

# EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO E IDENTIFICACIÓN DE EXOELECTRÓGENOS EN DOS TIPOS DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS CON DIFERENTE CONFIGURACIÓN EN EL ÁNODO

LILIANA ALZATE-GAVIRIA, KARLA GONZÁLEZ, ISAÍAS PERAZA, ORLANDO GARCÍA, JORGE DOMÍNGUEZ-MALDONADO, JESÚS VÁZQUEZ, MIGUEL TZEC-SIMÁ y BLONDY CANTO-CANCHE

## RESUMEN

Se compararon dos celdas de combustible microbianas (CCM) tipo PEM (proton exchange membrane) con diferente configuración en el ánodo, de las cuales se aislaron las respectivas muestras microbianas para identificar el tipo de bacterias presentes mediante la amplificación del gen 16S. La secuenciación de un par de clones evidenció la presencia de alfa y beta proteobacterias entre los exoelectrógénos. Este tipo de bacterias han sido previamente identificados en lodos activados. Los sistemas fueron operados en batch y en intervalos de temperatura mesofílica. En la CCM1 se utilizó grafito de superficie plana y la

CCM2 se utilizó grafito granular. El sustrato empleado fue agua residual sintética (ARS), conteniendo hexosa como fuente de carbono, además de emplear un inóculo mixto como biocatalizador; en la cámara del cátodo se empleó un electrodo acuoso saturado de O<sub>2</sub>. La densidad de poder en la CCM1 fue 6W/m<sup>3</sup> con remoción de DQO (demanda química de O<sub>2</sub>) del 70%, mientras que en la CCM2 se observó un promedio de densidad de poder de ~48W/m<sup>3</sup> con 95% de remoción de DQO. Ambos sistemas fueron evaluados durante 120 días, la carga orgánica fue 4,7kg DQO/m<sup>3</sup> por día, y el TRH (tiempo de retención hidráulico) fue 24h.

Los combustibles fósiles han sido la principal fuente de energía en nuestro planeta desde hace varias décadas; sin embargo, en la actualidad existen evidencias que indican que las fuentes que nos suministran estos combustibles fósiles son limitadas y se agotan. Además, contribuyen con gases de efecto invernadero, y generación de SO<sub>x</sub> y NO<sub>x</sub>. Una opción de energías alternas son las celdas de combustible microbia-

nas (CCM), las cuales han atraído la atención durante los últimos 10 años, surgiendo como una nueva opción biotecnológica para la generación de energía a partir de biomasa residual (He *et al.*, 2005; Rabaey y Verstraete, 2005; Rittmann, 2006). Las CCM constituyen una alternativa viable para la conversión de energía química a energía eléctrica, mediante el uso de microorganismos que actúan como biocatalizadores sobre materia orgánica biodegradable (Angenent

*et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Aelterman *et al.*, 2006; Logan y Regan, 2006). Diversos estudios han demostrado que los cultivos mixtos generan densidades de poder más grandes que aquellas de cultivos puros (Rabaey *et al.*, 2004). Adicionalmente, las CCM muestran ventajas tales como convertir directamente la energía del sustrato en electricidad con alta eficiencia de conversión, operar a bajas temperaturas de hasta 5°C, produciendo 10 veces menos lodos (You *et*

## PALABRAS CLAVE / Ánodos / Celdas de Combustible Microbianas / Exoelectrógénos /

Recibido: 21/05/2009. Modificado: 30/11/2009. Aceptado: 03/12/2009.

**Liliana Alzate-Gaviria.** Doctora en Ciencia y Tecnología Ambiental, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua, México. Investigadora, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), México. Dirección: CICY. Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo. C.P. 97200. Mérida, Yucatán, México. e-mail: lag@cicy.mx

**Karla González.** Ingeniera Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida (ITM). México. Ingeniera de Proyectos, CICY. México.

**Isaías Peraza.** Ingeniero Bioquímico, ITM, México. Candidato a Maestro, CICY. México.

**Orlando García.** Ingeniero Bioquímico, ITM, México. Candidato a Maestro, CICY. México.

**Jorge Domínguez-Maldonado.** Maestro en Ciencias Marinas, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN. México. Técnico, CICY, México.

**Jesús Vázquez.** Ingeniero Bioquímico, ITM, México. Auxiliar de investigación, CICY. México

**Miguel Tzec-Simá.** Maestro en Ciencias en Biotecnología de Plantas, CICY, México. Técnico, CICY, México.

**Blondy Canto-Canché.** Doctora en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY. México. Investigadora, CICY. México.

al., 2006), mientras los tratamientos convencionales aerobios de aguas residuales se enfrentan con los altos gastos de capital, operacionales y de energía.

La corriente máxima en una CCM está en función de i) el diseño del sistema, que determina las pérdidas electroquímicas (resistencia interna) y limita el transporte convectivo (Kim *et al.*, 2004); y ii) la cantidad de sustrato transformado en electricidad (eficiencia coulombica), que se relaciona con superficie y volumen. Los exoelectrógenos (bacterias generadoras de electrones) fueron estudiados desde Potter (1911) siendo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Escherichia coli* que se demostró la producción de voltaje y generación de electricidad. Desde entonces fueron descubiertos mensajeros químicos externos como rojo neutral, antraquinona 2-6, disulfonato, tionina y ferricianida de potasio, entre otros (Park y Zeikus, 2003; Rabaey y Verstraete, 2005; Logan y Reagan, 2006). Rabaey *et al.* (2004) demostraron que no es necesario adicionar mediadores externos para el transporte de electrones, debido a que las bacterias producen mediadores químicos como la piocianina, la cual es conocida por sus propiedades antibióticas excretadas como compuestos inhibidores de la cadena respiratoria (Hernández *et al.*, 2004; Voggu *et al.*, 2006). Otro mecanismo de transferencia de electrones son los *nanowires* conductivos que se forman desde la célula hasta el electrodo (Gorby *et al.*, 2006). También se ha demostrado que otros compuestos transportadores de electrones son los metabolitos secundarios producidos en la fermentación anaerobia, como formato y acetato (Stams *et al.*, 2006). Pocos exoelectrógenos han sido aislados de las CCM y, por tanto, gran parte de los conocimientos sobre sus propiedades se basan en estudios de cepas bacterianas que han demostrado producir electricidad utilizando el Fe como un aceptor de electrones. Sin embargo, algunos autores han publicado que las altas resistencias internas de las CCM utilizando cultivos puros no permiten densidades de potencia altas; no está claro si es necesario aislar cepas capaces de generar altos niveles de energía, o si se deben cultivar consorcios para poder alcanzar altas densidades (Logan, 2008). Este trabajo tuvo como objetivo comparar dos CCM tipo PEM (*proton exchange membrane*) con diferente configuración en el ánodo, así como realizar la identificación del inóculo mixto nativo empleado en ellas.

