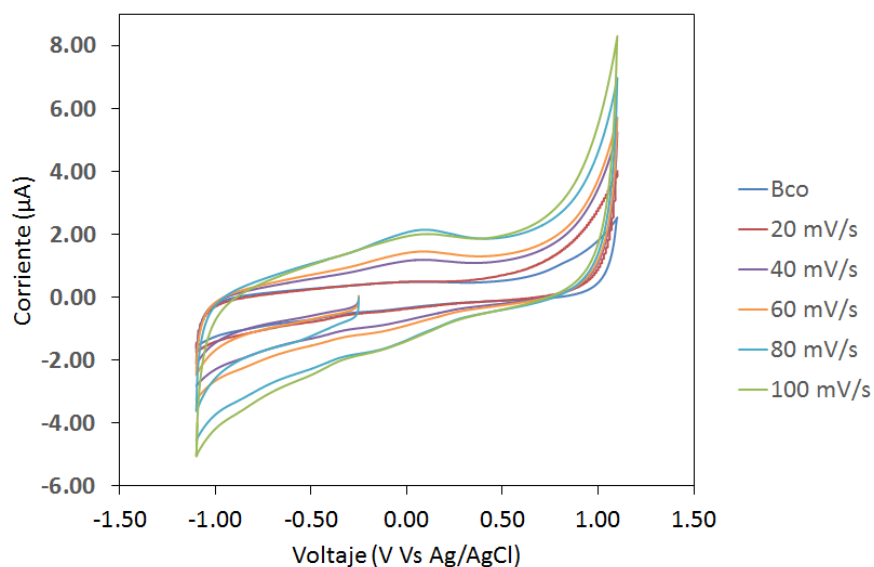
Con el objeto de analizar el efecto de la concentración del ácido húmico, se midió el potencial interfásial mediante cronopotenciometría de corriente nula utilizaron concentraciones de 0.5 a 3.16 g/L de ácidos húmicos en buffer de fosfatos pH 7, las diferentes concentraciones fueron aireadas con nitrógeno gas por 10 minutos antes de cada medición, se utilizó un electrodo de trabajo de carbón vítreo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y electrodo auxiliar de platino, el tiempo de medición fue de 400 segundos.

## 4.9 Resultados y discusión

### 4.9.1 Voltametría cíclica de ácidos húmicos en solución acuosa

#### Efecto de la velocidad de barrido

Con el objeto de estudiar las señales de reducción y oxidación del ácido húmico con condiciones semejantes a la operación de celdas de combustible microbianas, se realizaron voltametrías cíclicas a diferentes velocidades de barrido en una solución acuosa con buffer de fosfatos pH 7 y electrodo de trabajo de carbón. En la Figura 4.1. Se muestran las voltametrías cíclicas, las cuales no presentaron señales bien definidas de reacciones de oxidación y reducción ni a bajas velocidades, ni a altas, el desarrollo de voltametrías cíclicas a diferentes velocidades de barrido permite estudiar procesos dependientes del tiempo, buscando la presencia de transferencia de electrones en procesos simples o en procesos heterogéneos que implican velocidades de barrido altas o bajas respectivamente (Bard *et al.*, 2008), en este caso, la ausencia de señales de oxidación y reducción puede ser atribuido a la complejidad de la molécula (Baalousha *et al.*, 2005; Stevenso, 1994) y las condiciones de operación del experimento (Helburn y McCarthy, 1994). Sin embargo, la Figura 4.1 muestra como la magnitud de la corriente aumenta conforme aumenta la velocidad de barrido de potencial.



