



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

## **Posgrado en Energía y Medio Ambiente**

**Tesis**

# **Uso de una columna de Winogradsky para la generación de potencial eléctrico a través de comunidades microbianas**

Presenta

**M. en B. Carlos Leopoldo Fernández Rendón**

Directores

Dra. Guadalupe Barrera Escorcía

Dr. Hernando Romero Paredes Rubio

Asesores

Dr. Bruno Gómez Gil

Dr. Ignacio González Martínez

Ciudad de México, noviembre 2022



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Fecha : 31/10/2022  
Página : 1/1

**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE) del alumno CARLOS LEOPOLDO FERNANDEZ RENDON, matrícula 2161801656, quien cumplió con los 402 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha cuatro de noviembre del 2022 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Uso de una columna de Winogradsky para la generación de potencial eléctrico a través de comunidades microbianas.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 90 créditos y el programa consta de 492 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

**JURADO**

**Presidente**

DR. HUGO JOAQUIN AVILA PAREDES

**Secretaria**

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ

**Vocal**

DR. MIGUEL ANGEL DEL RIO PORTILLA

**Vocal**

DR. VICTOR SANCHEZ VAZQUEZ

**Vocal**

DRA. MARIA GUADALUPE SALINAS JUAREZ

## Dedicatoria

A mi esposa **Yanin Islas Barrios**, mi compañera de vida y a quien amo con todo mi ser. Por su amor, su aceptación, su apoyo y porque constantemente me impulsa a ser una mejor persona.

A mi madre **Guadalupe Rendón Maus** y a mi padre **Eduardo Fernández Vallejo** por su amor, por su ejemplo, por todo su apoyo y por impulsarme en todo. Muchas gracias, todo lo que soy lo debo a ustedes.

A mi hermano **Javier Fernández Rendón** por tu ejemplo, tu compañía y tu apoyo.

A todos mis **familiares** en especial a mis **abuelos** Eduardo Fernández<sup>†</sup>, Dolores Vallejo, Alfonso Rendón<sup>†</sup> y Yolanda Maus<sup>†</sup> por su amor y su apoyo. A mi tío Alfonso Rendón<sup>†</sup> y a mi prima Renata Rendón<sup>†</sup>, al resto de mis tíos y primos por su compañía y amor. A Cristina Barrios, Arlem Islas y a Enya Islas por su apoyo, su amor y por formar parte de mi familia.

A mis **amigos** con quienes he compartido parte de mi vida y de quienes he aprendido mucho; ustedes han influido en mí de una forma u otra para convertirme en la persona que soy.

A mis perros **Hera<sup>†</sup>** y **Higgs<sup>†</sup>** por su compañía y su amor incondicional.

A **Dios**, por su infinito amor y por permitirme tener experiencias tan especiales en mi vida.

## Agradecimientos

Agradezco a la **Universidad Autónoma Metropolitana** y a **CONACYT** por las becas otorgadas que me permitieron realizar los estudios de doctorado en la **Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa**.

Agradezco a la **Dra. Guadalupe Barrera Escorcía** por todas sus enseñanzas y por darme la oportunidad de proponer este proyecto, doy gracias por su dirección y apoyo en este proceso de formación y por ser parte de mi formación profesional y como investigador. Al **Dr. Hernando Romero Paredes Rubio** por confiar en mí, por su guía, por impulsarme y formar parte de mi aprendizaje profesional y como investigador.

También agradezco al **Dr. Bruno Gómez Gil** por formar parte de mis asesores, por su apoyo en el análisis de la comunidad bacteriana y por todas sus enseñanzas. Al **Dr. Ignacio González** por todo el tiempo dedicado, el apoyo incondicional, su guía, consejos, sus comentarios y correcciones. Sin duda tengo un gran aprendizaje gracias a todos los doctores que me guiaron en la realización de este trabajo. Gracias por contribuir en mi crecimiento personal y profesional.

A los doctores Hugo Joaquín Ávila Paredes, Miguel Ángel del Río Portilla, Víctor Sánchez Vázquez y a las doctoras María Guadalupe Salinas Juárez y Nancy Velasco Álvarez por la revisión del documento, por todos sus comentarios, correcciones y observaciones que sirvieron para mejorar el escrito.

A las doctoras Katy Juárez López, Florina Ramírez Vives, y al Dr. Hugo Joaquín Ávila Paredes por los comentarios y consejos para mejorar el proyecto.

Al Dr. Edgar del Carmen Sierra-Palacios por sus excelentes clases de ecología microbiana en la licenciatura, por enseñarme la columna de Winogradsky y por su

apoyo en este proyecto. Al Dr. Rogelio Pérez Cadena por sus enseñanzas que sirvieron para el diseño de este proyecto. Al M. en B. Edgar Islas Arbeu por recomendarme el uso de la plataforma Arduino que se utilizó en este proyecto.

Agradezco a Marcela Méndez-Tovar por su ayuda en los análisis electroquímicos y a mis compañeros de electroquímica Ma. Concepción, Alice, Carlos, Harrison, Gregorio y Cesar por su apoyo e su interés en el proyecto. También agradezco a mis compañeros del posgrado por su compañía y apoyo.

## Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
1. ANTECEDENTES.....	9
1.1    Sistemas bioelectroquímicos .....	9
1.2    Celdas de combustible microbianas .....	9
1.3    Comunidades bacterianas en celdas de combustible microbianas .....	14
1.4    Columna de Winogradsky.....	16
1.5    Bacterias que participan en el ciclo biogeoquímico del azufre .....	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	22
2.1    Pregunta de investigación.....	22
2.2    Hipótesis.....	22
3. OBJETIVOS .....	23
3.1    Objetivo general .....	23
3.2    Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODO .....	24
4.1    Análisis de las muestras de sedimento .....	25
4.2    Obtención del consorcio microbiano en columnas de Winogradsky.....	26
4.3    Construcción de las celdas microbianas de sedimento y desarrollo de un sistema de adquisición de datos.....	27
4.3.1    Construcción de las celdas de combustible microbianas de sedimento .....	27
4.3.2    Desarrollo de un sistema de adquisición de datos con Arduino .....	28
4.4    Determinación de los efectos de la composición del medio de cultivo y fotoperiodo en la generación de voltaje .....	29
4.4.1    Fase I: Prueba de desempeño con papel y otras fuentes de carbono.....	30
4.4.2    Fase II: Efecto de la razón másica papel/sulfato.....	30
4.4.3    Fase III: Efecto del fotoperiodo .....	31
4.4.4    Fase IV: Diseño factorial para evaluar la generación de voltaje.....	32
4.4.5    Fase V: Análisis del modelo superficie de respuesta y comprobación .....	34

4.5	Análisis de la comunidad bacteriana en dispositivos con diferentes nutrientes ..	35
4.5.1	Monitoreo del voltaje en los tratamientos para el análisis de la comunidad bacteriana.....	35
4.5.2	Extracción de ADN para el análisis de metagenómica.....	35
4.5.3	Análisis de metagenómica 16S: Identificación de la comunidad bacteriana	35
4.5.4	Análisis de la diversidad bacteriana.....	36
4.6	Estudio de la cinética microbiana en la columna de Winogradsky .....	36
4.6.1	Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	37
4.6.2	Determinación de concentración de sulfatos, sulfuros y azufre.....	37
4.6.3	Determinación de concentración de carbohidratos totales.....	38
4.6.4	Determinación de concentración de biomasa .....	38
4.6.5	Determinación de concentración de pigmentos fotosintéticos.....	38
4.7	Análisis electroquímico .....	38
4.8	Estrategia para realizar la integración.....	40
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
5.1	Características del sedimento.....	40
5.2	Obtención del consorcio microbiano en columnas de Winogradsky.....	41
5.3	Celdas microbianas de sedimento y sistema de adquisición de datos .....	42
5.4	Composición del medio de cultivo y efecto del fotoperiodo en la generación de voltaje	43
5.4.1	Fase I: Prueba de desempeño con papel y otras fuentes de carbono.....	43
5.4.2	Fase II: Efecto de la razón másica papel/sulfato.....	46
5.4.3	Fase III: Efecto del fotoperiodo .....	48
5.4.4	Fase IV: Diseño factorial.....	49
5.4.5	Fase V: Análisis del modelo superficie de respuesta y comprobación .....	55
5.5	Comunidad bacteriana en dispositivos con diferentes nutrientes .....	60
5.5.1	Generación de voltaje en los tratamientos para el análisis de la comunidad bacteriana.....	60
5.5.2	Extracción de ADN para el análisis de metagenómica.....	61
5.5.3	Composición de la comunidad bacteriana .....	62
5.5.4	Análisis de diversidad .....	71
5.5.5	Comunidad bacteriana y su relación con la generación de voltaje.....	76

5.6	Cinética microbiana en las columnas de Winogradsky .....	77
5.6.1	Parámetros fisicoquímicos.....	78
5.6.2	Sulfato, sulfuro y azufre .....	81
5.6.3	Carbohidratos totales.....	83
5.6.4	Biomasa .....	84
5.6.5	Pigmentos fotosintéticos.....	85
5.6.6	Parámetros cinéticos de las columnas.....	86
5.7	Análisis electroquímico .....	88
5.8	Integración final de resultados .....	90
6.	CONCLUSIONES .....	95
	Perspectivas .....	96
7.	REFERENCIAS .....	97
8.	ANEXOS.....	104
8.1	Anexo 1. Programación de tarjetas Arduino.....	104
8.2	Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN para muestras de sedimento y agua	111
8.3	Anexo 3. Equipo de secuenciación Miniseq de Illumina.....	112
8.4	Anexo 4. Curva patrón para sulfato [58].....	113
8.5	Anexo 5. Curva patrón para sulfuro [72]. .....	114
8.6	Anexo 6. Curva patrón para azufre [73]. .....	115
8.7	Anexo 7. Curva patrón para carbohidratos [57].....	117
8.8	Anexo 8. Barrido de la absorbancia de clorofila [75–77]. .....	119
8.9	Anexo 9. Curvas de rarefacción de las columnas de Winogradsky. ....	121
8.10	Anexo 10. Composición de la comunidad microbiana en las columnas de Winogradsky. ....	125
8.11	Anexo 11. Diagramas de Venn. ....	126
8.12	Anexo 12. Parámetros fisicoquímicos de la cinética microbiana. ....	127

## Índice de figuras

Figura 1.1. Estructura general de los sistemas bioelectroquímicos: a) Celda de electrólisis microbiana (MEC) y b) Celda de combustible microbiana (CCM). En la MEC se genera un producto a partir de los nutrientes y la aplicación de energía eléctrica. En la CCM se genera energía eléctrica a partir de los nutrientes (combustible). Modificado de Rozendal <i>et al.</i> [27].	10
Figura 1.2. Celda de combustible microbiana (CCM) y sus elementos: cámara anódica (anaeróbica) con su electrodo (ánodo), cámara catódica (aeróbica) con su electrodo (cátodo), membrana, oxigenación (natural o artificial) y multímetro. Modificado de Logan [1].	11
Figura 1.3. Mecanismo de transferencia de carga al ánodo de forma directa: A) por medio del citocromo, B) por medio de nanocable; y de forma indirecta: C) a través de mediadores redox. Modificado de Schröder [31].	11
Figura 1.4. Celda de combustible microbiana de sedimento. El ánodo se encuentra enterrado en el sedimento y el cátodo sumergido en el agua conectados por un circuito externo para el paso de electrones. Modificado de Zhu <i>et al.</i> [8].	13
Figura 1.5. Columna de Winogradsky. El esquema muestra el gradiente de condiciones que se generan (concentración de oxígeno, ácido sulfhídrico y potencial redox), los grupos de microorganismos y su metabolismo. Modificado de Rogan <i>et al.</i> [18].	16
Figura 1.6. Transformación de los compuestos en el ciclo del azufre. A) Sulfato-reducción, B) Reducción del azufre, C) Oxidación del azufre, D) Desproporción, E) Asimilación del sulfato y F) Desulfurilación. Modificado de Liang <i>et al.</i> [30].	20
Figura 1.7. Degradación de materia orgánica: a) en un ambiente con sulfato donde se favorece el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras y la sulfurogénesis, b) en un ambiente sin sulfato donde se favorece el desarrollo de bacterias metanogénicas. Modificado de Muyzer y Stams [24].	21
Figura 4.1. Diagrama experimental global que relaciona las actividades con los objetivos específicos.	24
Figura 4.2. Sitio de colecta de muestras de sedimento en Tecolutla, Ver.	25
Figura 4.3. Columna de Winogradsky con la posición de electrodos, sus dimensiones y el circuito eléctrico con el sensor de voltaje (elaborado en SketchUp).	28
Figura 4.4. Celda microbiana con los electrodos de grafito, sensores de voltaje, temperatura-humedad y luz conectados al sistema de adquisición de datos compuesto por una placa Arduino UNO y una placa de expansión para memoria SD.	29
Figura 4.5. Celdas microbianas conectadas a los sensores de voltaje y al sistema de adquisición de datos en el laboratorio de temperatura controlada.	34
Figura 4.6. Sistema de tres electrodos A) esquema (elaborado en SketchUp) y B) fotografía. Electrodo de referencia dentro del capilar de Luggin (a), electrodo de trabajo (b) y contraelectrodo (c) para realizar el potencial de circuito abierto (OCP) y la voltamperometría cíclica (VC) con el potencióstato BioLogic VMP3	39
Figura 5.1. Diagrama ternario de Trefethen para la clasificación de sedimento con base en el tamaño de partícula [56]. Los puntos claros corresponden a las muestras analizadas y el punto oscuro al promedio.	41