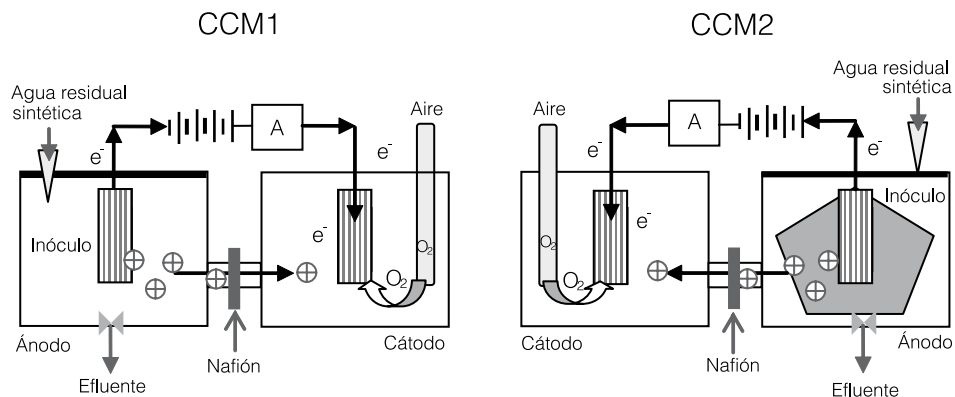


Figura 1. Ensamble experimental en laboratorio de la CCM1 y de la CCM2.

## Materiales y Métodos

### Prototipos

Se diseñaron y construyeron dos celdas de combustible microbianas (CCM) de vidrio tipo H. Cada cámara tuvo un volumen útil de 300ml, comunicadas entre sí a través de una membrana Nafion117® (Dupont) con área de 1cm<sup>2</sup>. Las conexiones externas a los electrodos, fueron alambres de cobre para realizar mediciones a circuito abierto; para la cuantificación de corriente se utilizó una resistencia externa de 1kΩ. En la Figura 1 se presenta un esquema de los dos prototipos (CCM1 y CCM2) propuestos en este estudio.

**Ánodo.** Para la CCM1 se colocó un electrodo de carbono plano tipo EC-CC1-060 marca ElectroChem®, con área superficial de 16cm<sup>2</sup> y un dispositivo de control analógico de temperatura para garantizar un intervalo mesofílico de 38 ±2°C. Para la CCM2, se diseñó una configuración diferente, utilizando carbón granular tipo CAC-02-AS marca Tecsiqum® contenido en una malla de acero inoxidable tipo AISI 400×400, proporcionando mayor área de contacto a los biocatalizadores; éste ánodo tuvo una área superficial de 950cm<sup>2</sup> y operó a 25 ±2°C. Ambos sistemas trabajaron con alimentación tipo batch, utilizando agua residual sintética (ARS) elaborada de acuerdo a Alzate-Gaviria *et al.* (2008).

**Cátodo.** La contraparte de los ánodos fueron construidos en carbono de superficie plana de 16cm<sup>2</sup>. A cada uno se le aplicó una tinta de carbono conteniendo platino como catalizador (0,5mg·cm<sup>-2</sup> contiene 10% Pt). Se utilizó una bomba de aire Air-pump AC-9602, para proporcionar el O<sub>2</sub> necesario al católito en el proceso de catálisis, debido a que se trató de un cátodo acuoso. Se utilizaron 300ml de agua destilada en los católitos de las CCM1 y CCM2.

**Inóculo.** Las cámaras anódicas contuvieron un consorcio microbiano mixto nativo no anaerobio, conformado por suelo profundo 30g·l<sup>-1</sup>, excreta vacuna 300g·l<sup>-1</sup>, excreta porcina 150g·l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> comercial 1,5g·l<sup>-1</sup>, azúcar 5g·l<sup>-1</sup>, y agua de llave 1000ml. Para la experimentación se empleó ARS, cuya fuente de carbono fue glucosa. La aclimatación fue de acuerdo al procedimiento descrito en Alzate *et al.* (2008).