**Figura 4.1.** Voltametría cíclica con ácido húmico a diferentes velocidades de barrido. pH 7 y concentración 0.5 g/L.

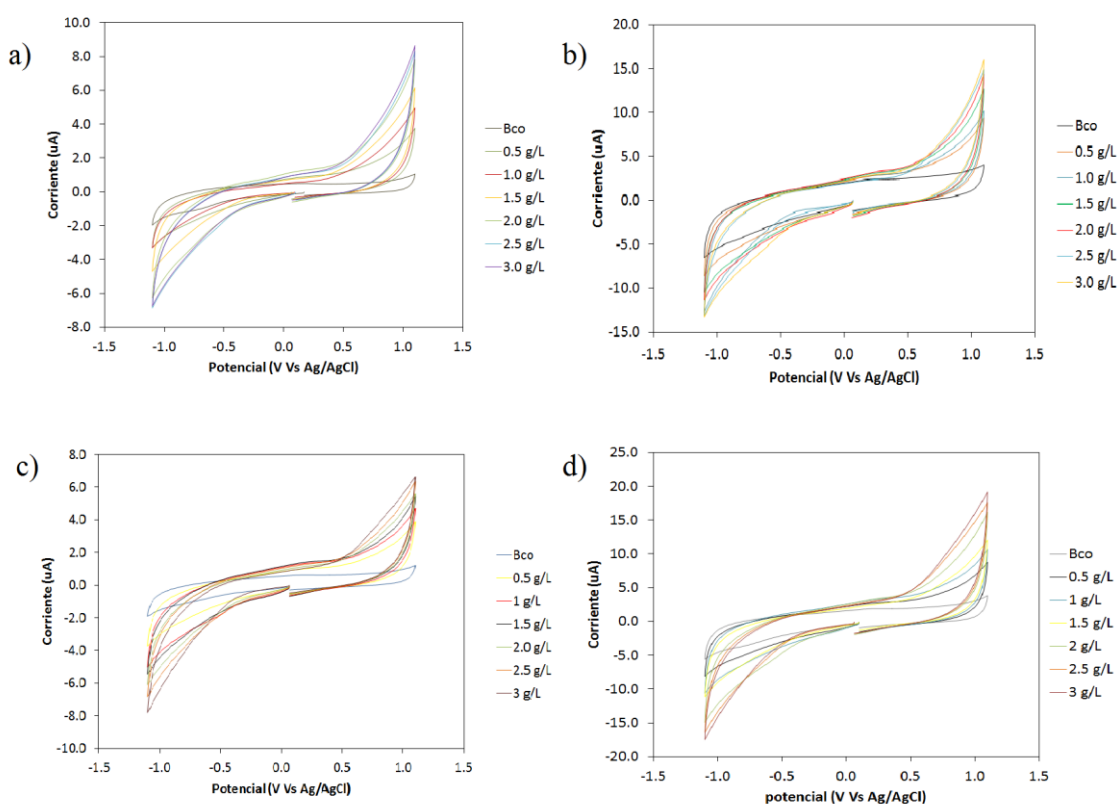
### Efecto de la concentración

Con el fin de evaluar si a concentraciones más altas de ácido húmico se podría diferenciar de mejor manera las señales de oxidación y reducción, se realizaron pruebas usando concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 g/L ya que estas concentraciones de ácido húmico han sido utilizadas en CCM (Huang y Angelidaki, 2008 y Sund *et al.*, 2007). Como se muestra en la Figura 4.2, las voltametrías cíclicas muestran la presencia del ácido húmico con un incremento en la corriente lo que coincide con trabajos anteriores (Helburn y McCarthy, 1994), encontrando que a mayor concentración de ácido húmico, se genera una mayor cantidad de corriente anódica y catódica. Este comportamiento se observó con la muestra de AH de Aldrich tanto a 100 mV/s como a 500 mV/s (Figuras 4.2 a y b respectivamente) así como en la muestra de AH de la IHSS a 100 mV/s y a 500 mV/s (Figuras 4.2 c y d). Sin embargo, nuevamente no se observaron señales de reacciones de oxidación y reducción bien definidas que permitan identificar reversibilidad de grupos funcionales, encontrando nuevamente voltamperogramas como los reportados por Helburn y McCarthy, 1994. Por lo que se procedió a analizar el efecto del pH. Nuevamente la ausencia de señales de oxidación y reducción pueden ser debido a la complejidad de la molécula (Baalousha *et al.*, 2005; Stevenson, 1994) y aunado al incremento de la concentración de ácido húmico lo cual propicia la formación de pseudomicelas que encapsula los grupos funcionales con actividad redox y genera una precipitación (Stevenson, 1994), así como también las condiciones de operación del experimento ya que el análisis en soluciones no acuosas favorece el análisis del ácido húmico (Nurmi y Tratnyeck, 2002; Huang *et al.*, 2010).

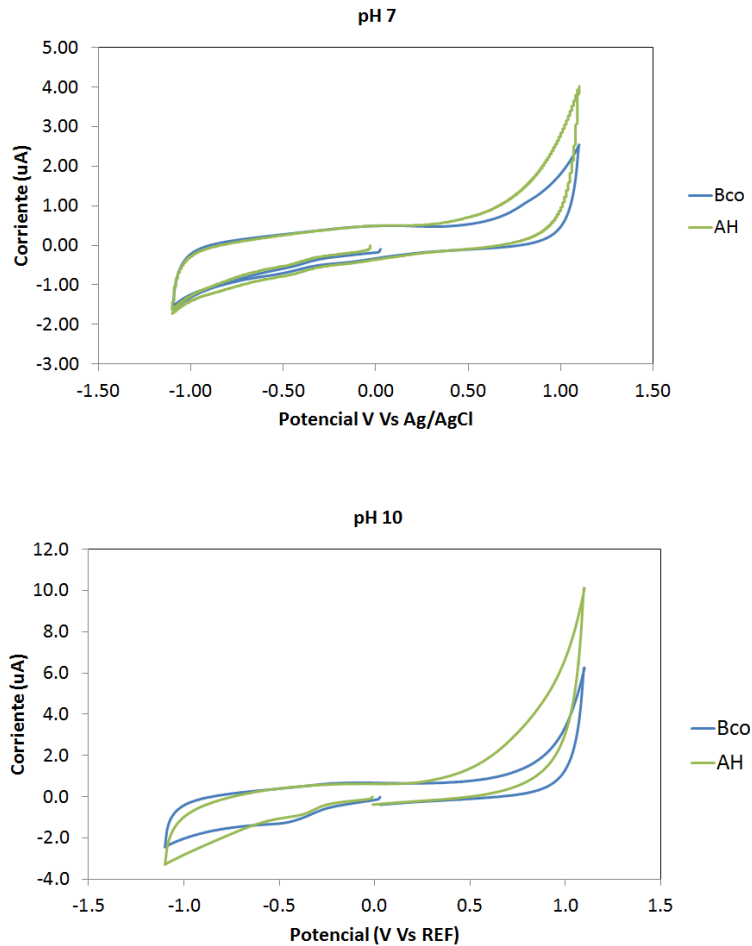
### Efecto del pH

Se realizaron voltametrías cíclicas a un pH de 10, ya que se ha reportado que los ácidos húmicos presentan mayor capacidad redox a pH alcalinos (Struyk y Sposito, 2001). Las voltametrías cíclicas obtenidas se compararon con las que se obtuvieron a pH 7 y se muestran en la figura 4.3. Se observó un incremento en la corriente a pH 10 lo cual pudo ser debido a que la actividad

electroactiva incrementó debido al pH y la oxidación y reducción del solvente generó una mayor cantidad de corriente (Nurmi y Tratnyek, 2002). El incremento del pH incrementa la capacidad redox de los ácidos húmicos posiblemente debido a la disociación de grupos fenólicos principalmente (Matthiessen, 1995).



**Figura 4.2.** Voltametrías cíclicas a diferentes concentraciones de ácido húmico. a) ácido húmico Aldrich a 100 mV/s, b) ácido húmico Aldrich a 500 mV/s, c) ácido húmico IHSS a 100 mV/s, d) ácido húmico IHSS a 500 mV/s.

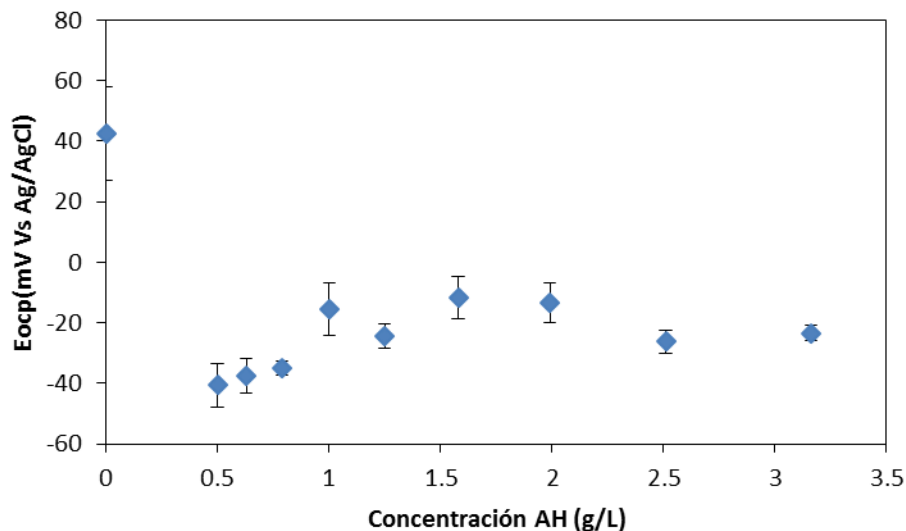


**Figura 4.3** Voltametrías cíclicas de ácidos húmicos para estudiar el efecto del pH.

#### 4.4.2 Cronopotenciometría de corriente nula de ácidos húmicos

Los estudios de cronopotenciometría de corriente nula, corroboraron un efecto a diferentes concentraciones de ácido húmico que se observó en los análisis de voltametría cíclica. En estos resultados primeramente se observó que los ácidos húmicos en solución generan potenciales reductores, ya que el electrolito sin ácido húmico presentó 40 mV Vs Ag/AgCl, valor que cambia al colocar una concentración de 0.5 g/L. Sin embargo, conforme se aumenta la concentración de ácido húmico el  $E_{ocp}$  cambia hasta alcanzar -18 mV Vs Ag/AgCl a una concentración de 1 a 2 g/L, (figura 4.4). Estos cambios de potencial pueden ser debidos a la configuración que adquiere la molécula sobre la interfase del electrodo cuando se va

incrementado la concentración de ácido húmico, ya que se podrían producir interacciones entre sus grupos funcionales y llegar a la formación de agregados moleculares conocidos como micelas (Palmer y Wandruska, 2010).