Figura 5.2. Apariencia de la columna de Winogradsky como resultado del crecimiento de la comunidad microbiana durante los 40 días de incubación con un enriquecimiento de sulfato de magnesio como fuente de azufre y papel tipo kraft como fuente de celulosa. La barra inferior representa el periodo de oscuridad (negro) y de luz (blanco). .....	42
Figura 5.3. Generación de voltaje al utilizar papel y sulfato al 1 % (razón másica carbono/sulfato de 1.14). Las líneas negras corresponden a los resultados de las tres réplicas, el área sombreada al promedio del voltaje y la línea roja a la temperatura ambiental.....	44
Figura 5.4. Generación de voltaje al cambiar la composición del medio: A) concentración de papel al 2 % (razón másica carbono/sulfato de 2.29). B) concentración de sulfato al 2 % (razón másica carbono/sulfato de 0.57).....	44
Figura 5.5. Generación de voltaje al utilizar fuentes de carbono simples: A) glucosa y B) lactato de calcio con una razón másica carbono/sulfato de 0.57. ....	45
Figura 5.6. Generación de voltaje al utilizar papel en 5 tratamientos con distinta razón másica carbono/sulfato: A) 0.14, B) 0.28, C) 0.57, D) 1.14 y E) 2.29. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.....	47
Figura 5.7. Efecto de la luz y oscuridad, fotoperiodo (12 h luz y 12 h oscuridad) en la generación de voltaje con el medio de cultivo con papel tratamiento C fase II. El fondo blanco representa el tiempo de luz y el fondo gris el periodo de oscuridad. ....	48
Figura 5.8. Apariencia de las celdas de combustible microbianas de sedimento con distinta razón carbono/sulfato del medio de cultivo en el día 45. Tratamientos T1 a T9 correspondientes al diseño experimental de lactato. ....	49
Figura 5.9. Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar lactato de calcio (L) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio. ....	50
Figura 5.10. Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar celulosa (C) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.....	51
Figura 5.11. Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar papel (P) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.....	52
Figura 5.12. Gráfica de efecto de los factores en la generación de voltaje. Factores: fuente de carbono a partir de celulosa (A) o papel (B) y el sulfato. ....	56
Figura 5.13. Gráfica del modelo de superficie de respuesta para encontrar las condiciones en las que se maximiza la generación de voltaje en función de la razón carbono/sulfato al utilizar celulosa (A) y papel (B) como fuente de carbono. ....	58
Figura 5.14. Generación de voltaje en celdas con las condiciones resultantes del análisis de superficie de respuesta para incrementar la producción de voltaje con: A) celulosa (0.25 % peso) y sulfato (0.85 % peso) con una razón másica carbono/sulfato de 0.34 y B) papel (0.64 % peso) y sulfato (4 % peso) con una razón másica carbono/sulfato de 0.18. ....	59
Figura 5.15. Promedio del voltaje generado con 5 réplicas de cuatro tratamientos A) LT6, B) LT5, C) PT6 y D) PT5. En una celda microbiana de sedimento monitoreada por 19 días antes de tomar las muestras para la extracción de ADN.....	61

Figura 5.16. Concentración de ADN en muestras de los tratamientos A) LT6, B) LT5, C) PT6 y D) PT5 de las muestras de la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).....	62
Figura 5.17. Composición de las comunidades bacterianas a nivel de phylum con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup). ...	63
Figura 5.18. Composición de las comunidades bacterianas a nivel de clase con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup). ...	64
Figura 5.19. Composición de las comunidades bacterianas a nivel de orden con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup). ...	65
Figura 5.20. Procesos metabólicos predominantes en las columnas de Winogradsky (en negro) considerando las comunidades microbianas presentes en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.	70
Figura 5.21. Diagramas de Venn con los géneros de bacterias presentes en la zona superior (A) e inferior (B) de la columna de Winogradsky en los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.....	73
Figura 5.22. Valor del índice de Morisita-Horn ( $I_{MH}$ ) que indican el recambio de géneros en la composición de las comunidades bacterianas entre la zona superior e inferior de la columna de Winogradsky en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5. ....	75
Figura 5.23. Voltaje generado en las celdas de la cinética microbiana con los tratamientos LT5 y PT5 (razón másica carbono/sulfato de 0.57).....	78
Figura 5.24. Valores de oxígeno disuelto y potencial redox en la zona superior e inferior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).....	79
Figura 5.25. Valores de pH en la zona superior e inferior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).....	80
Figura 5.26. Consumo de sulfato y concentración de sulfuro y azufre elemental en la zona inferior y superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5). ....	82
Figura 5.27. Consumo de sulfato y carbohidratos para la formación de biomasa en la zona inferior y superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5). ....	84
Figura 5.28. Concentración de sulfato y clorofila en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).....	86
Figura 5.29. Concentración de clorofila y biomasa (ADN) en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).....	86
Figura 5.30. Resultados de la voltamperometría cíclica de la zona superior del tratamiento PT5: A) abiótico y B) con comunidad bacteriana. La línea azul corresponde al sentido anódico y la naranja al sentido catódico.....	89
Figura 5.31. Diagrama de Pourbaix del azufre. El círculo rojo corresponde al valor de pH y potencial registrados en la zona inferior y el círculo azul corresponde al valor de pH y potencial de la zona superior de la celda microbiana en el tratamiento PT5, esta diferencia favorece la generación de voltaje. Modificado de Pourbaix [116]. ....	89
Figura 5.32. Análisis de componentes principales de las celdas de la cinética microbiana. Celdas microbianas con lactato (L) y papel (P); el número corresponde al día de la cinética. ....	92
Figura 5.33. Esquema de los posibles procesos microbiológicos y bioelectroquímicos en la celda microbiana de sedimento. A) Tratamiento con lactato y B) tratamiento con papel. ....	94

Figura 8.1. Equipo MiniSeq de Illumina para la secuenciación de las muestras.....	112
Figura 8.2. Curva patrón para sulfato. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 420 nm. .....	113
Figura 8.3. Curva patrón para sulfuro. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 480 nm. .....	114
Figura 8.4. Curva patrón para azufre elemental. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 274 nm.....	115
Figura 8.5. Barrido de absorbancia de 200 a 350 nm de las diluciones de azufre solubilizadas en hexano.....	116
Figura 8.6. Curva patrón para carbohidratos (glucosa). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm. ....	117
Figura 8.7. Curva patrón para carbohidratos (almidón). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm. ....	118
Figura 8.8. Barrido de absorbancia de 300 a 800 nm de dos muestras de clorofila solubilizada en acetona.....	119
Figura 8.9. Barrido de absorbancia de A) cultivo de algas, B) cultivo mixto y C) cultivo de bacterias. Modificado de Coraco & Puccoon [77]. ....	120
Figura 8.10. Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6.....	121
Figura 8.11. Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT5.....	122
Figura 8.12. Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos PT6. ....	123
Figura 8.13. Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos PT5. ....	124
Figura 8.14. Composición de la comunidad bacteriana a nivel de familia en las columnas de Winogradsky correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.....	125
Figura 8.15. Composición de la comunidad bacteriana a nivel de género en las columnas de Winogradsky correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.....	125
Figura 8.16. Diagramas de Venn con los OTUs presentes en: A) zona superior y B) zona superior en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 de las columnas de Winogradsky. ....	126
Figura 8.17. Valores de temperatura en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).....	127
Figura 8.18. Valores de sólidos totales disueltos (STD) y de conductividad eléctrica (EC) en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5). ....	127

## Índice de tablas

Tabla 1.1. Ecuaciones de reacción de la diversidad metabólica presente en la columna de Winogradsky.....	18
Tabla 4.1. Tratamientos con 5 relaciones carbono/sulfato utilizando papel como fuente de carbono y cambiando únicamente la cantidad de sulfato: carbono (C) y sulfato (SO <sub>4</sub> ). .....	31
Tabla 4.2. Tratamientos 1 al 9 con 5 proporciones distintas de carbono y sulfato en el medio de cultivo. Diseño factorial 3 <sup>2</sup> , con tres niveles: bajo, medio y alto con dos factores: carbono y sulfato. Estos tratamientos se emplearon para las tres fuentes de carbono: lactato, celulosa y papel. ....	33
Tabla 5.1. Análisis de varianza (ANOVA) de la generación de voltaje en la columna de Winogradsky al utilizar celulosa como fuente de carbono. ....	57
Tabla 5.2. Análisis de varianza (ANOVA) de la generación de voltaje en la columna de Winogradsky al utilizar papel como fuente de carbono. ....	57
Tabla 5.3. Abundancia relativa de los géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con lactato (tratamientos LT6 y LT5). ....	67
Tabla 5.4. Abundancia relativa de los géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con papel (tratamiento PT6 y PT5). ....	68
Tabla 5.5. Porcentaje de bacterias anaerobias, facultativas y aerobias en las zonas inferior y superior de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5. ....	69
Tabla 5.6. Índices de diversidad alfa de las columnas de Winogradsky con diferentes nutrientes (tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5) de la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup)..	72
Tabla 5.7. Géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con papel tratamiento PT5. ....	75
Tabla 5.8. Parámetros cinéticos en los tratamientos LT5 y PT5. ....	87
Tabla 5.9. Correlación entre variables de la cinética y la generación de voltaje en PT5. ....	91
Tabla 8.1. Soluciones de sulfato con concentración conocida para obtener la curva patrón.....	113
Tabla 8.2. Soluciones de sulfuro con concentración conocida para obtener la curva patrón. ....	114
Tabla 8.3. Diluciones de sulfato, concentración de sulfato y azufre. ....	116
Tabla 8.4. Diluciones de glucosa con concentración conocida para obtener la curva patrón de carbohidratos.....	117
Tabla 8.5. Diluciones de almidón con concentración conocida para obtener la curva patrón de carbohidratos.....	118

## Resumen

Las celdas de combustible microbianas de sedimento (CCMS) son sistemas bioelectroquímicos que generan electricidad a partir de la energía química de compuestos que son utilizados por los microorganismos. El voltaje se genera por la diferencia de potencial entre un electrodo enterrado en el sedimento y el otro suspendido en el agua.

Algunos investigadores han estudiado la comunidad microbiana presente en las CCMS y han relacionado la presencia de bacterias sulfato-reductoras con la generación de electricidad. Estas bacterias y el ciclo del azufre se han estudiado en ecología microbiana con un modelo denominado "columna de Winogradsky". Este modelo consiste en un cilindro con sedimento y agua, enriquecido con nutrientes. La columna de Winogradsky puede ser operada como una CCMS al incorporar un circuito eléctrico y un par de electrodos que conecte la capa del sedimento con la capa de agua.