**Membrana.** Los diseños tipo PEM requieren la separación del compartimiento de las cámaras del ánodo y del cátodo por una membrana intercambiadora de protones. La comúnmente usada es el Nafion117®, la cual se utiliza en este estudio, siendo una alternativa la ULtrex CMI-700, considerada como de mejor costo-beneficio (Logan y Reagan 2006). La membrana polimérica requiere para su uso ser sometida a un proceso de activación de los canales sulfónicos, empleando acetona y peróxido de hidrógeno al 3% para eliminar residuos orgánicos, y una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para activar el nafion a su forma ácida antes de ser empleada. (Logan 2008)

**Generación de potencia.** La generación de potencia se expresó en W·m<sup>-3</sup>; sin embargo, su cálculo se realizó de dos formas.- La primera opción es de acuerdo al volumen del ánodo, empleando la ecuación

$$P_V = \frac{E_{CCM}^2}{V \times R_{Ext}}$$

donde E<sub>CCM</sub>: voltaje medido, v: volumen del ánodo, y R<sub>ext</sub>: resistencia externa. La segunda opción, con igual resultado, es teniendo en cuenta el área del ánodo y la ecuación es

$$P_{An} = \frac{E_{CCM}^2}{A_{An} \times R_{Ext}}$$

donde E<sub>CCM</sub>: voltaje medido, A<sub>An</sub>: área del ánodo, y R<sub>ext</sub>: resistencia externa. Posteriormente, para que el resultado final quede expresado en W·m<sup>3</sup> se multiplica por un factor de m<sup>2</sup>·m<sup>-3</sup>, obtenido del área entre el volumen del ánodo.

**Arranque de la CCM.** El procedimiento de la colonización del electrodo tanto de la CCM1 como de la CCM2 se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Alzate *et al.* (2008). El tiempo de retención hidráulico (TRH) fue de 24h.

#### Métodos analíticos

Las determinaciones analíticas se realizaron de acuerdo con (APHA, 1998). Los ácidos grasos volátiles (AGV) fueron analizados por medio de la valoración de la alcalinidad parcial, intermedia y total dado en  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ , cuyo proceso de medición proporciona la cantidad de AGV en  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $H_{AC}$  (expresado en ácido acético) después de acidificar y alcalinizar las muestras con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N y  $\text{NaOH}$  0,1N controlando la variación de pH con un potenciómetro Thermo Orion, model 350 perpHec T log R meter. La diferencia de carga orgánica entre el afluente y el efluente fue medida a través de la remoción de la demanda química de  $\text{O}_2$  (DQO) con un reactor digital HACH-DRB200 y un colorímetro Thermo Electron Corporation ORION AQUAfast II™. El multímetro empleado fue un FLUKE-789 con interfase a PC para mediciones de voltaje y amperaje bien sea en serie o en paralelo.

#### Identificación de exoelectrógenos

**Material biológico.** Se centrifugaron alícuotas de 40ml de la muestra bacteriana procedente de la celda de combustible. Se descartaron los sobrenadantes y las pastillas se resuspendieron con 5ml de agua residual sintética. La muestra se dividió en alícuotas de 1ml y se almacenaron en tubos Eppendorf en congelación hasta la extracción del ADN.

**Extracción de ADN.** Las paredes bacterianas fueron destruidas mediante choque térmico, congelando y descongelando repetidas veces; el ADN se extrajo con un amortiguador compuesto de Tris-HCl pH 7,0; EDTA; NaCl y detergentes iónicos. Posteriormente se adicionó cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se recuperó la fase acuosa, transfiriéndose a un tubo Eppendorf nuevo. El ADN fue precipitado 30min con 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico; la pastilla se lavó con 70% de etanol y se secó 5min a temperatura ambiente. Para eliminar el RNA, a una alícuota de 5 $\mu\text{l}$  de la muestra de ADN se le adicionó 5 $\mu\text{g}$  de RNasa libre de DNasa y se dejó incubar a 37°C durante 1h. Esta muestra se utilizó para las reacciones de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La presencia e integridad del ADN (ADN

genómico) se evaluó analizando 2 $\mu\text{l}$  de la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa 1%; el gel contenía 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de bromuro de etidio. Al final de la corrida se visualizó sobre un transiluminador ultravioleta.

**Reacciones de PCR.** Las reacciones de PCR se realizaron en 25 $\mu\text{l}$  de volumen final, con 20mM Tris-HCl pH 8,4; 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2mM dNTP's; desoxiribonucleótidos; 1 $\mu\text{M}$  de cada cebador; 1,4U de Taq polimerasa; 2 $\mu\text{l}$  de templado; y agua hasta ajustar volumen. Se emplearon parejas de cebadores universales que flanquean las regiones hipervariables V1 a V5 del gen 16S bacteriano (Van de Peer *et al.*, 1996), obteniéndose en la PCR fragmentos de ~880pb.

**Clonación en TOPO-TA.** Brevemente, 4 $\mu\text{l}$  de la reacción de PCR se mezcló con 1 $\mu\text{l}$  de solución salina y 1 $\mu\text{l}$  del vector TOPO-TA, y se siguió el protocolo de acuerdo al manual del fabricante (Invitrogen). Los clones positivos se "picaron" y transfirieron a otra caja de Petri, con LBA-kanamicina.

**Análisis de los clones.** Cada colonia blanca se inoculó en 3ml de medio LB líquido-kanamicina. Se incubó a 37°C y agitación de 210rpm para su crecimiento. La biomasa bacteriana de 2,5ml se recuperó centrifugando a 12000rpm durante 1min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 100 $\mu\text{l}$  de amortiguador para iniciar la extracción del ADN plasmídico. Los plásmidos recombinantes se obtuvieron mediante lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

**Selección de clones para secuenciar.** Para la identificación de clones positivos, los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción *Eco RI*. Para su secuenciación se seleccionaron dos clones cuyo patrón de restricción fue el más frecuente (21 clones de 55 analizados por restricción presentaron ese patrón) y fueron enviados a la Universidad de California, Davis, EEUU.