**Figura 4.4** Cronopotenciometría de corriente nula del ácido húmico a diferentes concentraciones.

#### 4.10 Conclusiones

La ausencia de las señales de oxidación y reducción no permitió estudiar a detalle las propiedades oxido reducción de los ácidos húmicos, lo cual pudo ser debido a las condiciones de trabajo que se desarrollaron, sin embargo estas condiciones de trabajo fueron elegidas en base a la operación de una celda de combustible microbiana para poder correlacionar los resultados obtenidos. No obstante se observó que el ácido húmico presenta una actividad electroactiva, la cual fue evidente por el incremento de corriente en los voltamperogramas obtenidos como resultado de la reducción y oxidación del electrolito. Se encontró que el incremento de la concentración y el incremento de pH pueden generar una mayor actividad electroactiva debido posiblemente a un incremento en la concentración y disponibilidad de grupos funcionales, el efecto de la concentración de ácidos húmicos, pudo corroborarse con los resultados obtenidos con la cronopotenciometría de corriente nula. Siendo entonces que la



actividad electroactiva que presentó el ácido húmico pudiera favorecer la operación de las CCM's.

## CAPÍTULO V

### ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO HÚMICO EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA.

#### 5.1 Resumen

Las sustancias húmicas en celdas de combustible microbianas son consideradas como mediadores redox ya que se ha observado un incremento en la generación de voltaje y densidad de potencia, con el objeto de obtener información detallada sobre el funcionamiento del ácido húmico sobre las CCM's, se analizó el efecto de la adición de 0.5 g/L de ácido húmico por espectroscopia de impedancia electroquímica. Los resultados mostraron que se disminuye la resistencia global de la celda, lo cual puede ser debido a que disminuye la resistencia del electrolito y la resistencia a la polarización, por lo que el ácido húmico pudiera estar actuando como un facilitador a la transferencia de carga.

#### 5.2 Introducción

Las sustancias húmicas son materiales complejos que consisten de un gran número de compuestos formados como producto de la descomposición de plantas y animales (Huang y Angelidaki, 2008), son resistentes a la degradación de los microorganismos y pueden ser clasificadas por su solubilidad como ácido húmico que es la fracción soluble en pH neutro y alcalino, ácido fúlvico que es la fracción soluble a todos los valores de pH y huminas que es la fracción insoluble (Albers *et al.*, 2008). Algunos investigadores consideran el uso de sustancias húmicas como mediadores ya que han observado un incremento en la generación de voltaje y densidad de potencia frente al uso de diversos sustratos (Huang y Angelidaki, 2008; Thygesen *et al.*, 2009), sin embargo, aún es limitado el conocimiento sobre su efecto sobre las CCM's. La espectroscopia de impedancia electroquímica es un método que permite investigar las propiedades eléctricas de un sistema mediante la medición de su respuesta al imponer una pequeña perturbación AC (en voltaje o corriente) a un estado estacionario y obtener la impedancia del sistema. La medición es desarrollada en un amplio rango de frecuencias, las cuales muestran los diferentes tiempos de relajación característicos de los procesos y reacciones

que ocurren con los diferentes elementos y condiciones de operación del dispositivo analizado. Los espectros de impedancia permiten la interpretación de las características electroquímicas del sistema a través del uso de apropiados modelos de circuitos equivalentes (Heijne *et al.*, 2015). Con el objeto de obtener información más a detalle sobre el funcionamiento del ácido húmico sobre las CCMs, se analizó el efecto de 0.5 g/L de ácido húmico por espectroscopía de impedancia electroquímica.

## **Metodología**

### **Configuración y operación de la CCM**

Se utilizó una CCM de acrílico tipo H con un par de compartimientos cilíndricos de 375 mL cada uno unidos por un puente en el que se colocó una membrana de intercambio protónico (Nafion 117, Dupont). La biopelícula se hizo crecer en un electrodo de 6 cm X 3 cm de tela de carbón delgada suministrada por Electrochem y como cátodo se utilizó un electrodo del mismo material y dimensiones. El compartimiento anódico se inoculó con 150 mL de sedimento formado en un reactor de lodos activados. Como fuente de carbono se utilizó acetato de sodio a una concentración 10 mM y se adicionaron 0.4 ml de las siguientes soluciones MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> y buffer de fosfatos pH 7.2 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>Cl), usadas como suministro de nutrientes (Standard Methods, 2012). El compartimiento anódico se mantuvo en agitación constante usando un agitador magnético (IKA color squid White, USA) y el compartimiento catódico se llenó con agua que se mantuvo en aireación usando una bomba (Elite 800). La celda se mantuvo a una temperatura constante de 30° C usando un baño de temperatura (Wisd Laboratory instrument), y la solución anódica fue burbujeada con nitrógeno gas por 15 minutos antes de usarse. El voltaje (V) de las celdas fue medido cada 60 minutos aplicando una resistencia externa de 5 K $\Omega$  y utilizando un sistema de adquisición de datos conectado a una PC, la corriente (i) se calculó mediante la ley de Ohm,  $i=V/R$  y la potencia (P) mediante la ley de Joule  $P=V \times i$  (Choi y Chae 2013). Una vez que se observó el agotamiento del sustrato, se procedió a adicionar una nueva cantidad de acetato para tener nuevamente concentración 10 mM, este procedimiento se repitió hasta alcanzar un estado estacionario en la generación de corriente, señal de haber obtenido una biopelícula madura apta realizar el análisis.

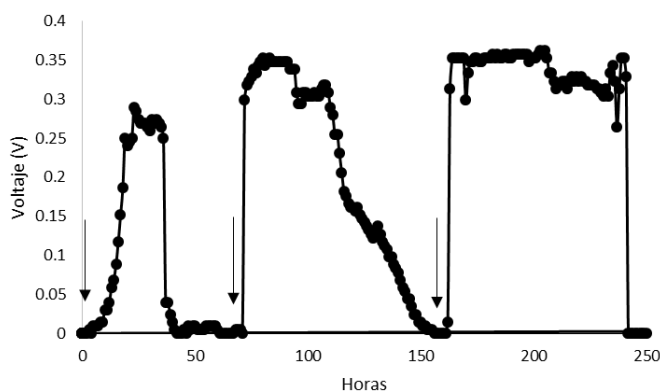
### **Análisis electroquímico**

Los análisis de impedancia se realizaron con un potenciostato Zener, en un rango de frecuencia de 100 mHz-8MHz y se impuso un voltaje de 10 mV. Los experimentos se realizaron a potencial de circuito abierto, en configuración de celda completa con un sistema de dos electrodos. Los ajustes del circuito equivalente se realizaron utilizando ZView2. Las curvas de polarización fueron realizadas con el potenciostato a partir del potencial a circuito abierto con una velocidad de 1 mV/s. El efecto del ácido húmico en la CCM se analizó añadiendo AH hasta para alcanzar una concentración de 0.5 g/L y las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno por 15 minutos antes de realizar las mediciones.