En los sistemas con sedimento la comunidad microbiana puede cambiar a partir de la disponibilidad de nutrientes. La concentración de sulfato en el sedimento podría modificar la abundancia de bacterias sulfato-reductoras y mejorar la generación de voltaje al cambiar el potencial de ánodo. La razón carbono/sulfato puede modificar la comunidad microbiana y mejorar la generación de voltaje en las CCMS.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue analizar la generación de voltaje en la columna de Winogradsky a partir del crecimiento de diferentes comunidades microbianas obtenidas al modificar la fuente de carbono y la razón carbono/sulfato del medio de cultivo.

Se realizaron columnas de Winogradsky enriquecidas con sulfato y papel kraft para obtener el consorcio microbiano a partir de sedimento del estuario de Tecolutla, Veracruz. El consorcio desarrollado se inoculó en los sistemas para la generación de voltaje con una razón molar carbono/sulfato de 1.14. Las celdas microbianas empleadas consistieron en recipientes de vidrio cilíndrico (46 mm de diámetro y 120 mm de alto) con 2 electrodos de grafito (uno en la zona inferior y otro en la zona superior) conectados a sensores de voltaje y a un sistema de adquisición de datos con placas Arduino.

Se modificó la composición del medio de cultivo para enriquecer los dispositivos y determinar su efecto en la generación de voltaje. Se aplicó un diseño factorial con nueve tratamientos por triplicado con distinta razón molar carbono/sulfato: 0.04 (T1), 0.14 (T2 y T4), 0.57 (T3, T5 y T7), 2.29 (T6 y T8) y 9.16 (T9), se usaron tres fuentes de carbono (lactato, celulosa y papel) y se registró el voltaje generado durante 45 días. Se analizaron los resultados con el modelo de superficie de respuesta y se probaron las condiciones propuestas por el modelo para incrementar la generación de voltaje.

Se seleccionaron las condiciones más contrastantes, en cuanto a la generación de voltaje, para analizar la comunidad bacteriana y asociar los grupos de bacterias con las condiciones de nutrientes. Los tratamientos seleccionados fueron T5 y T6 con lactato (LT5 y LT6) y con papel (PT5 y PT6). Se hicieron las columnas por quintuplicado y se tomaron muestras de

la zona superior, inferior y mezcla de la columna en el día 19. Se realizó la extracción de ADN y la identificación de la comunidad bacteriana por secuenciación masiva (MiniSeq de Illumina) de la región V3 del gen 16S ARNr.

También se seleccionaron dos condiciones (LT5 y PT5) para estudiar la cinética y el gradiente de condiciones en la columna de Winogradsky en un periodo de 31 días. En estas celdas se midieron parámetros fisicoquímicos y se determinó la concentración de sulfatos, sulfuros, azufre, carbohidratos totales, clorofila y biomasa.

Se logró obtener un consorcio microbiano en la columna de Winogradsky que se usó para inocular los dispositivos para la generación de voltaje. En la primera condición con una razón másica carbono/sulfato de 1.14 se generó un voltaje variable que alcanzó valores cercanos a los 200 mV.

Se obtuvieron diferentes voltajes al cambiar la fuente de carbono y la razón másica carbono/sulfato en los 9 tratamientos del diseño factorial. Al utilizar el lactato se registraron algunos picos de producción de voltaje, con un valor máximo de 286 mV; sin embargo, la generación de voltaje en el tiempo fue poco constante y no se observó un patrón al modificar la razón carbono/sulfato en los diferentes tratamientos. En contraste, al utilizar celulosa o papel como sustrato, se observó un efecto de la razón carbono/sulfato en la generación de voltaje. En el tratamiento T9 la generación de voltaje se inhibió casi por completo. En los tratamientos T1 y T7, se registró un voltaje estable cercano a los 140 mV por varios días. En el tratamiento T5 se generó un voltaje variable entre los 200 y 300 mV durante 40 días al usar celulosa y hasta 380 mV al usar papel.

El análisis de los resultados del diseño factorial se realizó con el modelo de superficie de respuesta. La gráfica de efecto de los factores mostró que el voltaje disminuye al incrementar la concentración de carbono (en forma de celulosa o papel) y el voltaje aumenta al incrementar la concentración de sulfato. Al probar las condiciones calculadas por el modelo de superficie de respuesta se obtuvo un incremento en la generación de voltaje que alcanzó 400 mV con celulosa y un máximo de 600 mV con papel.

Se comparó la comunidad bacteriana donde se favoreció la generación de voltaje (tratamiento PT5) con el resto de los tratamientos (LT5, LT6 y PT6) en los que el voltaje fue menor. En los tratamientos LT5, LT6 y PT6 se presentaron géneros anaerobios en la zona inferior y superior de la columna. En LT6 los géneros más abundantes fueron *Desulfomicrobium* y *Clostridium*. En LT5, se presentaron además otros géneros como *Chlorobaculum*, *Proteiniclasticum*, *Pelobacter*, *Mangroviflexus* y *Acidaminobacter*. En PT6, *Chlorobaculum* fue abundante en la zona superior. En cambio, en el tratamiento PT5 (condición con mayor generación de voltaje), se presentaron bacterias anaerobias en la zona inferior, y en la zona superior se presentaron bacterias facultativas (*Draconibacterium*, *Novosphingobium* y *Muricauda*) y bacterias aerobias (*Kordiimonas*, *Loktanella*, *Luteolibacter* y diatomeas).

La cinética microbiana en las columnas de sedimento permitió conocer el gradiente de condiciones de los tratamientos LT5 (con baja generación de voltaje) y PT5 (con mayor producción de voltaje). Las concentraciones del sulfato disminuyeron en la zona inferior y superior de ambos tratamientos por la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. En el tratamiento LT5 se obtuvieron condiciones reductoras (potencial redox negativo, condiciones anaerobias y alta concentración de sulfuros) a lo largo de toda la columna. En contraste, en el tratamiento PT5 se encontraron condiciones reductoras en la zona inferior y oxidantes en la zona superior. El cambio en el potencial redox implicó un cambio en el potencial de los electrodos, lo que permitió la generación de voltaje en el tratamiento PT5.

El uso de una fuente de carbono diferente y distinta razón másica carbono/sulfato en la columna de Winogradsky equipada con un circuito eléctrico generó una comunidad bacteriana diferente y un cambio en la generación de voltaje. El sulfato favoreció el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras asociadas a una condición anaerobia en la zona inferior y la celulosa (una fuente de carbono de lenta degradación) permitió el desarrollo de una comunidad aerobia en la zona superior. A partir de los resultados obtenidos en esta investigación es posible proponer un enriquecimiento adecuado para incrementar la generación de electricidad en las CCMS.

## Abstract

Sediment microbial fuel cells (SMFC) are bioelectrochemical systems that generate electricity from the chemical energy of compounds that are used by microorganisms. The voltage is generated by the potential difference between an electrode buried in the sediment and the other suspended in the water.

Some researchers have studied the microbial community present in the SMFC and have related the presence of sulfate-reducing bacteria with the power generation. These bacteria and the sulfur cycle have been studied in microbial ecology through a model called "Winogradsky column". This model consists of a cylinder with sediment and nutrient-enriched water. The Winogradsky column can be operated as a SMFC by incorporating an electrical circuit and a pair of electrodes that connect the sediment layer with the water layer.

In systems with sediment, the microbial community can change based on the availability of nutrients. Sulfate concentration in the sediment could modify the abundance of sulfate-reducing bacteria and improve voltage generation by changing the anode potential. The carbon/sulfate ratio can modify the microbial community and improve voltage generation in SMFC.

Therefore, the objective of this research was to analyze the voltage generation in the Winogradsky column from the growth of different microbial communities obtained by modifying the carbon source and the carbon/sulfate ratio of the culture medium.

Winogradsky columns enriched with sulfate and kraft paper were prepared to obtain the microbial consortium from the Tecolutla estuary sediment, in Veracruz. The developed consortium was inoculated in the systems for voltage generation with a carbon/sulfate mass ratio of 1.14. The microbial cells used consisted of cylindrical glass containers (46 mm in diameter and 120 mm high) with 2 graphite electrodes (one in the lower zone and the other in the upper zone) connected to voltage sensors and a data acquisition system with Arduino boards.

The composition of the culture medium was modified to enrich the devices and determine their effect on voltage generation. A factorial design was applied with nine treatments in triplicate with different carbon/sulfate mass ratios: 0.04 (T1), 0.14 (T2 and T4), 0.57 (T3, T5 and T7), 2.29 (T6 and T8) and 9.16 (T9). Three carbon sources (lactate, cellulose and paper) were used and the generated voltage was recorded for 45 days. The results were analyzed with the response surface model and the conditions proposed by the model to increase the voltage generation were tested.

The most contrasting conditions, in terms of voltage generation, were selected to analyze the bacterial community and associate the groups of bacteria with the nutrient conditions. The selected treatments were T5 and T6 with lactate (LT5 and LT6) and with paper (PT5 and PT6). Columns were made in quintuplicate and samples were taken from the top, bottom and mix of the column on day 19. DNA extraction and identification of the bacterial

community was performed by massive sequencing (Illumina MiniSeq) V3 region of the 16S rRNA gene.

Two conditions (LT5 and PT5) were also selected to study the kinetics and the gradient of conditions in the Winogradsky column over a period of 31 days. Physicochemical parameters were measured in these cells and the concentration of sulfates, sulfides, sulfur, total carbohydrates, chlorophyll and biomass were determined.

A microbial consortium was obtained on the Winogradsky column that was used to inoculate the devices for voltage generation. In the first condition with a carbon/sulfate mass ratio of 1.14, a variable voltage was generated that reached values close to 200 mV.

Different voltages were obtained by changing the carbon source and carbon/sulfate mass ratio in the 9 factorial design treatments. With lactate, some peaks of voltage production were recorded, with a maximum value of 286 mV; however, the voltage generation over time was not very constant and no pattern was observed when modifying the carbon/sulfate ratio in the different treatments. In contrast, when using cellulose or paper as substrate, an effect of the carbon/sulfate ratio on voltage generation was observed. In the T9 treatment the voltage generation was almost completely inhibited. In treatments T1 and T7, a stable voltage close to 140 mV was recorded for several days. In the T5 treatment, a variable voltage between 200 and 300 mV was generated for 40 days when using cellulose and up to 380 mV when using paper.

The analysis of the results of the factorial design was carried out with the response surface model. The graph of the effect of the factors showed that the voltage decreases with increasing concentration of carbon (cellulose or paper) and the voltage increases with increasing concentration of sulfate. When testing the conditions calculated by the response surface model, an increase in voltage generation was obtained, reaching 400 mV with cellulose and a maximum of 600 mV with paper.

The bacterial community where voltage generation was favored (PT5 treatment) was compared with the rest of the treatments (LT5, LT6 and PT6) in which the voltage was lower. In the LT5, LT6 and PT6 treatments, anaerobic genera were present in the lower and upper zones of the column. In LT6 the most abundant genera were *Desulfomicrobium* and *Clostridium*. In LT5, other genera such as *Chlorobaculum*, *Proteiniclasticum*, *Pelobacter*, *Mangroviflexus* and *Acidaminobacter* were also present. In PT6, *Chlorobaculum* was abundant in the upper zone. In contrast, in the PT5 treatment (condition with higher voltage generation), anaerobic bacteria were present in the lower zone, and facultative bacteria (*Draconibacterium*, *Novosphingobium* and *Muricauda*) and aerobic bacteria (*Kordiimonas*, *Loktanella*, *Luteolibacter* and diatoms) were present in the upper zone.

The microbial kinetics in the sediment columns allowed knowing the gradient of conditions of the LT5 (with low voltage generation) and PT5 (with higher voltage production) treatments. Sulfate concentrations decreased in the lower and upper zones of both treatments due to the activity of sulfate-reducing bacteria. In the LT5 treatment, reducing conditions were

obtained (negative redox potential, anaerobic conditions and high concentration of sulfides) throughout the entire column. In contrast, in the PT5 treatment, reducing conditions were found in the lower zone and oxidizing conditions in the upper zone. The change in the redox potential implied a change in the potential of the electrodes, which allowed the generation of voltage in the PT5 treatment.