### Resultados y Discusión

#### Efecto del donador de electrones y generación de voltaje

La producción de voltaje, tanto en la CCM1 como en la CCM2, siguió una cinética de saturación; es decir, la utilización del sustrato en sistemas bio-

lógicos como función de la concentración y la velocidad de transporte (Liu y Logan, 2004). Se pudo observar que el voltaje incrementó y tendió a permanecer constante a medida que la concentración de glucosa aumentó, manteniéndose constante a partir de una concentración de 3500ppm en 1,0

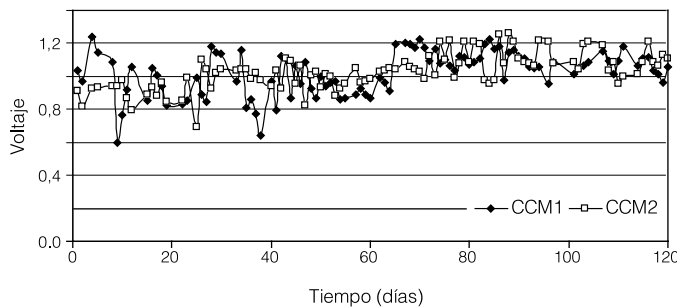


Figura 2. Desempeño del Voltaje en el tiempo para CCM1 y CCM2.

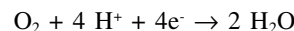
$\pm 0,2\text{V}$ . Así, la tasa máxima de utilización del sustrato ocurrió en altas concentraciones del mismo (Metcalf & Eddy, 1995). En la Figura 2, se puede observar como el voltaje fue ligeramente superior a 1,2V, esto debido a que termodinámicamente es la máxima fuerza electromotriz que puede desarrollar este tipo de sistemas. Es por ello que para aumentarlo se propone una conexión en serie.

El potencial total de cada celda de combustible microbiana es

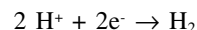
$$E_{fem} = E_{cátodo} - E_{ánodo} = 0,805\text{V} - (-0,414\text{V}) = 1,219\text{V},$$

que se obtiene de

Potencial para el cátodo:



Potencial para el ánodo:



#### Generación de potencia

La densidad de potencia generada por las CCM se midió en  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$ , y para los cálculos se emplearon las ecuaciones de potencia descritas en la metodología las cuales utilizan factores de cálculo. La producción de la densidad de poder volumétrico se muestra en las Figuras 3 y 4 para las dos celdas.

Se empleó una resistencia de 1000 $\Omega$  obteniendo valores promedio de 6 y 48 $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$  para la CCM1 y la CCM2, respectivamente, y la remoción de materia orgánica expresada en DQO fue 70 y 95%, respectivamente. Esto se debe a que el electrodo de carbón granular presentó una mayor área superficial de contacto, permitiendo a los microorganismos mayor posibilidad de poblarlo y por tanto aumentar la producción de electrones. Al aumentar la generación de energía aumen-

TABLA I  
COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE DIFERENTES ESTUDIOS REALIZADOS  
CON CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS TIPO BATCH

Substrato	Cultivo mixto	Tipo de electrodo	Mediadores Redox	I (mA)	P (W/m <sup>3</sup> )	Referencia
Glucosa	Consorcio mixto	Grafito plano	Ferricianuro en la solución del cátodo	30	216	Rabaey <i>et al.</i> (2003)
Acetato	Lodo	Grafito plano	Ferricianuro en la solución del cátodo, Mn(4+) ánodo de grafito, Fe(3+) en el cátodo de grafito	2,6	32	Park y Zeikus (2003)
Glucosa	Bacterias de agua residual	Tela de grafito	No	0,9	13	Liu <i>et al.</i> (2005)
Agua residual	Bacterias de agua residual	Grafito de superficie plana	No	4,85	1,6	Liu y Logan (2004)
Agua residual	Lodo activado	Grafito de superficie plana	No	0,2	1,7	Kim <i>et al.</i> (2004)
Agua residual sintética	Lodo anaeróbico y aeróbico	Grafito granular	Hexacianoferrato en cátodo	255	258	Aelterman <i>et al.</i> , (2006)
Agua residual sintética	No-anaeróbico	Carbón de superficie plana	No	0,2	6	Este estudio
Agua residual sintética	No-anaeróbico	Grafito granular	No	1,0	48	Este estudio

ta también la disponibilidad del sustrato, reflejándose en valores de remoción de materia orgánica más elevados (Jang *et al.*, 2004). Los valores obtenidos se encuentran en un intervalo medio-alto con respecto a otros trabajos reportados en la literatura (Tabla I). Los dos sistemas emplearon catolitos acuosos para proveer O<sub>2</sub> disuelto al electrodo, sin emplear mediadores externos, corroborándose que los consorcios microbianos generan mayor densidad de potencia que los cultivos puros (Rabaey y Verstraete, 2005; Pham *et al.*, 2006; Rittmann, 2006).

La densidad de potencia más alta que reporta la literatura es de 3600mW·m<sup>-2</sup>, utilizando glucosa como sustrato y hexacianoferrato de potasio para optimizar el rendimiento del cátodo (Rabaey *et al.*, 2005). De igual forma, el ferrocianuro es muy popular como aceptor de electrones en experimentos en CCM y puede producir voltajes mayores utilizando solo el O<sub>2</sub>. La gran ventaja del ferrocianuro es el bajo sobrepotencial utilizando cátodos de carbón plano; sin embargo, la generación de potencia con ferrocianuro no es sustentable debido a la insuficiente reoxidación por O<sub>2</sub>, lo cual requiere que el catolito sea reemplazado regularmente, contribuyendo a la generación de pasivos tóxicos recalcitrantes al medio ambiente. Además, a largo plazo el sistema puede ser afectado por la difusión de ferrocianuro a la cámara del ánodo (Logan y Regan, 2006). En la Tabla I se puede observar que Aelterman *et al.* (2006), obtuvieron 258W·m<sup>-3</sup>, uno de los valores más altos en la literatura; esto debido a que en su cátodo emplea hexacianoferrato, mayor área de contacto en su electrodo y una fuente de carbono de fácil

degradación como es la glucosa, además de emplear un cultivo mixto facultativo rico en un pool enzimático de oxidación. Rabaey *et al.* (2003) reportaron también una potencia importante de 216W·m<sup>-3</sup> y corriente de 30mA, de nuevo empleando un mediador externo y un electrodo de grafito plano. Sin embargo, existe una diferencia de corriente entre estos dos trabajos, que se explica por la forma como se ensamblaron los sistemas. En Aelterman *et al.* (2006) fueron acoplados en paralelo para potenciar la corriente, y en Rabaey *et al.* (2003) lo fueron en serie, para aumentar el voltaje. Los valores más bajos son los de Liu y Logan (2004) y Kim *et al.* (2004), debido a que no emplean mediadores externos y a que su donador de electrones son aguas residuales convencionales de composición diferente a la glucosa, como son: lípidos, proteínas y carbohidratos de degradación más especializada.