## Resultados y discusión

### Formación de la biopelícula y funcionamiento de la celda

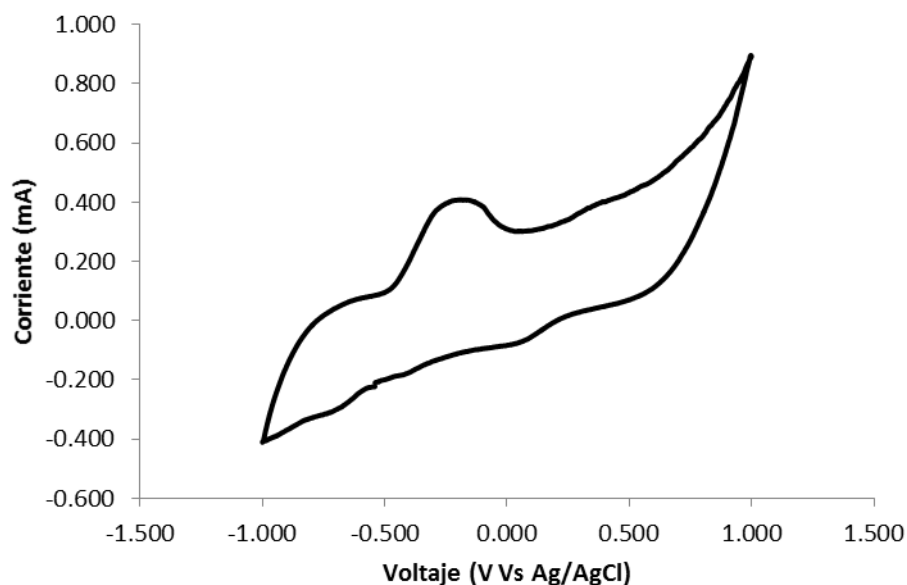
Aprovechando la experiencia generada en la síntesis de la biopelícula, cuyos resultados se mostraron en el capítulo 1, se logró desarrollar una biopelícula activa a las pocas horas de iniciar el experimento. Esto se manifestó mediante el aumento sucesivo en el voltaje generado en la celda, de manera que cerca de las 20 horas se pudo alcanzar un valor de 0.3 V en el primer ciclo batch; al agotarse el acetato, el voltaje cayó a valores cercanos a cero como consecuencia de las limitaciones por sustrato (Figura 5.1). Cuando se agregó nuevamente el acetato a la cámara anódica, se generó un voltaje de 0.35 V en la celda, comportamiento que se repitió en ciclos sucesivos. Considerando que en tres ciclos sucesivos de alimentación se observó que la celda microbiana generó un voltaje cercano a 0.35 V, se consideró que la biopelícula se había establecido sobre la superficie del electrodo.



**Figura 5.1.** Monitoreo de voltaje durante la formación de la biopelícula. Las flechas indican la adición de acetato 10 mM.

Con el fin de conocer las características de la biopelícula se realizaron pruebas de Voltametría cíclica, las cuales se muestran en la Figura 5.2. En esta gráfica se pueden observar algunas señales de oxidación y reducción, las cuales pueden estar relacionadas con la bioelectrooxidación del acetato, la producción de mediadores por parte de los microorganismos presentes en la biopelícula (Zhang *et al.*, 2011) y/o la respuesta de los sitios de transferencia de electrones que

se refieren a los citocromos presentes en la membrana celular de los microorganismos (Patil *et al.*, 2011 y Martin *et al.*, 2013).



**Figura 5.2** Voltametría cíclica de la biopelícula electroactiva formada sobre la superficie del electrodo.

La biopelícula formada presentó un potencial anódico de  $-0.588$  V Vs Ag/AgCl, que corresponde en términos generales a valores similares a los obtenidos en el capítulo 1, lo que es el resultado de la actividad exoelectrónica de los microorganismos (Martin *et al.*, 2013). El potencial catódico presentó un valor de  $-0.015$  mV Vs Ag/AgCl, lo que favoreció el funcionamiento de la celda, ya que un alto potencial en todo el circuito es obtenido cuando el potencial anódico es lo más negativo posible y el cátodo lo más positivo (Zhao *et al.*, 2012). El pH de la solución en el compartimento anódico y catódico fue de 9.13 y 9.09 respectivamente, debido al pH del inóculo y del agua utilizada en los experimentos, lo que sin embargo todavía permite el adecuado desarrollo de la biopelícula en el compartimento anódico. Respecto a la conductividad de las soluciones, se determinaron 3.28 y 0.71 mS/cm para la zona anódica y catódica respectivamente; el ánodo presenta una mayor conductividad debido a la adición de los

nutrientes y el acetato requeridos para que pueda dar la actividad biológica de la película formada.

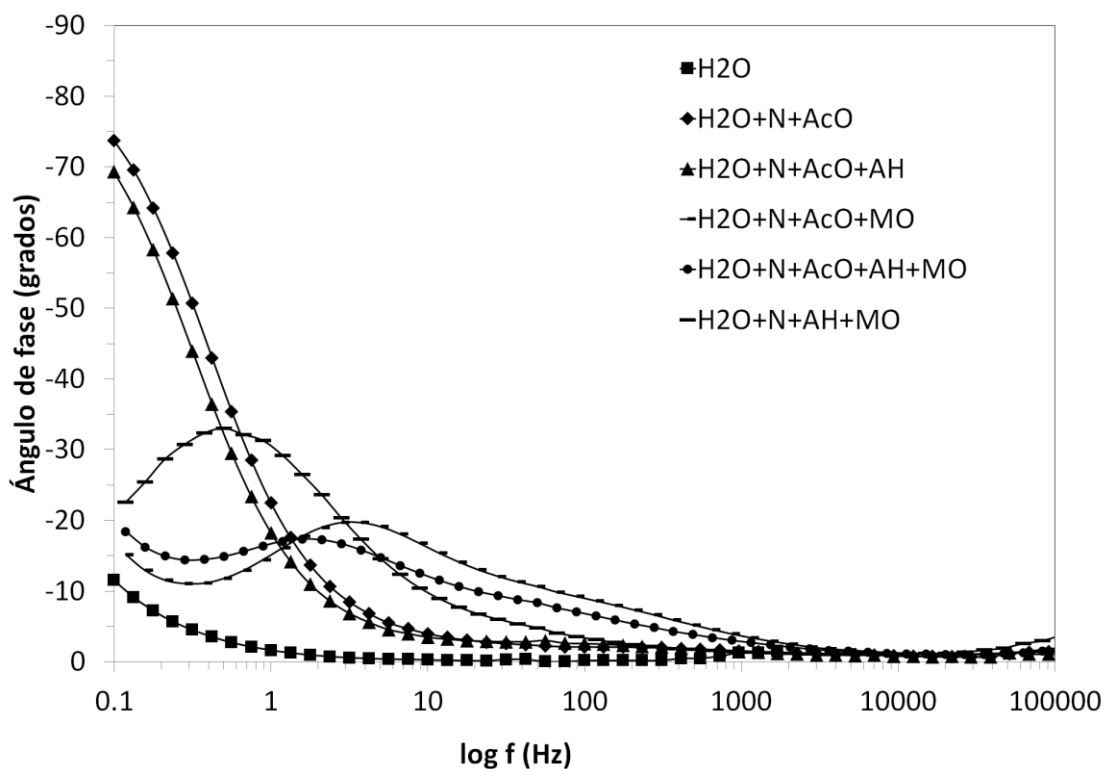
### **Espectroscopia de impedancia electroquímica**