The use of a different carbon source and a different carbon/sulfate mass ratio in Winogradsky column equipped with an electrical circuit generated a different bacterial community and a change in voltage generation. Sulfate favored the development of sulfate-reducing bacteria associated with an anaerobic condition in the lower zone and cellulose (a slow-degrading carbon source) allowed the development of an aerobic community in the upper zone. Based on the results obtained in this research, it is possible to propose a suitable enrichment to increase the generation of electrical energy in SMFC.

## INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles se han utilizado para generar la electricidad que impulsa la industrialización y el crecimiento económico de los países, pero no pueden sostener indefinidamente la economía mundial [1,2]. El uso de estos combustibles genera gases de efecto invernadero que contribuyen al problema del calentamiento global [2,3]. Además, es un recurso energético no renovable y su agotamiento amenaza el uso de esta fuente de energía en el futuro [2]. Por lo anterior, existe un gran interés en el empleo de las energías renovables a nivel mundial, como respuesta a la creciente demanda de energía y a la necesidad de cumplir con la protección al ambiente y contribuir con la mitigación del calentamiento global [4].

Actualmente se buscan nuevas alternativas para obtener combustibles renovables a partir de organismos. La biomasa es una fuente de energía que proviene de materia orgánica reciente que puede ser quemada o transformada en biocombustible, es decir, un combustible líquido o gaseoso. El biodiesel es un combustible que proviene de aceites vegetales o grasas animales. Estos combustibles renovables se pueden obtener a partir de residuos de agricultura y desechos generados por actividades humanas. La combustión de estos materiales renovables también involucra liberación de gases de efecto invernadero. Sin embargo, el dióxido de carbono liberado de la biomasa es parte del ciclo global del carbono y este gas será nuevamente secuestrado por los organismos autótrofos para generar biomasa [4]. Además, se han desarrollado otras tecnologías para generar electricidad como las celdas de combustible microbianas [2].

Las celdas de combustible microbianas (CCM) son sistemas bioelectroquímicos que representan un nuevo enfoque para generar electricidad a partir de la energía química de compuestos (combustible) que son utilizados por los microorganismos [1,3]. Se han utilizado diferentes sustratos [5] y se han propuesto diferentes diseños [3] para incrementar la eficiencia y la generación de electricidad en estos sistemas. Existen variantes de las CCM, estas incluyen aquellos dispositivos que tienen plantas [6,7] y las que tienen sedimento [8,9].

Las celdas de combustible microbianas de sedimento (CCMS) son dispositivos que permiten la generación de bioelectricidad por la diferencia de potencial entre un electrodo enterrado en el sedimento y el otro electrodo suspendido en el agua [8,10]. En estos dispositivos las bacterias degradan los compuestos químicos y liberan electrones y protones. Después, se produce una transferencia de carga al ánodo y los electrones viajan desde el ánodo hasta el cátodo a través de un circuito externo [9,11]. La generación de electricidad en estos dispositivos se puede prolongar por varios días [10,12]; se ha llegado a registrar un voltaje entre 200 a 350 mV hasta por 100 días [10].

Se han propuesto algunas estrategias para incrementar la generación de electricidad en estos dispositivos. La zona catódica con exposición a la luz favorece la actividad

fotosintética de algas y microalgas, lo que incrementa la oxigenación. El oxígeno es el aceptor final de electrones en el sistema y se genera un mayor voltaje [13–15]. También se han probado diferentes concentraciones de materia orgánica [10], diferentes concentraciones de celulosa, para mejorar el rendimiento de voltaje [9,11] y se han utilizado otros sustratos como el acetato [16].

Hay estudios sobre la comunidad microbiana presente en las celdas de combustible microbianas de sedimento y se ha relacionado la presencia de bacterias sulfato-reductoras con la generación de electricidad [10,17]. Las bacterias sulfato-reductoras y el ciclo del azufre se han estudiado en ecología microbiana a través de un modelo denominado “columna de Winogradsky” [18,19].

Este modelo consiste en un cilindro con sedimento y agua enriquecido con nutrientes [18–21]. La columna de Winogradsky puede ser operada como una celda de combustible microbiana de sedimento para la generación de electricidad. Esto se logra al incorporar un circuito eléctrico que conecte la capa más profunda (sedimento) con la capa superficial (agua) para medir la diferencia de potencial generada en el sistema [22]. El potencial generado en las celdas de combustible microbianas de sedimento se puede modificar en función de los nutrientes que, a su vez, cambian la composición de la comunidad microbiana [23].

La materia orgánica presente en el sedimento puede ser degradada por diferentes grupos de bacterias que se desarrollaran en función de los nutrientes disponibles. En presencia de sulfato las bacterias sulfato-reductoras serán abundantes y realizarán la degradación; por el contrario, en ausencia de este nutriente, se desarrollarán bacterias acetogénicas y metanogénicas [24]. En el caso de un reactor anaerobio, los grupos de bacterias se modifican en función de la razón lactato/sulfato. En estos reactores, una alta concentración de sulfato, respecto al lactato, induce el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras y por lo tanto la sulfurogénesis, mientras que si se utiliza una alta concentración de lactato, respecto al sulfato, se favorece la presencia de bacterias acetogénicas y metanogénicas [25].

En la columna de Winogradsky los ciclos del carbono y del azufre ocurren simultáneamente a través de comunidades microbianas que utilizan celulosa y sulfato [18,19]. La concentración de sulfato en el sedimento podría modificar la abundancia de bacterias sulfato-reductoras y con ello mejorar la generación de voltaje al cambiar el potencial de ánodo [26].

Aunque se ha estudiado el efecto de la razón carbono/sulfato en el desarrollo de una comunidad microbiana en reactores anaerobios, aún no se ha probado el efecto que puede tener la proporción de celulosa y sulfato en la generación de voltaje en las celdas de combustible microbianas de sedimento. El uso de distintas fuentes de carbono y su relación con el sulfato puede modificar el desarrollo de diferentes comunidades microbianas, cambiar el potencial de los electrodos y esto repercutir en la generación de voltaje.

# 1. ANTECEDENTES

Las bases para desarrollar este trabajo se encuentran en distintas disciplinas como la electroquímica que ha empleado dispositivos bioelectroquímicos para transformar la energía química en energía eléctrica en las denominadas celdas de combustible microbianas [27] y la ecología microbiana que ha estudiado a las comunidades microbianas y el ciclo del azufre en la columna de Winogradsky [18,19].

## 1.1 Sistemas bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos son dispositivos en los cuales intervienen microorganismos para llevar a cabo reacciones químicas en los electrodos (ánodo y/o cátodo) colocados en el sistema (Fig. 1.1). Cuando la energía libre de Gibbs de la reacción es positiva es necesario aplicar energía eléctrica para que la reacción química se lleve a cabo, con la finalidad de obtener algún producto (como hidrógeno) y a esta se le llama celda de electrólisis microbiana. En cambio, cuando la energía libre de Gibbs es negativa, la fuerza electromotriz es positiva, lo que implica la generación de electricidad a partir de compuestos químicos y a esta se le denomina celda de combustible microbiana [27].

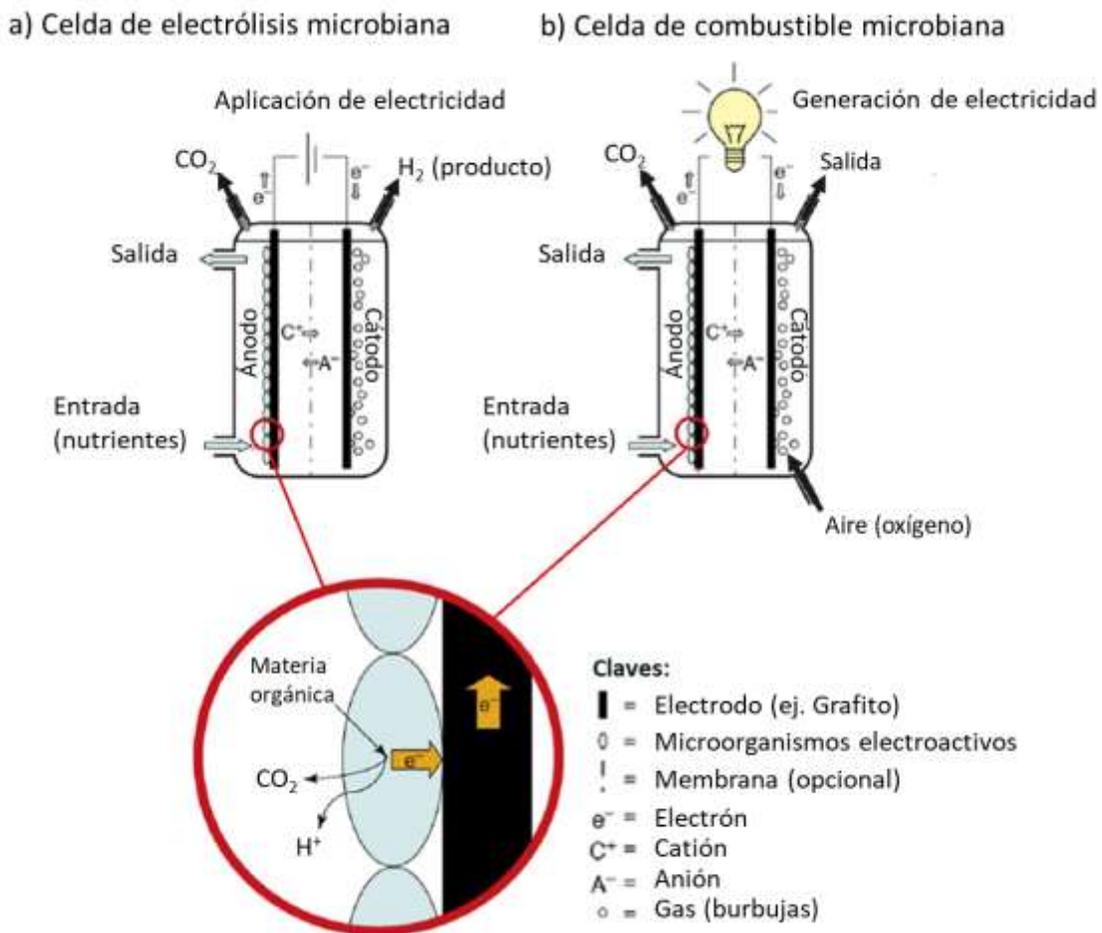
## 1.2 Celdas de combustible microbianas

Las celdas de combustible microbianas (CCM) típicas (Fig. 1.2) están compuestas por dos cámaras: la primera, anaeróbica que cuenta con un electrodo (ánodo) que recibe la transferencia de carga de los electrones, y la segunda, aeróbica donde se encuentra el cátodo y se lleva a cabo la reducción del oxígeno [1]. Este sistema permite obtener energía eléctrica proveniente de la transformación de energía química presente en los compuestos orgánicos a través del metabolismo de los microorganismos. La transferencia de carga (electrones) se realiza desde el compuesto químico al ánodo, y viaja hasta el cátodo a través de un circuito eléctrico y los protones se difunden de la cámara anódica al cátodo, generando una corriente eléctrica [28]. El mecanismo de transferencia de carga puede llevarse a cabo de forma directa o indirecta (Fig. 1.3) [27,29–31].

Se ha propuesto que algunas bacterias pueden transferir electrones fuera de la célula al ánodo de forma directa; estas bacterias reciben el nombre de bacterias exoelectrógenas [1]. Estas bacterias pueden realizar la transferencia de carga a través de proteínas de membrana involucradas en el transporte de electrones (citocromo c) que podrían transportar los electrones directamente desde la célula hasta el electrodo (Fig. 1.3 A) [1,27,29,31]. También, se ha reportado la presencia de nanocables (pili conductivo) que son proyecciones que se extienden decenas de micras fuera de la célula y tiene la capacidad de conducir electricidad al electrodo (Fig. 1.3 B) [1,27,31]. Además, se ha investigado a bacterias filamentosas, de la familia *Desulfobulbaceae*, que al estar unidas forman un cable

de pocos centímetros y que tiene la capacidad de conducir electrones y podrían transferirlos al electrodo [32,33]. Los microorganismos que pueden donar electrones a un electrodo o aceptar electrones del electrodo reciben el nombre de microorganismos electroactivos [27].