#### Influencia del pH

Otro parámetro importante en el desempeño de las celdas de combustible microbia-

nas es el pH de los ánodos. Durante el presente estudio se mantuvo en los anolitos un pH de 6,0 ±0,5. Las Figuras 3 y 4 muestran la relación entre la producción de potencia volumétrica de ambos dispositivos y el pH. Como puede apreciarse, las más altas densidades de potencia ocurrieron en valores de pH entre 6,3 y 6,9 obteniéndose resultados que oscilaron desde 4,2 a 11,5W·m<sup>-3</sup> para la CCM1 y entre 25 y 53W·m<sup>-3</sup> para la CCM2. La densidad de potencia mantuvo una tendencia a la estabilidad en relación al pH. Cabe resaltar que la mayoría de las bacterias (bacterias entéricas) empleadas en estos sistemas no toleran niveles de pH arriba de 7,5 o debajo

de 4,0. Además, valores de pH por debajo de 6,8 inhiben la actividad metanogénica (Metcalf & Eddy 1995; Angenent *et al.*, 2004).

#### Temperatura en el rendimiento de la CCM

Las CCM operaron en mesofilia (32 ±5°C) durante todo el experimento. Las cinéticas microbianas son más rápidas a mayor temperatura; sin embargo, el porcentaje de remoción de sólidos volátiles no. Es por ello que una

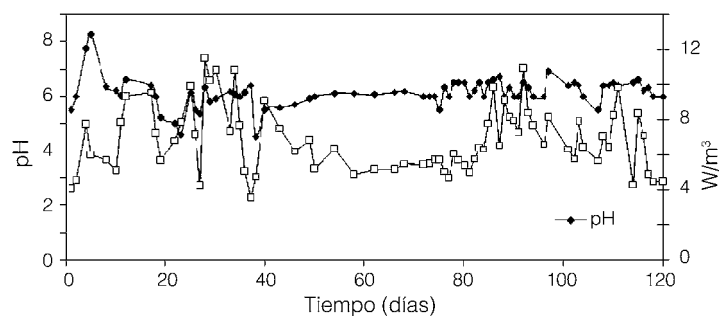


Figura 3. Desempeño de CCM1 en pH y W/m<sup>3</sup>.

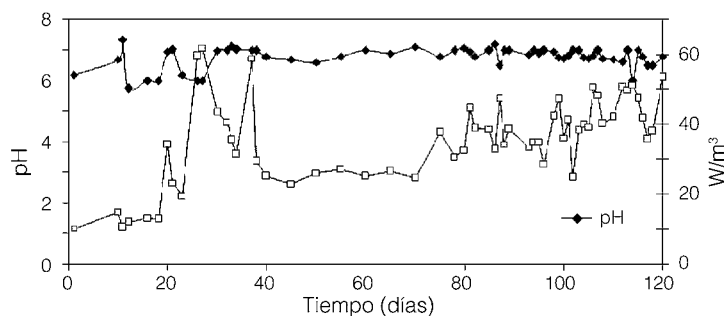


Figura 4. Desempeño de CCM2 en pH y W/m<sup>3</sup>.

ventaja importante es que pueden producir electricidad a partir de cualquier materia orgánica, operando a temperaturas moderadas, entre 15-40°C (Liu *et al.*, 2005; Aelterman *et al.*, 2006; Oh y Logan, 2007).

#### Eficiencia obtenida en la CCM

La eficiencia de corriente se determinó con base a la eficiencia coulombica (EC), definida como la cantidad de electrones almacenados en la materia orgánica como posible corriente disponible. Para determinar EC se utilizó la gráfica de la corriente en función del tiempo de operación de cada CCM, y luego se integró el área bajo la curva desde (t=0 hasta 120 días) obteniendo la carga total (q) en coulombs. El sustrato empleado fue glucosa. Para el cálculo de la cantidad teórica se empleó la ecuación de la EC, sobre la base de corriente generada bajo condiciones constantes, la cual estuvo dada por

$$E_{Cb} = \frac{MI}{Fbq\Delta COD}$$

donde q: volumen afluente,  $\Delta COD$ : DQO removida, F: constante de Faraday (98485C/mol de electrones), b: número moles de electrones producidos por mol de sustrato (para glucosa b=24), I: corriente en amperios, y M: peso molecular del sustrato (180). Las EC de las CCM en la literatura varían pero, en general, incrementan con la densidad de potencia, porque hay menos tiempo para que se pierda sustrato durante la competencia en procesos físicos y biológicos (Logan y Regan, 2006). En este estudio los valores de EC para la CCM1 y CCM2 fueron 25 y 55% respectivamente. Sin embargo, de acuerdo al tipo de sustrato y mediadores externos que se empleen, varían las eficiencias producidas. Por ejemplo, con acetato los valores van desde 65% de eficiencia (Min y Logan, 2004) hasta 78% (Oh y Logan, 2007). Con glucosa, la EC fue 89% empleando hexacianoferrato de potasio en el cátodo (Rabaey *et al.*, 2003), mientras que Liu y Logan obtuvieron 40-55% empleando una PEM, y 9-12% en ausencia de membrana pero utilizando un cátodo de aire; en este caso la mayor ventaja fue la pérdida de sustrato debido a la oxidación aerobia en el ánodo, es decir, mayor difusión de O<sub>2</sub> al ánodo. Con aguas residuales las EC fueron de 3-12% (Liu y Logan, 2004), con proteínas 6% (Heilman y Logan, 2006) y empleando lactato y ferrocianuro de potasio fue 2,4% (Ringeisen *et al.*, 2006).