Con la finalidad de conocer en los espectros de impedancia la contribución del ánodo y del cátodo, se realizaron los análisis en un rango de 100 mHz-8MHz y variando la composición del anolito. Primero se analizó un anolito con agua ( $H_2O$ ), luego se analizó la combinación agua + nutrientes + acetato ( $H_2O+N+AcO$ ), posteriormente agua + nutrientes + acetato + ácido húmico ( $H_2O+N+AcO+AH$ ), agua + nutrientes + acetato + microorganismos ( $H_2O+N+AcO+MO$ ), agua + nutrientes + acetato + ácido húmico + microorganismos ( $H_2O+N+AcO+AH+MO$ ), agua + nutrientes + ácido húmico + microorganismo ( $H_2O+N+AH+MO$ ), mientras que el catolito se mantuvo en todos los casos saturado de oxígeno mediante el burbujeo de aire durante 15 minutos antes de cada análisis. En la Figura 5.3 se muestra las conexiones de la celda con las que se realizó los análisis de impedancia en la celda completa.



Figura 5.3. Conexiones para el análisis de impedancia en celda completa.

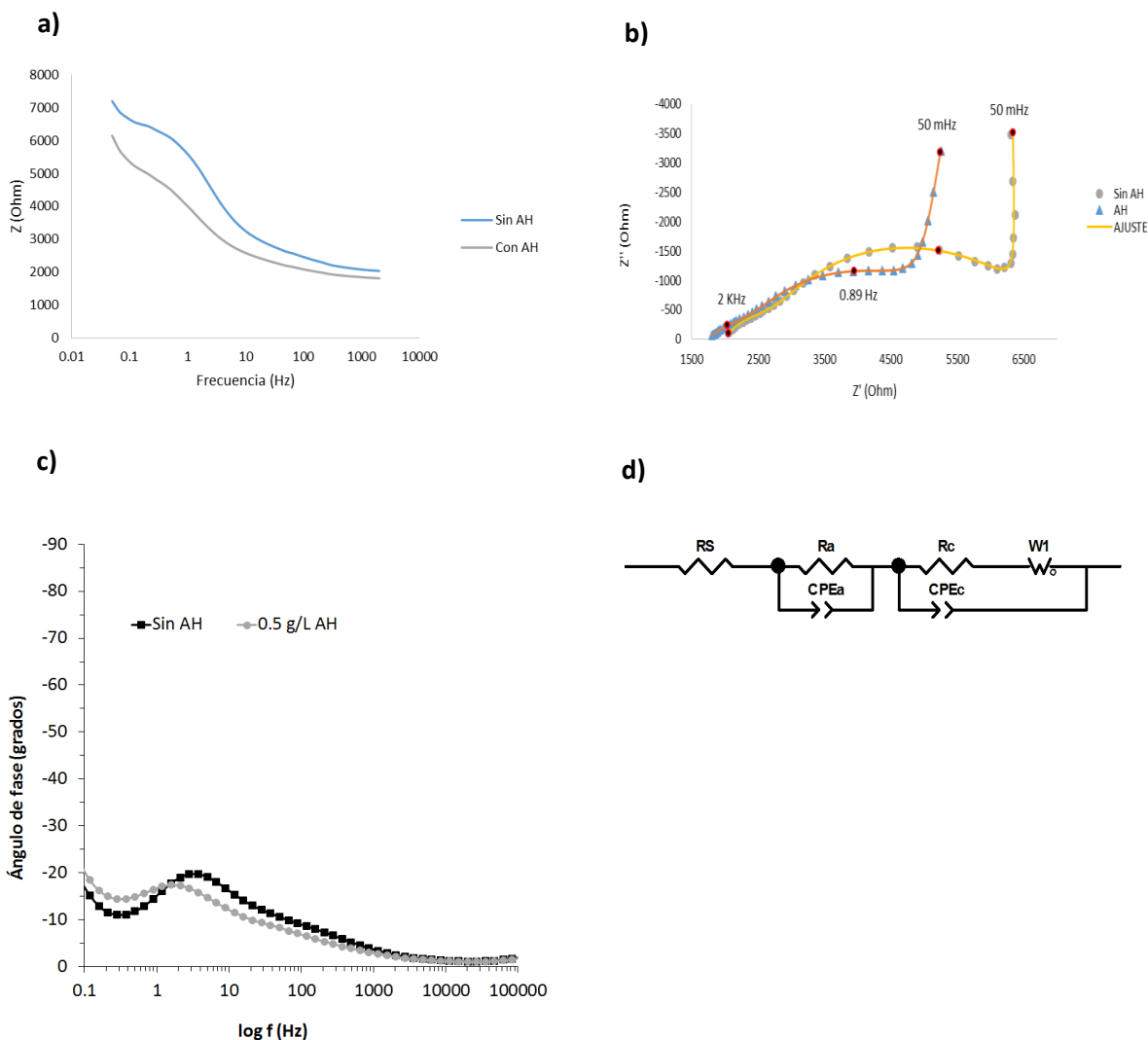
En la figura 5.4 se muestra el diagrama de ángulo de fase para conocer la contribución del ánodo y cátodo en la celda completa. La señal que corresponde al sistema  $H_2O$  muestra el inicio de un acoplamiento desde 1 Hz hacia frecuencias menores, la cual se atribuye al  $O_2$  presente en el catolito como única especie electroactiva. Las señales que corresponden al sistema  $(H_2O+N+AcO)$  y  $(H_2O+N+AcO+AH)$  presentan un comportamiento similar entre ellas, donde se observa el inicio de un acoplamiento desde 10 Hz a frecuencias menores, que puede ser atribuida al  $O_2$  presente en el catolito y a la electroactividad de los componentes  $N + AcO$ . El acoplamiento observado entre 0.5 y 100 Hz, corresponde al sistema  $H_2O+N+AcO+MO$  que es la interacción del agua, nutrientes y acetato con una biopelícula formada sobre la superficie del electrodo, observando que los microorganismos promueven que la mezcla de  $N + AcO$  sea electroactiva en el bioánodo.



**Figura 5.4** Diagrama de ángulo de fase de la CCM con diferente composición del anolito. Nutrientes (N), acetato (AcO), ácido húmico (AH), microorganismos (MO).