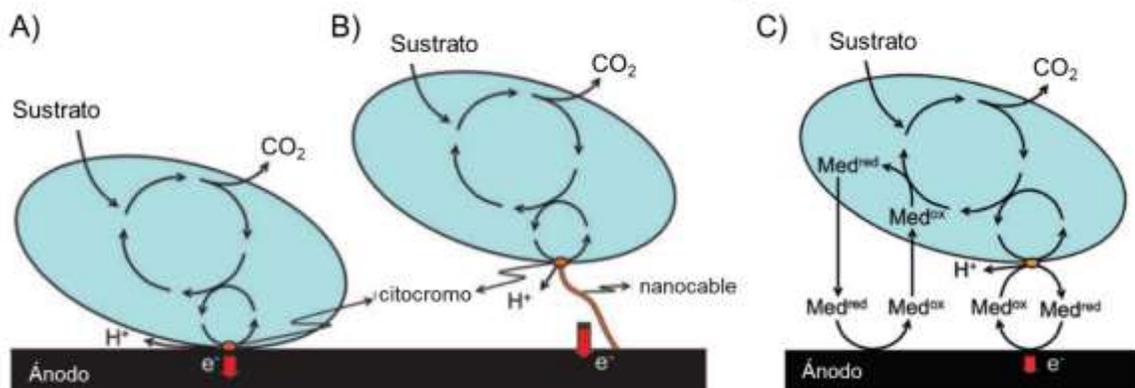
La transferencia de carga al electrodo de forma indirecta es a través de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos presentes de forma natural o producto del metabolismo microbiano, como quinonas, fenazinas, fenoxacinas, sulfuro, entre otros [27,29–31]. Estos compuestos son especies redox mediadoras que actúan como un aceptor de electrones reversible y transfirieren electrones de la bacteria al ánodo (Fig. 1.3 C); por lo tanto, una molécula puede servir para miles de ciclos redox [31].



**Figura 1.1.** Estructura general de los sistemas bioelectroquímicos: a) Celda de electrólisis microbiana (MEC) y b) Celda de combustible microbiana (CCM). En la MEC se genera un producto a partir de los nutrientes y la aplicación de energía eléctrica. En la CCM se genera energía eléctrica a partir de los nutrientes (combustible). Modificado de Rozendal *et al.* [27].



**Figura 1.2.** Celda de combustible microbiana (CCM) y sus elementos: cámara anódica (anaeróbica) con su electrodo (ánodo), cámara catódica (aeróbica) con su electrodo (cátodo), membrana, oxigenación (natural o artificial) y multímetro. Modificado de Logan [1].



**Figura 1.3.** Mecanismo de transferencia de carga al ánodo de forma directa: A) por medio del citocromo, B) por medio de nanocable; y de forma indirecta: C) a través de mediadores redox. Modificado de Schröder [31].

El voltaje generado en las celdas de combustible microbianas es difícil de predecir porque existen procesos biológicos de las bacterias que son variables como la colonización del electrodo, distinta velocidad de crecimiento y la generación de diferentes potenciales en función de los nutrientes disponibles. Sin embargo, es posible calcular los límites máximos de voltaje analizando las relaciones termodinámicas de los donadores de electrones (sustratos) y los aceptores de electrones [1].

La ecuación de Nernst (ecuación 1.1) permite calcular el potencial considerando los reactivos y productos del proceso redox (óxido-reducción),

$$E_{emf} = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[productos]^p}{[reactivos]^r} \quad (\text{ec. 1.1})$$

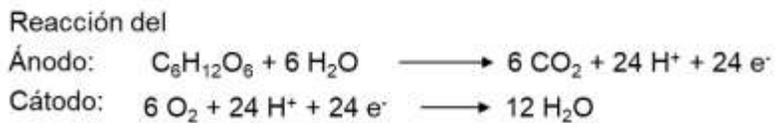
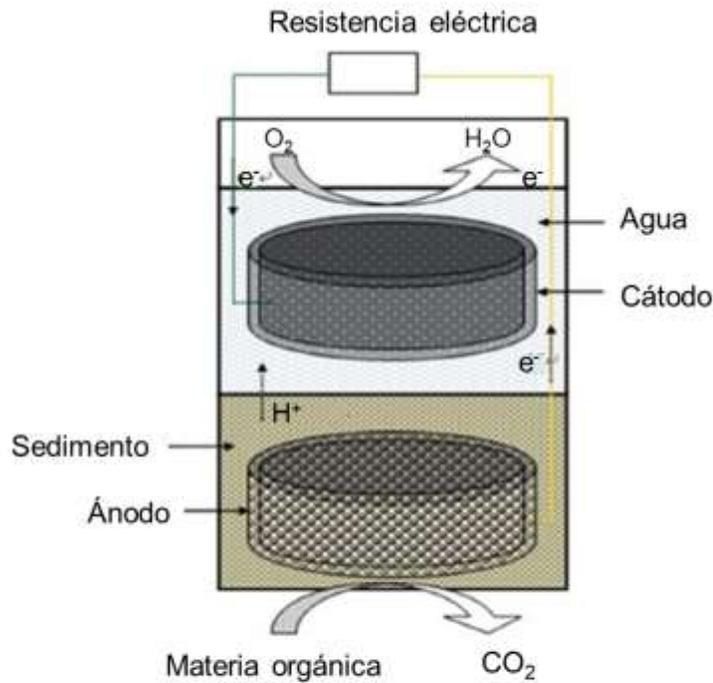
donde:  $E^{\circ}$  es el potencial de la reacción redox,  $R$  la constante de gases (8.31447 J/molK),  $T$  es temperatura absoluta (K),  $n$  es el número de electrones,  $F$  es la constante de Faraday (96,485 C/mol), y el cociente de las actividades de los productos divididas por los reactivos elevados a sus respectivos coeficientes estequiométricos [1,34].

El potencial total de la celda ( $E_{emf}$ ) es la diferencia de los potenciales del cátodo ( $E^{\circ}_{cátodo}$ ) y el ánodo ( $E^{\circ}_{ánodo}$ ) (ecuación 1.2):

$$E_{emf} = E^{\circ}_{cátodo} - E^{\circ}_{ánodo} \quad (\text{ec. 1.2})$$

Se han diseñado distintas celdas de combustible microbianas modificando la configuración de la celda y la geometría. Una modificación importante de estos dispositivos consiste en que el cátodo esté expuesto al aire obteniendo así una celda con una cámara [3]. También se han probado diferentes materiales para los electrodos, tamaño de electrodos y la proporción ánodo y cátodo [1,29]. Se ha analizado el efecto del uso de membrana para el paso de protones. Se han utilizado cultivos puros de distintos microorganismos y consorcios microbianos [35]. Se han probado diferentes sustratos, desde los más simples como acetato, alcoholes, monosacáridos, hasta los más complejos que incluyen celulosa y lixiviados [5]. La modificación de estas características ha dado como resultado la propuesta de diversos dispositivos, con distintas eficiencias en la generación de electricidad en las celdas microbianas.

Una variante de las celdas de combustible microbianas son las celdas de combustible microbianas de sedimento (CCMS). Estas tienen sedimento con agua intersticial en la zona inferior y agua en la zona superior. Generalmente son celdas cilíndricas con el ánodo enterrado en el sedimento y el cátodo sumergido en el agua (Fig. 1.4) [8,10]. Si se incorpora un circuito eléctrico con dos electrodos en la columna de Winogradsky se obtiene una celda de combustible microbiana de sedimento. Este circuito permite medir la diferencia de potencial generado entre las capas más profundas y superficiales del sistema [22].



**Figura 1.4.** Celda de combustible microbiana de sedimento. El ánodo se encuentra enterrado en el sedimento y el cátodo sumergido en el agua conectados por un circuito externo para el paso de electrones. Modificado de Zhu *et al.* [8].

En este tipo de celdas la generación de electricidad se puede prolongar por varios días, semanas e incluso meses [10,12]. Se ha registrado un voltaje entre 200 a 350 mV durante 100 días dependiente de la carga de materia orgánica en el sedimento y de la comunidad microbiana [10]. Algunas celdas de combustible microbianas de sedimento (CCMS) requieren de luz y la generación de electricidad depende de este factor cuando la comunidad del cátodo es fototrófica como es el caso de las microalgas y cianobacterias, o cuando tienen algas en lugar de un sistema de aireación [13,15].

En las celdas de combustible microbianas de sedimento se ha utilizado la celulosa como donador de electrones [9]. Con este sustrato se han obtenido resultados muy contrastantes; Zhu *et al.* [8] reportaron una generación de un voltaje menor a 45 mV en una celda operada durante 350 días. En cambio, Sajana *et al.* [11] registraron hasta 975 mV en una celda monitoreada por 45 días. La degradación de la celulosa es un proceso complejo realizado

por la enzima celulasa (que tiene tres componentes: exoglucanasas, endoglucanasas y celobiasa). Esta genera productos tales como: acetato, propionato, butirato que son utilizados por los microorganismos hasta su degradación completa [11]. Por lo anterior, la degradación de la celulosa es relativamente lenta, lo que permite que la producción de electricidad se prolongue por varios días [8]. También se ha utilizado al acetato como donador de electrones en una celda de combustible microbiana de sedimento que ha generado un voltaje máximo de 300 mV [16].

Existe además otra variante de las celdas que aprovecha las condiciones presentes en ambientes naturales. Estas celdas reciben el nombre de celdas de combustible microbianas bénticas (CCMB) [36]. En ellas se genera un gradiente de condiciones entre el sedimento del fondo marino y el agua, similar al que se forma en las celdas de combustible microbianas de sedimento [36,37]. Se ha propuesto utilizar estas celdas bénticas (CCMB) instaladas en los sedimentos naturales para proporcionar energía a sensores y dispositivos que permitan realizar un monitoreo ambiental en sitios remotos [38].

A pesar de que se han probado distintos sustratos y condiciones, aún se desconoce el efecto de muchos factores en la generación de bioelectricidad. Pocos trabajos han realizado una optimización de factores para incrementar la generación de voltaje de forma estadística. En una celda de combustible microbiana se evaluó el efecto de los factores y se modificó la composición del medio de cultivo al cambiar la concentración de glucosa, cloruro de potasio y bicarbonato de sodio. A través del método de superficie de respuesta se logró un incremento de voltaje de 684 mV a 738 mV al utilizar 8.5 g/L de glucosa, 0.8 g/L de KCl y 0.2 g/L  $\text{NaHCO}_3$  [39]. Además, se incrementó la generación de voltaje en un 17 % (hasta 861 mV) al cambiar las condiciones de operación que incluyeron la temperatura, el pH y la concentración de sal en el electrolito entre el ánodo y el cátodo de la celda [40]. De esta manera, se ha demostrado que la manipulación de los factores involucrados en las celdas microbianas pueden tener influencia en la generación de electricidad.

### **1.3 Comunidades bacterianas en celdas de combustible microbianas**

Se ha estudiado la comunidad de microorganismos en distintos sistemas, así como la modificación de su composición a partir del cambio de nutrientes y materiales con los que se construyen los dispositivos. Estos sistemas incluyen las celdas de combustible microbianas y las celdas de combustible microbianas de sedimento.

En las celdas de combustible microbianas, la comunidad microbiana se ha modificado a partir de la fuente de carbono [41,42]. Al utilizar lactato y glucosa como fuente de carbono se desarrollaron los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en diferentes porcentajes y se presentaron otros grupos según la fuente utilizada. La clase *Betaproteobacteria* fue más abundante con glucosa, mientras que las clases *Gammaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria* fueron más abundantes con lactato. Con ambas fuentes de carbono se desarrolló la clase *Deltaproteobacteria*, a la que pertenecen

las bacterias reductoras del sulfato, las cuales contribuyen con la generación de electricidad [41]. El uso de glucosa, acetato y el líquido del lodo anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales, promovieron el desarrollo de diferentes comunidades bacterianas con algunos géneros con actividad electroquímica como *Geobacter*, *Clostridium* y *Pseudomonas* [42].