#### Identificación de exoelectrógenos

La composición de las comunidades bacterianas que pueden ser viables en una CCM, o bien electroquímicamente activas y con interacciones con otras bacterias, son estudios que apenas se inician. Sin embargo, existen algunos reportes que analizan cuáles bacterias predominan en estas microcomunidades. Por ejemplo, Logan *et al.* (2005) identificaron bacterias del género *Shewanella*, y Holmes *et al.* (2004) identificaron *Geobacter*. Más recientemente Logan y Regan (2006) demostraron como las biopelículas generan electricidad a partir de transferencias continuas de electrones desde sustratos enriquecidos en el que la reducción del Fe es el principal responsable del proceso. Varios análisis de comunidades mixtas empleadas en el ánodo de CCM revelan una tendencia dominante de alfa-, beta- o gama-proteobacteria. Kim *et al.* (2004) observaron una mayoría de clones de beta-proteobacterias en una CCM tipo PEM donde se utilizó un lodo anaerobio procedente de una planta de tratamiento de procesos de almidón. De igual forma Phung *et al.* (2004), utilizando sedimentos de río como inóculo sobre un sustrato con bajas concentraciones de glucosa y glutamato, encontraron predominancia de alfa-proteobacterias. Lee *et al.* (2003) emplearon como donador de electrones al acetato, y utilizaron un inóculo procedente de lodos activados, encontrando alfa-, gama- y delta-proteobacterias. En el presente estudio se secuenciaron dos fragmentos correspondientes a genes 16S de bacterias presentes en el consorcio bacteriano recuperado en el ánodo de la celda de combustible microbiana. Estos dos clones son presuntamente parte de la población dominante, con base en que su patrón de restricción es común en esta microcomunidad. Las secuencias fueron analizadas realizando análisis BLASTx y tBLASTx (Altschul *et al.*, 1990) en la base de datos del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), y también se analizaron empleando la herramienta de clasificación del *Ribosomal DataBase Project* (RDP; Wang *et al.*, 2007). Las secuencias con mayor homología fueron obtenidas de la base de datos del RDP (Cole *et al.*, 2007, 2009) y/o del GenBank. Los alineamientos de las secuencias se realizaron en el programa MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007) y las secuencias fueron editadas manualmente para tener tamaños nucleotídicos similares. El análisis de homología se realizó mediante el MatGat v2 (Campanella *et*

*al.*, 2003). Una de las secuencias 16S corresponde al género *Novosphingobium*; empleando un nivel de confianza del 95% el clasificador del RDP reportó la siguiente jerarquía taxonómica: dominio Bacteria [100%]; phylum Proteobacteria [99%]; clase alpha-proteobacteria [99%]. La jerarquía taxonómica le asignó 76% de posibilidad en el orden Sphingomonadales. Dentro de este orden la familia Sphingomonadaceae contiene los géneros *Blastomonas*, *Erythromicrobium*, *Sandaracinobacter* y *Novosphingobium*. Es posible que el bajo valor de asignación se deba a la poca información que existe; son pocas las secuencias conocidas de especies bacterianas de estos géneros. En el análisis tBLASTx la homología más alta correspondió a la accesión EU167952 (*Novosphingobium pentaromativorans*) con un valor esperado de 4<sup>e-174</sup> y 92% de identidad. Después de editar las secuencias nucleotídicas en el MEGA4, la identidad nucleotídica recalculada en el MatGat fue de 96%. Este dato apoya que la secuencia obtenida corresponde a una Sphingomonadal del género *Novosphingobium*, por lo que puede proponerse como *Novosphingobium* sp., relacionada a *N. pentaromativorans*, alfa-proteobacteria gram-negativa que ha sido aislada de lodos activados (*activated sludge*) del tratamiento de agua de alcantarilla (Sohn *et al.*, 2004); también ha sido identificada en suelos contaminados y es capaz de degradar fenol, anilina, nitrobenzeno y fenentrenol (Hilyard *et al.*, 2008), por lo que resulta congruente la presencia de una Sphingomonadal del género *Novosphingobium* en el consorcio bacteriano recuperado de la celda de combustible. En el RDP hay 8 accesiones depositadas de cepas de *N. pentaromativorans* (accesiones en el GenBank AF502400, EU167949, EU167952, EU167954, EU167955, EU167956, EU167957, EU167958) y ninguna secuencia que corresponda a alguna otra especie de este género. Es posible que la secuencia obtenida en el presente trabajo sea un nuevo aporte en este grupo microbiano, ya que comparten únicamente 96% de identidad. La otra bacteria fue identificada como *Acidovorax* sp. En el RDP se obtuvo la siguiente jerarquía taxonómica: dominio Bacteria [100%], phylum Proteobacteria [100%], clase beta-proteobacteria [100%], orden Burkholderiales [100%], familia Comamonadaceae [100%]. Esta familia contiene los géneros *Comamonas*, *Acidovorax*, *Alicyclophilus*, *Diaphorobacter*, *Polaromonas*, *Curvibacter* y *Simplicispira*. En el análisis tBLASTx con la base de datos del Genbank se encontró la homología más alta con la accesión FJ609369, la cual corresponde a un clon bacteriano no cul-