El acoplamiento de  $H_2O+N+AcO+AH+MO$  se observó entre 0.5 y 100 HZ, similar al sistema anterior. En el acoplamiento con  $H_2O+N+AcO+AH+MO$  se observó un desplazamiento significativo que puede estar asociado a la interfase del bioánodo|MO hacia frecuencias más bajas, sin embargo, no podemos asegurar si el efecto del AH impacta en los procesos de transferencia electrónica o de masa del bioánodo. Por otro lado, el sistema con  $H_2O+N+AH+MO$  muestra que en ausencia de acetato la actividad bioelectroquímica de los microorganismos es promovida por la mezcla  $N+HA$ , pero que esta es significativamente más lenta que en las mezclas  $N+AcO$  y  $N+AcO+HA$ . De acuerdo a los resultados anteriores, la activación del ánodo solo es posible en presencia de los microorganismos, lo que sugiere que son los responsables de transferir electrones hacia la superficie del ánodo, la presencia del acetato hace más rápida la activación del ánodo y es evidente que la presencia del AH genera un efecto en la interfase del bioánodo|MO, sin embargo, no es posible asegurar si el efecto del AH impacta en los procesos de transferencia electrónica o de masa del bioánodo. En la figura 5.5 se muestran los diagramas de Bode en la forma de ángulo de fase, de impedancia, así como el diagrama de Nyquist para los sistemas  $H_2O+N+AcO+MO$  y  $H_2O+N+AcO+AH+MO$ . Los diagramas de Bode (figura 5.5a) y Nyquist (figura 5.5b), muestran que la presencia de la solución de ácido húmico disminuye la impedancia de la celda, lo cual, puede ser debido principalmente a que se disminuye la resistencia a la polarización.



**Figura 5.5** Diagramas de impedancia de celda completa, (a) Diagrama de Bode de impedancia, (b) diagrama de Nyquist, (c) diagrama de Bode de ángulo de fase, (d) circuito equivalente. R es para resistencia, CPE para elemento de fase constante y W para un elemento de Warburg finito.

Para el análisis de los fenómenos ocurridos en cada electrodo, se propuso un circuito equivalente (Figura 5.5 d) y se realizaron ajustes utilizando como software ZView 2, los valores obtenidos con el ajuste del modelo se observan en la Tabla 5.1. El modelo incluyó una resistencia  $R_s$  que

comprende la resistencia de contactos, cables, electrolito y membrana, posteriormente para el ánodo se colocó un circuito paralelo R-CPE, que consiste en una resistencia y un elemento de fase constante ya que el capacitor para la doble capa se considera no ideal por la rugosidad y especies adsorbidas en la superficie del electrodo (Lepage *et al.*, 2012); se propuso el circuito paralelo R-CPE ya que se observa un semicírculo en el diagrama de Nyquist y un máximo en el diagrama de Bode. En el caso del cátodo se incluyó un circuito R-CPE en serie con un elemento de Warburg finito de circuito abierto, el cual es un modelo favorable para cátodos donde la difusión es parte del proceso (Lepage *et al.*, 2012). Los valores del ajuste obtenido al circuito equivalente propuesto se muestran en la Tabla 5.1 y presentan un porcentaje de error menor al 10%. En los valores de  $R_s$  para la celda que no tiene AH y para la que contiene AH se observó una disminución de  $1.98 \text{ K}\Omega$  a  $1.76 \text{ K}\Omega$  (lo que representa una diferencia de  $220 \Omega$ ), lo cual puede ser atribuido al AH en el electrolito. La resistencia a la transferencia de carga en el ánodo ( $R_a$ ) presentó una disminución de  $2.87 \text{ K}\Omega$  a  $1.41 \text{ K}\Omega$ , por lo que el AH promueve la transferencia electrónica en el bioánodo. El valor de  $CPE_a$  con AH presentó un incremento 3 veces más que el valor de  $CPE_a$  sin AH, lo cual es debido a un incremento en la transferencia de electrones hacia el bioánodo, como resultado a que el AH posiblemente incrementa la biodisponibilidad de los nutrientes y del acetato para los microorganismos. Los valores de resistencia en el cátodo ( $R_c$ ) sin AH ( $0.95 \text{ K}\Omega$ ) y con AH ( $0.91 \text{ K}\Omega$ ), no presentan diferencias significativa. Por lo anterior, es evidente que el principal funcionamiento de los ácidos húmicos en CCM es el de aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes y el acetato para los microorganismos.

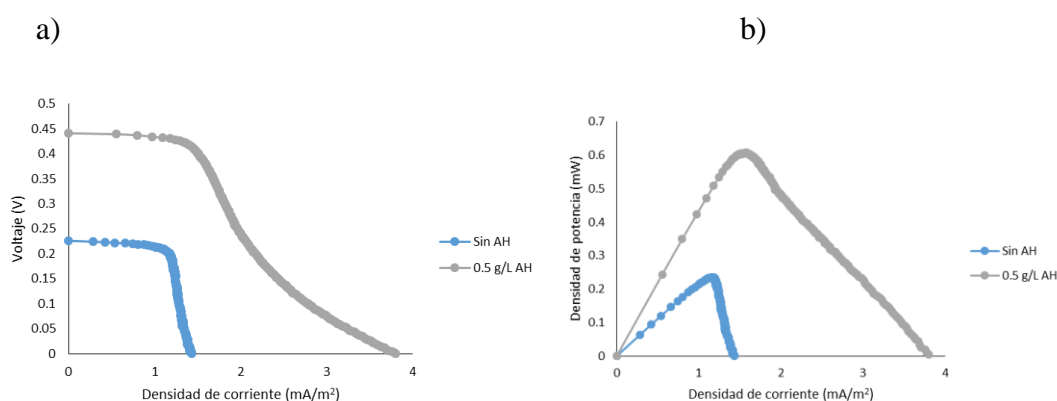
**Tabla 5.1.** Ajuste de parámetros para los espectros de impedancia de celda completa

Parámetro*	Sin AH		Con AH	
	valor	% error	Valor	%error
Rs (KΩ)	1.98	0.3	1.76	0.3
Ra (KΩcm <sup>2</sup> )	2.87	3.7	1.41	7.7
CPEa (F·cm <sup>-2</sup> )	3.56E-05	1.6	10.39E-05	1.9
CPEa-P	0.88	1.6	0.89	2.8
Rc (KΩcm <sup>2</sup> )	0.95	5.8	0.91	0.4
W1-R (Ω·s <sup>-1/2</sup> )	2.17	0.9	3.23	0.3
W1-T (s)	2.01	1.0	3.05	7.4
W1-P	0.51	0.5	0.47	0.7
CPEc (F·cm <sup>-2</sup> )	1.58E-05	0.6	4.58E-05	0.6
CPEc-P	0.67819	2.4	0.5786	3.5

\*Rs: Resistencia de contactos, cables, electrolito y membrana; Ra: Resistencia del ánodo; CPEa: Elemento de fase constante del ánodo; CPEa-P: magnitud de igualdad a un capacitor; Rc: Resistencia del cátodo; W1-R, W1-t, W1-P: Elemento de Warburg finito en un circuito abierto y representa el modelo de difusión en el cátodo, W1-R: Resistencia a la difusión, W1-t: relación entre la capa de difusión y el coeficiente de difusión efectivo, W1-p: libertad de cambio (fixed); CPEc: Elemento de fase constante del cátodo; CPEc-P: magnitud de igualdad a un capacitor.