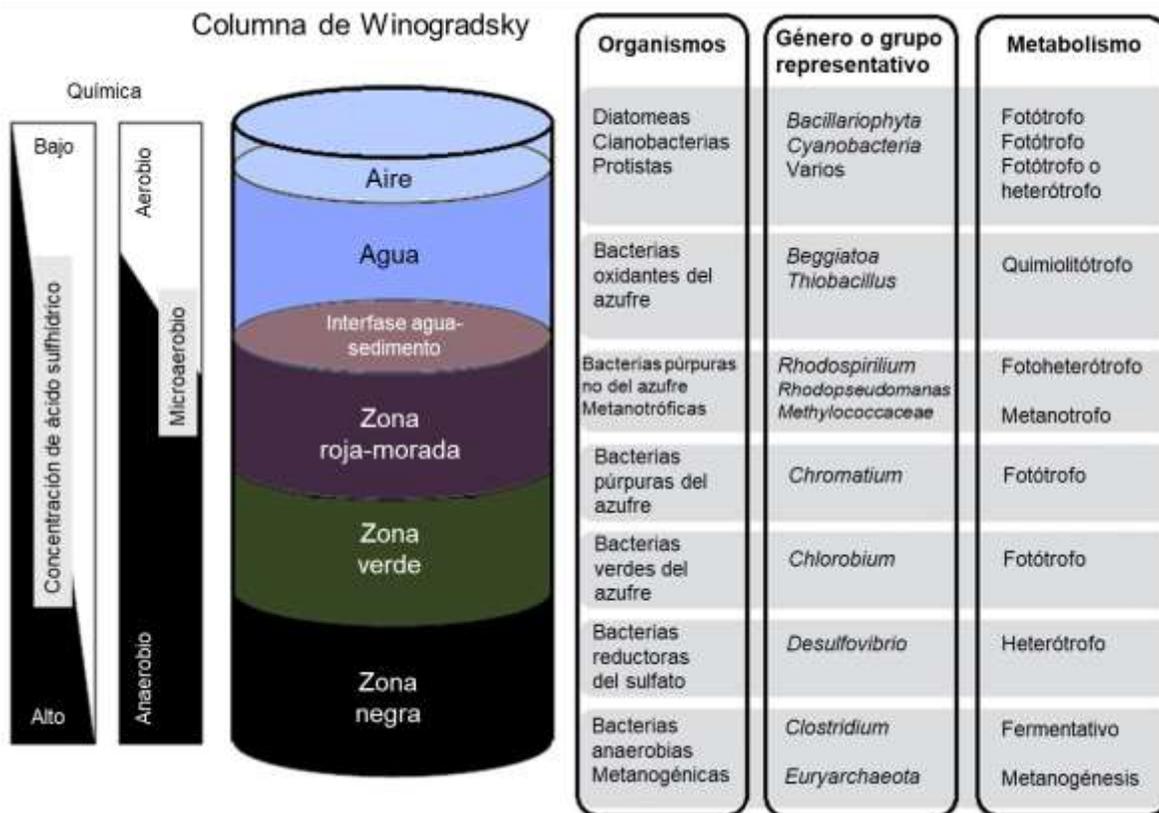
La comunidad bacteriana proveniente de muestras de sedimento ambiental puede modificarse en función del material del ánodo en la celda de combustible microbiana de sedimento. Al utilizar grafito como electrodo el phylum dominante registrado fue *Proteobacteria* (86 %) y al utilizar magnesio como ánodo, los phyla dominantes fueron *Proteobacteria* (56 %) y *Firmicutes* (35 %). La comunidad fue más diversa al utilizar magnesio, con los grupos *Deltaproteobacteria* (35%), *Bacilli* (19%), *Clostridia* (15 %) y *Gammaproteobacteria* (11 %). Con este tipo de electrodo y esta comunidad se registraron voltajes entre 1.8 a 2.3 V, mientras que con grafito el voltaje registrado fue de 0.6 a 0.8 V [17].

Un grupo de principal interés son las comunidades de bacterias con metabolismo relacionado al azufre. Estas bacterias desempeñan funciones importantes en el ciclo biogeoquímico del azufre y han sido usadas para la generación de voltaje en celdas de combustible microbianas [30]. Las bacterias sulfato-reductoras reducen el sulfato a sulfuro, este último es un mediador redox eficiente para el ánodo porque puede donar electrones [43] y es capaz de cambiar el potencial anódico [26,41]. En celdas de combustible microbianas de sedimento también se ha estudiado la composición de la comunidad bacteriana del ánodo y se ha relacionado el incremento de la generación de electricidad con el aumento de las bacterias sulfato-reductoras [10]. Además se ha reportado la presencia de la familia *Desulfobulbaceae* en la superficie del ánodo y altas concentraciones de sulfuro en celdas de combustible microbianas de sedimento con generación de electricidad [44]. En este tipo de celdas, también se presentó el mayor porcentaje de *Deltaproteobacteria* (76%) y un alto porcentaje de bacterias reductoras de sulfato, azufre y hierro [6].

Algunos grupos de bacterias presentes en las celdas de combustible microbianas y que son responsables de la generación de electricidad también se pueden encontrar en las columnas de Winogradsky. Anteriormente se mencionó que la columna de Winogradsky puede ser operada como un sistema bioelectroquímico al incorporar electrodos y un circuito eléctrico.

## 1.4 Columna de Winogradsky

La columna de Winogradsky fue desarrollada por el microbiólogo ruso Sergei Winogradsky (1856-1953), considerado fundador de la microbiología moderna y de la ecología microbiana [18,19]. La columna de Winogradsky constituye un modelo para el estudio de las comunidades microbianas y el ciclo del azufre. Este sistema consiste en un recipiente cilíndrico cerrado con sedimento y agua expuesto a la luz y enriquecido con nutrientes. Generalmente el enriquecimiento consiste en una fuente de sulfato (sulfato de magnesio o sulfato de calcio), una fuente de celulosa (papel o restos vegetales) y una fuente de carbono inorgánico (carbonato de calcio o bicarbonato de sodio). Estos compuestos se agregan de 0.7 a 3.5 % con respecto al peso del sedimento y la columna se incubaba por varios días con luz [18,19,21]. En este sistema se favorece el desarrollo de diferentes comunidades microbianas, incluyendo los microorganismos fototróficos y con el tiempo se genera un gradiente vertical de condiciones que incluyen la concentración de oxígeno, sulfuro de hidrógeno, pH y potencial redox (Fig. 1.5).



**Figura 1.5.** Columna de Winogradsky. El esquema muestra el gradiente de condiciones que se generan (concentración de oxígeno, ácido sulfhídrico y potencial redox), los grupos de microorganismos y su metabolismo. Modificado de Rogan *et al.* [18].

En el sedimento de la columna se generan condiciones anaerobias que favorecen la presencia de bacterias hidrolíticas, fermentativas, acetogénicas, metanogénicas, sulfato-reductoras y fototróficas del azufre [19]; considerando la presencia de estos grupos de bacterias en la columna de Winogradsky se pueden presentar diversas reacciones metabólicas como las que se presentan en la Tabla 1.1. Algunas bacterias del género *Clostridium* son capaces de hidrolizar la celulosa a través de enzimas celulasas que generan carbohidratos (Tabla 1.1; ec. 1). A partir de los carbohidratos se generan otros compuestos más simples como resultado de la fermentación alcohólica, láctica y propiónica (Tabla 1.1; ec. 2, 3 y 4, respectivamente) y la acetogénesis (Tabla 1.1; ec. 5) [11,45,46]. Las bacterias metanogénicas forman metano a partir de dos rutas. En la acetoclástica usan el acetato como fuente de carbono (Tabla 1.1; ec. 6) y en la hidrogenotrófica utilizan hidrógeno y dióxido de carbono (Tabla 1.1; ec. 7) [45]. Las bacterias sulfato-reductoras reducen el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) (Tabla 1.1; ec. 8, 9 y 10), lo que oscurece el sedimento y se presenta una acumulación de sulfuro de hidrógeno. Este compuesto sube en la columna y es oxidado a azufre o hasta sulfato por bacterias fototróficas verdes y púrpuras del azufre (Tabla 1.1; ec. 11 y 12) [19]. La coloración del sedimento se modifica en función de los pigmentos resultantes del crecimiento abundante de estos grupos de microorganismos. Arriba de esta zona, se encuentran condiciones microaerobias con microorganismos facultativos. En la capa superior, predomina una zona aerobia con bacterias oxidantes del azufre como *Thiobacillus* (Tabla 1.1; ec. 13), bacterias heterotróficas que realizan respiración aeróbica (Tabla 1.1; ec. 14) y microorganismos que realizan fotosíntesis oxigénica, como microalgas y cianobacterias (Tabla 1.1; ec. 15) [18–20].

La riqueza de especies en una columna de Winogradsky es muy grande. Existe una alta diversidad que puede estar representada por 12 a 30 phyla y 102 a 323 géneros [19], incluso se han registrado hasta 64 phyla y 822 géneros [47]. Debido al gradiente de condiciones es posible identificar microorganismos de comunidades que son utilizados como bioindicadores en función de la profundidad de la columna [19,20].

La clase *Alphaproteobacteria* es abundante en la zona superior de la columna y decrece su abundancia al incrementar la profundidad [19]. El orden *Sphingomonadales* (clase: *Alphaproteobacteria*) es abundante en el agua de la zona superior de la columna [20]. Las clases *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* son abundantes en la zona superior pero también se encuentran en zonas más profundas. El phylum *Cyanobacteria* es otro bioindicador de la zona superior de la columna [19], junto con otros microorganismos fototróficos como diatomeas (*Naviculales*), algas verdes (*Oscillatoriales*) y algas cafés (*Fucales*), aunque estas también se han encontrado en la zona intermedia de la columna [20].

**Tabla 1.1.** Ecuaciones de reacción de la diversidad metabólica presente en la columna de Winogradsky.

Proceso	Ecuación de reacción	Ec. Num.
Hidrólisis	$(C_6H_{12}O_6)_n + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + (C_6H_{12}O_6)_{n-1}$	1
Fermentación	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$	2
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH(OH)COOH$	3
	$3 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4 CH_3CH_2COOH + 2 CH_3COOH + 2 CO_2 + 2 H_2O$	4
Acetogénesis	$2 CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2O$	5
Metanogénesis	$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	6
	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	7
	$2 CH_3CH(OH)COO^- + 3 SO_4^{2-} \rightarrow 6 HCO_3^- + 3 HS^- + H^+$	8
Sulfato-reducción	$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + 3 H^+ \rightarrow 2 CO_2 + H_2S + 2 H_2O$	9
	$4 H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4 H_2O$	10
Fototróficas del azufre (fotosíntesis anoxigénica)	$12 H_2S + 6 CO_2 + luz \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 12 S^0 + 6 H_2O$	11
	$3 H_2S + 6 CO_2 + 6 H_2O + luz \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 3 SO_4^{2-} + 6 H^+$	12
Oxidantes del azufre	$2 H_2S + O_2 \rightarrow 2 S^0 + 2 H_2O$	13
Respiración aeróbica	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$	14
Fototróficas (fotosíntesis oxigénica)	$6 H_2O + 6 CO_2 + luz \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2$	15

Las ecuaciones de reacción se tomaron y modificaron de diversas referencias [24,25,45,48] tomando en cuenta los grupos de bacterias presentes en la columna de Winogradsky [19,20].

La clase *Clostridia* y orden *Clostridiales* son los grupos dominantes del phylum *Firmicutes* y son bioindicadores de zonas más profundas, su abundancia incrementa con la profundidad. Algunas bacterias participan en el ciclo del azufre y su presencia en la columna de Winogradsky indica que se está llevando a cabo este ciclo, tales como la familia *Peptococcaceae* del phylum *Firmicutes*, que son reductores del azufre. Las familias *Desulfobulbaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteraceae* de la clase *Deltaproteobacteria* son bacterias reductoras del sulfato. Las bacterias fototróficas del azufre de las familias *Chlorobiaceae*, *Ignavibacteriaceae* y *Sinobacteraceae* oxidan el sulfato y el azufre [19]. Las bacterias sulfato-reductoras y fototróficas del azufre también son consideradas como bioindicadores de zonas medias e inferiores de la columna por su metabolismo anaerobio [20]. Las bacterias quimolitotróficas nitrógeno-oxidantes e hidrógeno-oxidantes se encuentran en la zona media e inferior de la columna [20].