tivable (valor esperado 0,0; identidad 98%). Aunque no tiene identidad específica, el resultado es interesante porque esa bacteria fue reportada de sedimentos de río y como degradadora del xenobiótico nonilfenil (bajo la accesión FJ609369 del GenBank hay disponible más información sobre esta secuencia o la bacteria; la secuencia fue recientemente depositada y los autores refieren que el trabajo fue sometido para evaluación y publicación). La segunda secuencia que le sigue en homología en el tBLASTx es la accesión AB076843, correspondiente a *Acidovorax* sp. KSP2, no cultivable. La homología calculada por el MatGat entre la secuencia nucleotídica de esa cepa y la secuencia obtenida en el presente trabajo fue de 99%, lo que permite identificarla como una cepa no cultivada de *Acidovorax* sp. Esta bacteria es gram-negativa, ha sido reportada en lodos activados y es degradadora de xenobióticos (Hiraishi, 2002). Estos datos son compatibles con su presencia en el consorcio bacteriano manejado en el presente trabajo. Ambas bacterias identificadas son similares a las descritas previamente por otros autores para lodos activados, debido probablemente a que las fuentes de los inóculos son similares. Aunque esta información parece sugerir que los géneros dominantes se conservan en los lodos activados, la información bibliográfica disponible es muy limitada, por lo que no es posible discernir si es ésta la situación o son hechos fortuitos, especialmente porque los inóculos proceden de diferentes regiones geográficas. Cuando se conozca ampliamente la biodiversidad microbiana en los diferentes consorcios podrá distinguirse con claridad este hecho.

## Conclusiones

-El efecto de la arquitectura, el tipo de sustrato y el inóculo empleado, bien sea de sedimentos de río, playas ó aguas residuales, utilizados para el ensamble de una CCM, necesitan ser mejor entendidos y estudiados, pues finalmente rigen a la comunidad que se desarrolla en este tipo de sistemas.

-Bajo las condiciones de operación de las CCMs fue identificada la presencia de una *Novosphingobium* sp. y una *Acidovorax* sp., alfa y beta proteobacterias, respectivamente; ambas han sido descritas en lodos activados.

-Con base en la secuencia obtenida *Novosphingobium* sp. se relaciona a *N. pentaromativorans*, alfa-proteobacteria gram negativa que ha sido aislada de lodos activados e identificada en suelos contaminados.

-Es posible que la secuencia obtenida sea un nuevo aporte en este grupo microbia-

no, ya que comparten únicamente 96% de identidad.

-La *Acidovorax* sp. identificada presentó 99% de homología con la cepa KSP2 reportada en el GenBank.

-La secuenciación masiva de la biblioteca de genes 16S clonada en el vector TOPO-TA puede aportar información valiosa sobre qué especies microbianas están presentes y su abundancia relativa en la microcomunidad estudiada. La literatura, ayudará a elucidar si los consorcios son similares en diferentes lodos activados, independientemente del lugar del orbe donde hayan sido colectados, o si existe una dominancia selectiva de especies según la procedencia del inóculo, el tratamiento seguido y su aplicación, lo cual tendrá implicaciones biotecnológicas importantes.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de CONACYT, mediante el proyecto de Investigación Científica Básica 55099, el proyecto de Retención 51290 (Responsable la Dra. Liliana Alzate-Gaviria) y el proyecto CIAM 58636.

## REFERENCIAS

- Aelterman P, Rabaey K, Clauwaert P, Verstraete W (2006) Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 54: 9-15.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Alzate-Gaviria L, Fuentes-Albarrán C, Álvarez-Gallegos A, Sebastian PJ (2008) Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. *Interciencia* 33: 503-509.
- Angenent L, Karim K, AL-Dahhan M, Wrenn B, Domingues-Espinosa R (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22: 477-485.
- APHA (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18<sup>a</sup> ed. APHA, AWWA, WEF. Washington, DC, EEUU. 1170 pp.
- Campanella J, Bitincka L, Smalley J (2003) MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4: 29. doi: 10.1186/1471-2105-4-29 (www.biomedcentral.com/1471-2105/4/29).
- Cole J, Chai B, Farris R, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen A, McGarrell D, Bandela A, Cardenas E, Garrity G, Tiedje J (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue) D169-D172. doi: 10.1093/nar/gkl889.
- Cole J, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris R, Kulam-Syed-Mohideen A, McGarrell D, Marsh T, Garrity G, Tiedje J (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nu-*

*cleic Acids Res.* 37 (Database issue): D141-D145. doi: 10.1093/nar/gkn879.

- Gorby Y, Yanina S, McLean J, Rosso K, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge T, Chang I, Kim B, Kim K, Culley D, Reed S, Romine M, Saffarini D, Shi L, Elias D, Kennedy D, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealon K, Fredrickson J (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *PNAS* 103: 11358-11363.
- He Z, Minteer S, Angenent L (2005) Electricity Generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Env. Sci. Technol.* 39: 5262-5267.
- Hernández M, Kappier A, Newman D (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 921-928.
- Hilyard E, Jones-Meehan J, Spargo B, Hill R (2008) Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 1176-1182.
- Hiraishi A (2002) Members of the family Comamonadaceae as primary poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 3206-3214.
- Holmes D, Nicoll J, Bond D, Lovley D (2004) Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl. Env. Microbiol.* 70: 6023-6030.
- Jang J, Pham T, Chang I, Khan K, Moon H, Cho K, Kim B (2004) Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell. *Process Biochem.* 39: 1007-1012.
- Kim B, Park H, Kim H, Kim G (2004) Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 672-681.
- Lee J, Phung N, Chang I, Kim B, Sung H (2003) Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 185-191.
- Liu H, Logan B (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Env. Sci. Technol.* 38: 4040-4046.
- Liu H, Cheng S, Logan B (2005) Power generation in feed batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Env. Sci. Technol.* 39: 5488-5493.
- Logan B (2008) *Microbial Fuel Cells*. Wiley. Hoboken, NJ, EEUU. 200 pp.
- Logan B, Regan J (2006) Microbial fuel cells - challenges and applications. *Env. Sci. Technol.* 40: 5172-5180.
- Logan B, Murano C, Scott K, Gray N, Head I (2005) Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Res.* 39: 942-952.
- Metcalfe & Eddy (1995) *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. International