El efecto del ácido húmico en la celda de combustible microbiana, también fue evaluado mediante curvas de polarización, las cuales se muestran en la Figura 5.6a, donde se observa que el potencial inicial de la celda sin ácido húmico fue de 0.226 mV y al agregar 0.5 g/L de ácido húmico, este potencial incrementó a 0.441 mV, además de que la corriente también se vio incrementada de 1.43 mA/m<sup>2</sup> a 3.80 mA/m<sup>2</sup> con el ácido húmico. La disminución de la pendiente en la curva de polarización cuando el ácido húmico se encuentra presente, sugiere una disminución de la resistencia interna de la celda, lo cual, concuerda con los resultados obtenidos en los análisis de impedancia los cuales indican que se disminuye la resistencia del electrolito y

la resistencia a la polarización. En la Figura 5.6b se muestra el efecto del ácido húmico sobre la potencia máxima obtenida, la cual incrementó de 0.235 mW/m<sup>2</sup> a 0.607 mW/m<sup>2</sup>. La forma de las curvas de la figuras 5.6a y 5.6b muestran principalmente pérdidas por activación y pérdidas óhmicas, ya que, las pérdidas por activación son evidentes a densidades de corriente bajas, las pérdidas óhmicas a densidades de corrientes intermedias y pérdidas por transferencia de masa a densidades de corriente altas (Logan 2008 y Lepage *et al.*, 2012).



**Figura 5.6** Curva de polarización (a) y de potencia (b) sin ácido húmico y con 0.5 g/L de ácido húmico.

## Conclusiones

Los diagramas de Nyquist y el circuito modelo, mostraron principalmente que la solución de ácido húmico disminuye la impedancia de la celda, la resistencia del electrolito y la resistencia a la polarización del ánodo. Los valores de los parámetros del circuito equivalente, principalmente los que describen los procesos en el ánodo, demuestran que el AH incrementa la transferencia de electrones hacia el ánodo 3 veces más ya que probablemente el AH concentra una cantidad de acetato y nutrientes para hacerlos más biodisponibles a los MO.

## V. CONCLUSIÓN GENERAL

- El ácido húmico en solución acuosa presentó una actividad electroactiva mediante el incremento de voltaje en las voltametrías cíclicas debido a la oxidación y reducción del electrolito.
- La actividad electroactiva del ácido húmico fue más evidente a pH básico.
- Es posible obtener una biopelícula electroactiva en 12 horas a partir de un consorcio microbiano, con una resistencia externa de 5 K $\Omega$ , temperatura de 30° y agitación constante.
- La biopelícula se forma principalmente en la superficie del electrodo.
- La forma de la superficie del electrodo influye en la formación la biopelícula, una biopelícula fragmentada puede ocasionar un menor contacto para la transferencia de electrones y disminuir el desempeño de la CCM
- El ácido húmico mejora el desempeño de la celda, en corriente y voltaje, disminuye su resistencia interna e incrementa la conductividad.
- A concentraciones de 1.0 y 1.5 g/L de ácido húmico, no se observa mejora en el desempeño de la celda, posiblemente debido a la formación de pseudomicelas a estas concentraciones.
- El AH incrementa la carga iónica en el bioánodo ya que probablemente el AH concentra una cantidad de acetato y nutrientes para hacerlos más biodisponibles a los MO.

## VI. REFERENCIAS

Aelterman P., Freguia S., Keller J., Verstraete W. and Rabaey K. 2008 The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, **78**, 409-418.

Albers, C. N., Banta, G. T., Jacobsen, O. S., Hansen, P. E. 2008. Characterization and structural modelling of humic substances in field soil displaying significant differences from previously proposed structures. *European Journal of Soil Science*, doi: 10.1111/j.1365-2389.

Alves V. A., da Silva L. A. and Boodts J. F. C. 1998 Surface characterization of IrO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>/CeO<sub>2</sub> oxide electrodes and faradaic impedance investigation of the oxygen evolution reaction from alkaline solution. *Electrochimica Acta*, **44**, 1525-1534.

Altschul S. F., Gish W., Miller, W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3): 403-10.

Baalousha, M., Motelica-Heino, M., Galaup, S., Coustumer, P. 2005. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved simple preparation and staining. *Microscopy Research and Technique*. 66, 299 – 306.

Bañuelos J. A., García-Rodríguez O., Rodríguez-Valadez F. J., Manríquez J., Bustos E., Rodríguez A and Godínez L. A. 2015 Cathodic polarization effect on the electro-fenton regeneration of activated carbon. *J Appl Electrochem*, DOI 10.1007/s10800-015-0815-2.

Bard A. J., Inzelt G., Scholz F. 2008 *Electrochemical dictionary*. Springer. E-ISBN 978-3-340-74598-3. Pag 222- 223.

Cercado B., Byrne N., Bertrand M., Pocaznoi D., Rimboud M., Achouak W. and Bergel A. 2013 Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresource Technology*, **134**, 276-284.

Choi S. and Chae J. 2013 Optimal biofilm formation and power generation in a micro-sized microbial fuel cell (MFC). *Sensors and Actuators A: Physical*, **195**, 206-212.

Cusick, R. D., Kiely, P.D., Logan, B. E. 2010. A monetary comparison of energy recovered from microbial fuel cells and microbial electrolysis cells fed winery or domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 8855-8861.

Du, Z., Li, H., Gu, T. 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 25, 464-482.

Dumas, C., Basseguy, R. and Bergel, A. 2008 Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta*. **53**, 5235-5241.

Feifcová, D. Snajdr, J. Siglova, M. Cejkova, A. Masak, J. Jirku, V. 2005. Influence of humic acids on the growth of the microorganisms utilizing toxic compounds (comparison between yeast and bacteria). *Chimia* 59(10):749–752.

He Y. R., Xiao X., Li W. W., Sheng G. P., Yan, F. F., Yu, H. Q., Yuan H. and Wu L. J. 2012 Enhanced electricity production from microbial fuel cells with plasma-modified carbon paper anode. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 9966-9971.

Heijne At., Schaetzle O., Gimenez S., Navarro L., Hamelers B., Fabregat-Santiago F. 2015. Analysis of bio-anode performance through electrochemical impedance spectroscopy, *Bioelectrochemistry*. DOI:10.1016/j.bioelechem.2015.04.002.

Helburn, R. S. y McCarthy, P. 1994. Determination of some redox properties of humic acid by alkaline ferricyanide titration. *Analytica Chimica Acta*. 263-272.