Existe dominancia de algunos grupos de bacterias por lo que es común encontrar pocas especies muy abundantes y muchas especies raras [19]. A pesar de que se han encontrado

hasta 64 phyla, solo 11 de ellos constituyen el 90% del total de la comunidad; y de los 822 géneros, sólo 81 son abundantes en la columna [47].

También se ha estudiado el cambio de la estructura de la comunidad microbiana en la columna de Winogradsky a través del tiempo. Algunos géneros de *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae* y *Planctomycetes* incrementan en abundancia con el tiempo, mientras que miembros de *Proteobacteria* decrecen [47].

Las especies presentes en este tipo de sistemas pueden tener un gran potencial en la búsqueda de energías renovables como la generación de biocombustibles y bioelectricidad [49].

La diversidad de este sistema se puede estudiar a través de índices propuestos en ecología para el estudio de comunidades. En el ambiente se encuentra un número variable de comunidades que no están delimitadas en un entorno homogéneo y se han desarrollado métodos para medir la diversidad con relación a la estructura de parámetros ambientales [50].

Tal es el caso de la diversidad alfa, que considera la riqueza de especies y la estructura de la comunidad. La riqueza de especies toma en cuenta el número de especies distintas en el sistema. La estructura de la comunidad se refiere a la abundancia de las distintas especies. Cuando una o pocas especies presentan muchos individuos se dice que la dominancia es alta, mientras que si muchas especies están representadas por un número similar de individuos se dice que la uniformidad o equidad de la comunidad es alta. Existen diferentes índices que indican la riqueza de especies, la dominancia y la equidad.

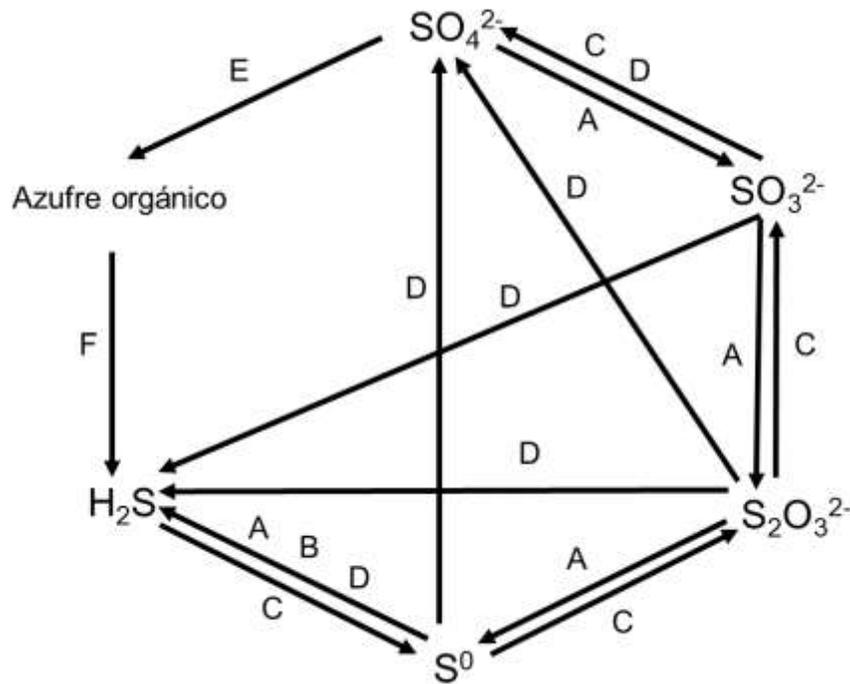
La diversidad beta mide el grado de cambio de especies entre diferentes comunidades en un gradiente de condiciones ambientales. Existen índices cualitativos que consideran la presencia o ausencia de las especies entre un sitio y otro. También hay índices cuantitativos que consideran la abundancia de cada especie entre un sitio y otro [50].

## 1.5 Bacterias que participan en el ciclo biogeoquímico del azufre

Las bacterias que participan en el ciclo del azufre pertenecen a varios grupos y son capaces de oxidar o reducir diferentes compuestos de este elemento que incluyen, desde la forma más oxidada (el sulfato), hasta la forma más reducida (el sulfuro) [24,30]. La figura 1.6 resume los diferentes pasos en el ciclo del azufre con la oxidación y reducción de los compuestos. Las bacterias sulfato-reductoras utilizan el sulfato como aceptor final de electrones en su proceso de respiración generando sulfuro de hidrógeno [24]. En este proceso el sulfato entra a la célula y participan una serie de enzimas que reducen el sulfato en varios pasos (Fig. 1.6 A) [51]. Algunas bacterias sulfato-reductoras son: *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* [30]. El azufre puede ser reducido (Fig. 1.6 B) por *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Desulfuromusa*, *Geobacter*, *Sulfurospirillum*, *Nautilia*, entre otros.

El sulfuro puede ser oxidado aeróbicamente por bacterias quimiolitotróficas como *Thiobacillus*, *Beggiatoa* y *Sulfolobus*; o puede ser oxidado anaeróbicamente por bacterias fototróficas del azufre como *Chlorobium*, *Chromatium* y *Ectothiorhodospira* [24,30]. La oxidación del sulfuro puede ser completa hasta sulfato o incompleta hasta azufre (Fig. 1.6 C). Además, se presenta la desproporción (Fig. 1.6 D), que consiste en una fermentación inorgánica en la que los compuestos de azufre con un estado de oxidación intermedio sirven como donantes y aceptores de electrones que se aprovechan en diferentes procesos celulares y es realizada por *Desulfobulbus*, *Desulfocapsa*, entre otros [30].

Existen otros procesos que incluyen los procesos asimilativos (Fig. 1.6 E), en los que el sulfato es incorporado como grupo tiol (-SH) para formar enlaces en las proteínas. La desulfurilación (Fig. 1.6 F) que es el proceso por el cual se descompone este enlace tiol, es realizado por *Methylophaga*, *Roseobacter*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio* y *Alcaligenes* [24,30]. En las columnas de Winogradsky muchos de estos organismos están presentes y llevan a cabo los procesos metabólicos para completar el ciclo del azufre [18–20].



**Figura 1.6.** Transformación de los compuestos en el ciclo del azufre. A) Sulfato-reducción, B) Reducción del azufre, C) Oxidación del azufre, D) Desproporción, E) Asimilación del sulfato y F) Desulfurilación. Modificado de Liang *et al.* [30].



## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una gran cantidad de estudios relacionados con sistemas bioelectroquímicos utilizados para la generación de electricidad, como fue previamente mencionado. A pesar de lo anterior, aún es necesario buscar estrategias para incrementar la generación de electricidad al utilizar las celdas microbianas. Una alternativa poco explorada es el uso de la columna de Winogradsky como celda de combustible microbiana de sedimento, así como el efecto que tiene la modificación de la fuente de carbono y la proporción carbono y sulfato con la generación de voltaje. La razón másica carbono/sulfato puede modificar la composición de la comunidad bacteriana que se establece en el dispositivo y esto puede incrementar la abundancia de ciertos grupos, como las bacterias sulfato-reductoras que se han asociado a la generación de voltaje. Así, el cambio en la composición microbiana puede producir una modificación en el potencial anódico e incrementar la generación de voltaje. En este trabajo se propone probar el efecto de diferentes fuentes de carbono y distintas relaciones carbono/sulfato con la finalidad de incrementar la generación de voltaje y profundizar en el conocimiento de las características que debe tener la comunidad bacteriana que permita favorecer la diferencia de potencial en columnas de Winogradsky utilizadas como celdas de combustible microbianas de sedimento.

### **2.1 Pregunta de investigación**

¿Será posible incrementar la generación de voltaje en un sistema bioelectroquímico, basado en la columna de Winogradsky, al cambiar el potencial de los electrodos con diferentes comunidades microbianas obtenidas a partir de diferentes fuentes de carbono y distintas proporciones de carbono y sulfato?

### **2.2 Hipótesis**

Al modificar las fuentes de carbono y la razón carbono/sulfato en una columna de Winogradsky equipada con un circuito eléctrico se modificará la comunidad bacteriana, el potencial de los electrodos y se incrementará la generación de voltaje en el dispositivo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

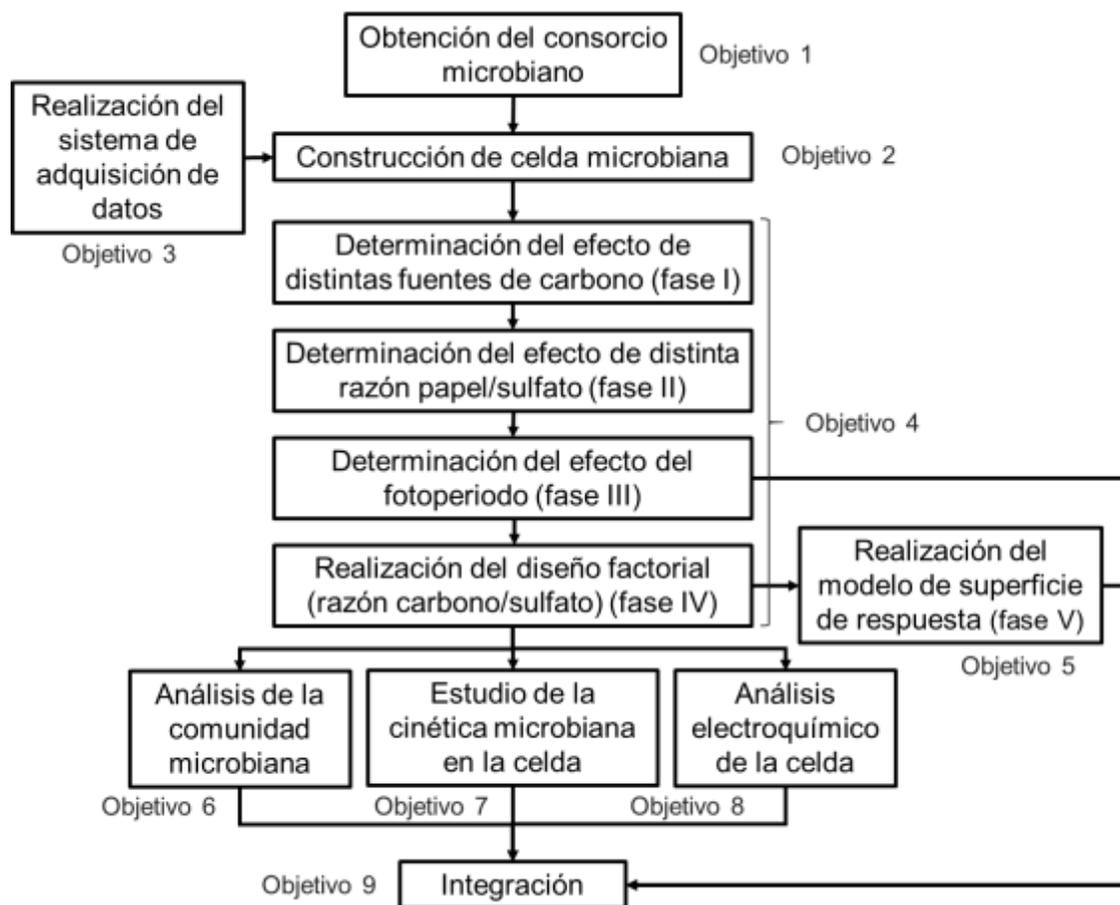
Analizar la generación de voltaje en la columna de Winogradsky equipada con un circuito eléctrico a partir del crecimiento de diferentes comunidades microbianas obtenidas al modificar la fuente de carbono y la razón másica carbono/sulfato del medio de cultivo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Obtener el consorcio microbiano a través del cultivo de sedimento ambiental en columnas de Winogradsky y probar su capacidad para generar voltaje en la celda microbiana.
2. Diseñar una celda microbiana tomando como modelo la columna de Winogradsky para generar voltaje utilizando distintas comunidades microbianas a partir de diferentes fuentes y concentraciones de carbono.
3. Implementar un sistema de adquisición de datos con la plataforma y dispositivos Arduino para el monitoreo del voltaje en la celda microbiana.
4. Determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono, diferentes relaciones carbono/sulfato y el efecto de la luz para incrementar la generación de voltaje.
5. Obtener las condiciones de enriquecimiento más adecuadas a través de un modelo de superficie de respuesta y comprobar la generación de voltaje en las celdas bajo esas condiciones.
6. Identificar la comunidad bacteriana, a través de secuenciación masiva, en la zona anódica y catódica de las celdas microbianas; para relacionar la presencia y abundancia de grupos taxonómicos con la generación de voltaje.
7. Analizar la dinámica en la celda microbiana a través del consumo de sulfato y la generación de sulfuros, azufre, biomasa y clorofila para relacionar los procesos microbianos con la generación de voltaje.
8. Realizar la determinación electroquímica del potencial de los electrodos y la voltamperometría cíclica en la celda microbiana con sedimento.
9. Integrar la información de los procesos predominantes en la celda microbiana propuesta que podrían explicar la generación de voltaje.