- Edition. 3<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill. Madrid, España. 1485 pp.
- Min B, Logan B (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Env. Sci. Technol.* 38: 5809-5814.
- Oh S, Logan B (2007) Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation. *Power Sourc.* 167: 11-17.
- Park D, Zeikus J (2003) Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 348-355.
- Pham T, Rabaey K, Aelterman P, Clauwaert P, Schampelaire L, Boon N, Verstraete W (2006) Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Eng. Life Sci.* 6: 285-292.
- Phung N, Lee J, Kang K, Chang I, Gadd G, Kim B (2004) Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 77-82.
- Potter M (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. Lond.* 84: 260-276.
- Rabaey K, Verstraete W (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23: 291-298.
- Rabaey K, Lissens G, Siliciano S, Verstraete W (2003) A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* 25: 1531-1535.
- Rabaey K, Boon N, Siciliano S, Verhaege M, Verstraete W (2004) Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Env. Microb.* 70: 5373-5382.
- Ringeisen B, Henderson E, Wu P, Pietron J, Little B, Biffinger J, Jones-Meehan J (2006) High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Env. Sci. Technol.* 40: 2629-2634.
- Rittmann B (2006) Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24: 261-268.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY, EEUU. pp. 1.23-1.30.
- Sohn J, Kwon K, Kang J, Jung H, Kim S (2004) *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1483-1487.
- Stams A, Plugge C, Dolging J, Schraa G (2006) Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Env. Microbiol.* 8: 371-382.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA), software ver. 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Ac. Res.* 24: 3381-3391.
- Voggu L, Schlag S, Biswas R, Rosenstein R, Rausch C, Götz F (2006) Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 188: 8079-8086.
- Wang Q, Garrity G, Tiedje J, Cole J (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- You S, Zhao Q, Jiang J, Zhang J, Zhao S (2006) Sustainable approach for leachate treatment: Electricity generation in microbial fuel cell. *J. Env. Sci. Health* 41: 2721-2734.

## PERFORMANCE EVALUATION AND IDENTIFICATION OF EXOELECTROGENS IN TWO TYPES OF MICROBIAL FUEL CELLS WITH DIFFERENT ANODE CONFIGURATION

Liliana Alzate-Gaviria, Karla González, Isaías Peraza, Orlando García, Jorge Domínguez-Maldonado, Jesús Vázquez, Miguel Tzec-Simá and Blondy Canto-Canché

### SUMMARY

Two microbial fuel cells (MCC) type PEM (proton exchange membrane) with different configuration at the anode were compared. The respective microbial samples which were isolated in order to identify the types of bacteria by amplification 16S gene. Sequencing of two clones showed the presence of alpha and beta proteobacteria as exoelectrogens. Such bacteria have been previously identified in activated sludge. The systems were operated in batch and mesophilic temperature intervals. CCM1 and CCM2 used carbon paper and granular graphite anodes, respectively.

The substrate used was synthetic wastewater (ARS), containing glucose as carbon source, as well as using a mixed inoculum as biocatalyst; in the cathode chamber an O<sub>2</sub> saturated aqueous solution was used. The power density in CCM1 was 6W/m<sup>3</sup>, with a COD (chemical O<sub>2</sub> demand) removal of 70%, while in CCM2 the observed average power density was ~48W/m<sup>3</sup>, with a 95% COD removal. Both systems were evaluated during 120 days, the organic load was 4.7kg DQO/m<sup>3</sup> per day and the HRT (hydraulic retention time) was of 24h.

## DESEMPENHO AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE EXOELECTRÓGENOS EM DOIS TIPOS DE MICRÓBIOS COMBUSTÍVEL CÉLULAS COM CONFIGURAÇÃO DIFERENTE NO ÂNODO

Liliana Alzate-Gaviria, Karla González, Isaías Peraza, Orlando García, Jorge Domínguez-Maldonado, Jesús Vázquez, Miguel Tzec-Simá e Blondy Canto-Canché

### RESUMO

Compararam-se duas células de combustível microbianas (CCM) tipo PEM (proton exchange membrane) com diferente configuração no ânodo, das quais se isolaram as respectivas mostras microbianas para identificar o tipo de bactérias presentes mediante a amplificação do gene 16S; a seqüenciação de um par de clonas evidencio a presença de alfa e beta proteobacterias entre os exoelectrôgenos. Este tipo de bactérias foram previamente em lodos ativados. Os sistemas foram operados em batch e em intervalos de temperatura mesofílica. CCM1 foi utilizado na superfície de grafite e os granulados utilizados CCM2 grafite. Na CCM1 se utilizou grafito de superfície pla-

na e a CCM2 utilizou grafito granular. O substrato empregado foi água residual sintética (ARS), contendo hexose como fonte de carbono além de empregar um inoculo misto como biocatalizador; na câmara do cátodo um eletródo acuoso saturado de O<sub>2</sub>. A densidade de poder na CCM1 foi de 6W/m<sup>3</sup> com uma remoção de DQO (demanda química de O<sub>2</sub>) do 70%, enquanto na CCM2 observou-se uma média densidade de poder de ~48W/m<sup>3</sup> com 95% de remoção de DQO. Ambos sistemas foram avaliados durante 120 dias, o ônus orgânico foi 4,7kg DQO/m<sup>3</sup> por dia, o TRH (tempo de retenção hidráulica) foi de 24h.