Huang L., Angelidaki I. 2008. Effect of Humic Acids on Electricity Generation Integrated with xylose degradation in Microbial Fuel Cells. *Biotechnology & Bioengineering*. 100(3), 413-422. DOI 10.1002/bit.21786.

Huang D. Y., Zhuang L., Cao W. D., Xu W., Zhou S. G., Li F. B. 2010. Comparison of dissolved organic matter from sewage sludge and sludge compost as electron shuttles for enhancing Fe (III) bioreduction. *Journal of Soils Sediments* 10:722-729.

Huson, D. H., Mitra, S., Weber, N., Ruscheweyh, H. J. and Schuster S. C. 2011. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research*, 21:1552-1560.



Kim I. S., Chae K. J., Choi M. J. Verstraete W. 2008. Microbial Fuel Cells: Recent Advances, Bacterial Communities and Application Beyond Electricity Generation. *Environmental Engineering Research*. 13 (2): 51-65.

Kinoshita K. 1988 Carbon, electrochemical and physicochemical properties. John Wiley & Sons. ISBN 0-471-84802-6. Pag.68-75.

Konstantinidis K. T., Tiedje, J. M. 2005. Towards a Genome-Based Taxonomy for Prokaryotes. *Journal of Bacteriol.* 187 (18): 6258-6264.

Lepage G., Ovenhausen Albernaz F., Perrier G., Merlin G. 2012 Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. *Bioresource Technology*, 124, 199-207.

Liu L., Tsyganova O., Lee D. J., Su A., Chang J.S., Wang A. and Ren N. 2012 Anodic biofilm in single-chamber microbial fuel cells cultivated under different temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**, 15792-15800.

Logan B. E. 2005 Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Science and Technology*, **52**(1-2), 31-37.

Logan B. E. 2007 Microbial fuel cells. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-23948-3. Pag.4.

Logan B. E., Hamelers B., Rozendal R., Schröder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W. and Rabaey K. 2006 Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science and Technology*, **40** (17), 5181-5192.

Logan, B. E., Regan, J. M. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*. 14, 513-518.

Lovley, D. R., Fraga, J. L., Blunt-Harris, E. L., Hayes, L. A., Phillips, E. J. P., Coates, J. D. 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimica at Hydrobiologica*. Weinheim. ISSN: 0323-4320. 26, 152-157.

Martin E., Savadogo O., Guiot S.R. and Tartakovsky B. 2013 Electrochemical characterization of anodic biofilm development in a microbial fuel cell. *J Appl Electrochem*, **43**, 533-540.

Matthiessen, A. 1995. Determining the redox capacity of humic substances as a function of pH. *Vom Wasser*. 84, 229-235.

Nevin, K. P., Richter, H. and Covalla, S. F. 2008 Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*, **10** (10), 2505-2514.

Nurmi, J. T. and Tratnyek, P. G. Voltametric investigation of natural organic matter. From the proceedings of the 20<sup>th</sup> anniversary conference of the International Humic Substances Society (IHHS), 21-26 July 2002, Northeastern University, Boston, MA. Pages 58-60.

Oh, S. E., Logan, B. E. 2006. Proton Exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Applied Microbiol Biotechnol*. 70, 162-169.

Palmer, N. E. y Wandruszka, R. 2010. Humic acids as reducing agents: the involvement of quinoid moieties in arsenate reduction. *Environmental Science & Pollution Research*. 17, 1362-1370.

Pant, D., Bogaert, G. V., Diels L., Vanbroekhoven, K. 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFC) for sustainable energy production. *Bioresource Technology* 101 1533-1543.

Patil, S. A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martinez, A. A., Müller, S., Schröder, U. 2001. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology*, 102, 9683–9690.

Peixoto L., Min B., Martins G., Brito A. G., Kroff P., Parpot P., Angelidaki I. and Nogueira R. 2011 In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon. *Bioelectrochemistry*, **81**, 99-103.

Rabaey, K., Verstraete, W. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*. 23, 6, 291-298.

Ratasuk, N. 2004. Redox functional groups of humic substances. Tesis de doctorado. Universidad de Oklahoma. 1-10.

Richter H., Nevin K. P., Jia H., Lowy D. A., Lovley D. R and Tender L. M. 2009 Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes

indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy and Environmental Science*, **2**, 506-516.

*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 2012 22th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Stevenson, F. J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2<sup>nd</sup> ed. ISBN 0471594741. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. P. 213-300.

Sund, C. J., McMasters, S., Crittenden, S. R., Harrell, L. E., Summer, J. J. 2007. Effect of electron mediators on current generation and fermentation in a microbial fuel cell. *Appl Microbiol Biotechnol*. **76**, 561-568.

Sutton, R., Sposito, G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology*. **39**, 9009-9015.

Struyk, Z., Sposito, G. 2001. Redox properties of standard humic acids, *Geoderma*, **102**, p. 329-346.

Thygesen, A., Poulsen, F. W., Min, B., Angelidaki, I., Thomsen, A. B. 2009. The effect of different substrates and humic acid on power generation in microbial fuel cell operation. *Bioresource technology*. **100**, 1186-1191.

Torres C. I., Krajmalnik-Brown R., Parameswaran P., Marcus A. K., Wanger G., Gorby Y. A., Rittmann B. E. 2009 Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization. *Environmental Science and technology*, **43**, 9519-9524.

Trasatti S. and Petrii O. A. 1991 Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure and Appl. Chem*, **63**(5), 711-734.

Varshney U., Lee Chan-Ping and RajBhandary U. L. 1991. Direct analysis of aminoacylation levels of tRNAs in vivo application to studying recognition of *Escherichia coli* initiator tRNA mutants by glutaminyl-tRNA synthetase. *The journal of biological chemistry*. **266** (36): 24712-24718.

Wang X., Hu J., Zhang J. and Cao C. 2008 Characterization of surface fouling of Ti/IrO<sub>2</sub> electrodes in 4-chlorophenol aqueous solutions by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, **53**, 3386-3394.

Wei J., Liang P., Huang X. 2011 Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, **102**, 9335-9344.

Wright M. R. 2007 An introduction to aqueous electrolyte solutions. John Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-84293-5. P. 2-4.

Yang S., Du F. and Liu H. 2012 Characterization of mixed-culture biofilms established in microbial fuel cells. *Biomass and Bioenergy*, **46**, 531-537.

Yokoyama K., Song J., Geltinger C. and Kanazawa Y. 1999. Direct lysis method for the rapid preparation of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, **271**: 89-91.

Zerbino D. R., Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, **18** (5):821-9.

Zhang L., Zhu X., Li J., Liao Q. and Ye D. 2011 Biofilm formation and electricity generation of a microbial fuel cell started up under different external resistances. *Journal of Power Sources*, **196**, 6029-6035.

Zhao Y., Li P., Wang X. and Sun Y. 2012 Influence of initial biofilm growth on electrochemical behavior in dual-chamber mediator microbial fuel cell. *Journal of fuel chemistry and technology*, **40**(8), 967-972.