## 4. MATERIALES Y MÉTODO

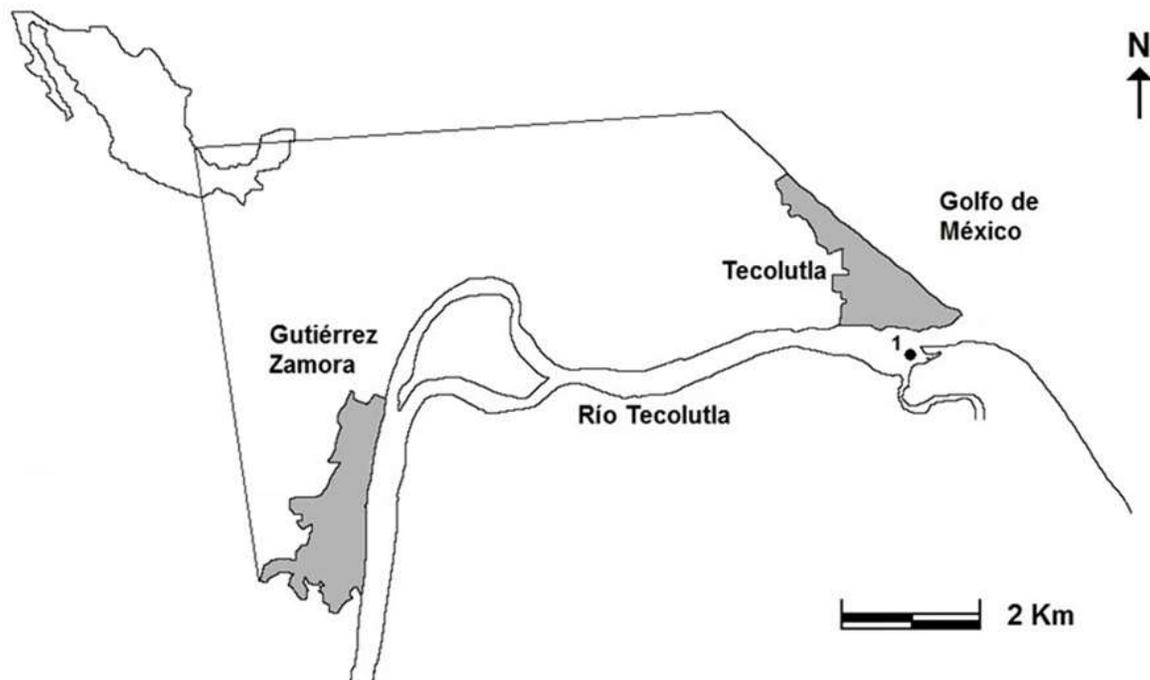
El diagrama experimental (Fig. 4.1) muestra las actividades que se realizaron para cumplir con cada uno de los objetivos específicos. Los elementos globales del método en este trabajo de investigación incluyen el desarrollo del consorcio microbiano en columnas de Winogradsky a partir de muestras de sedimento ambientales. El diseño de la celda microbiana de sedimento y el desarrollo del sistema de adquisición de datos para registrar el voltaje, temperatura e iluminancia. La elaboración de celdas microbianas de sedimento con distinto enriquecimiento (fuente de carbono, razón másica carbono/sulfato) y distinto fotoperiodo. Con los resultados obtenidos se seleccionaron algunas condiciones para identificar la comunidad bacteriana en la zona inferior y superior de la celda microbiana. También se realizó la cinética microbiana de dos condiciones para relacionar la dinámica de la columna de sedimento con la generación de voltaje. Se determinó el potencial de los electrodos y la voltamperometría cíclica de la zona superior de la celda microbiana. Por último, se integró toda la información para identificar las condiciones que favorecen la generación de voltaje en las columnas de sedimento.



**Figura 4.1.** Diagrama experimental global que relaciona las actividades con los objetivos específicos.

#### 4.1 Análisis de las muestras de sedimento

Las muestras de sedimento se obtuvieron del estuario de Tecolutla, Veracruz México. Se seleccionó el sedimento lodoso de la zona del río, ubicada en las coordenadas  $20^{\circ}28'15.10''$  N y  $97^{\circ}00'21.88''$  O, cerca de la desembocadura del río (Fig. 4.2). En esta zona se presenta una concentración de sulfato y condiciones que pueden favorecer la presencia de bacterias sulfato-reductoras [53]. Se utilizó una draga tipo Ekman para tomar una muestra de aproximadamente 18 kg que permitiera caracterizar el sedimento, obtener el consorcio microbiano y montar las celdas microbianas para la generación de voltaje.



**Figura 4.2.** Sitio de colecta de muestras de sedimento en Tecolutla, Ver.

Se realizó un análisis granulométrico del sedimento por el método de pipeta [54,55]. La cantidad de partículas finas (limos y arcillas) se determina por la velocidad de sedimentación con base en la Ley de Stokes [54]. Se tomaron 5 muestras de sedimento de 15 g aproximadamente, cada muestra se colocó en un vaso de precipitado y se agregó peróxido de hidrógeno al 30 % (Fermont) para oxidar la materia orgánica. Posteriormente se tamizó la muestra utilizando el tamiz de malla 4  $\emptyset$  (0.0625 mm). La fracción que no pasa por la malla se recuperó en una caja Petri, se secó y pesó para obtener la fracción gruesa. La fracción que pasó por la malla se recuperó en una probeta de 1000 mL se adicionó 0.5 g

de hexametáfosfato de sodio (J.T. Baker) y se agitó por 2 minutos. Después de agitar, se contaron 20 segundos, se tomaron 25 mL con una pipeta volumétrica y se colocaron en una caja Petri. La caja con la muestra se secó y pesó para obtener el peso del sedimento presente en esa muestra. Después de una hora se tomaron otros 25 mL de muestra con la pipeta volumétrica, se colocaron en una caja Petri que se secó y pesó. Se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de fracción gruesa, limo y arcilla [54,55]. El sedimento se clasificó según el triángulo de nomenclatura de Trefethen [56].

El contenido de agua del sedimento se evaluó mediante la pérdida de peso. Se calculó la diferencia de peso del sedimento húmedo y seco para expresar el porcentaje de humedad [55]. El contenido de materia orgánica y carbonatos se determinaron por el método de pérdida de peso por ignición. Se tomaron 5 muestras de sedimento de 12 g aproximadamente y se secaron en un horno a 60 °C. Las muestras se pulverizaron en un mortero y se colocaron 2 g de sedimento seco en crisoles de porcelana a peso constante; cada muestra se trabajó por duplicado. Los crisoles se colocaron en una mufla a 550 °C durante 1 h y se colocaron en un desecador. Posteriormente, se pesaron y se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de materia orgánica. Para determinar el contenido de carbonatos, los crisoles se colocaron nuevamente en la mufla a 950 °C por 1 h y se colocaron en el desecador. También se pesaron y se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de carbono inorgánico [54,55].

La concentración de carbohidratos totales en el sedimento se evaluó mediante el método de fenol-ácido sulfúrico [57]. La concentración de sulfato en el agua intersticial del sedimento se evaluó mediante un método turbidimétrico [58]. Estas técnicas se describen más adelante en la sección: "Cinética en la columna de Winogradsky".

## **4.2 Obtención del consorcio microbiano en columnas de Winogradsky**

El consorcio microbiano se obtuvo a partir de la columna de Winogradsky montada con la muestra de sedimento proveniente de Tecolutla. Se elaboraron 3 columnas en tubos de 22 mm de diámetro y 170 mm de largo enriquecidas con un medio de cultivo con sulfato de magnesio (1 % peso), papel kraft (1 %) y carbonato de calcio (1 %) en agua destilada; la relación sedimento:medio de cultivo fue 2:1. Estas columnas se incubaron por 50 días a temperatura ambiente y con exposición a luz constante (tubo LED horizontal, temperatura de color de 6500 K) a una distancia de 20 cm. La iluminancia fue medida con un luxómetro (Smart sensor, AS803) y tuvo un valor de  $1775 \pm 225$  lux. Una vez desarrollado el consorcio, se agitó el tubo y se sembró en los sistemas para la generación de voltaje, en los cuales se midió la diferencia de potencial entre las capas más profundas y las superficiales de la columna de sedimento [22].

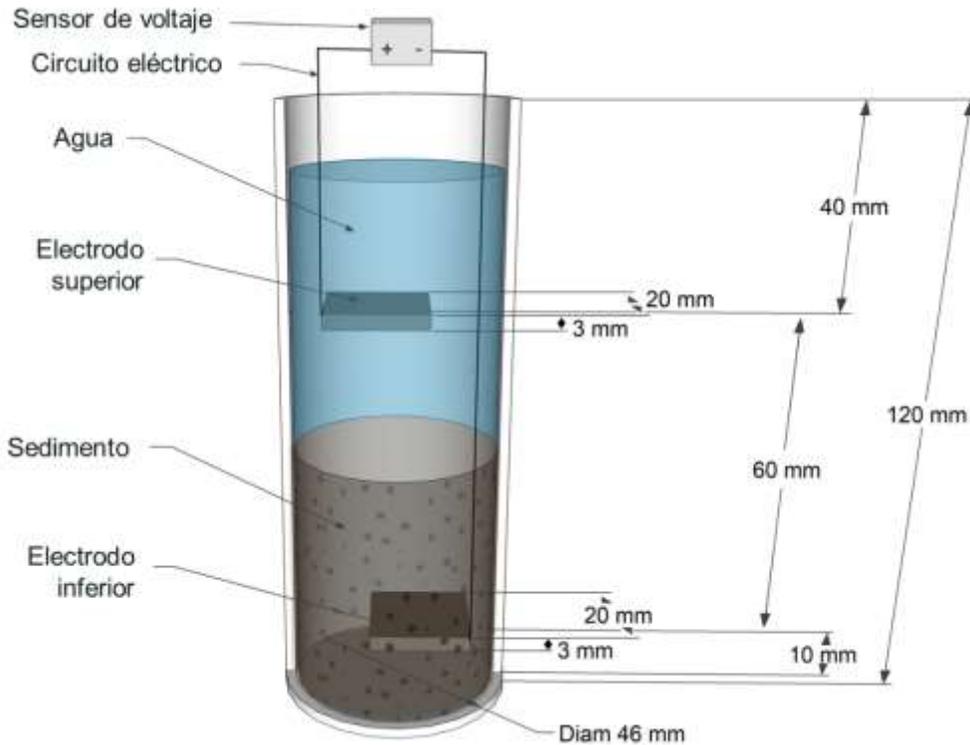
### **4.3 Construcción de las celdas microbianas de sedimento y desarrollo de un sistema de adquisición de datos**

Se consideró importante que los dispositivos empleados fueran de un tamaño menor a 200 mL para poder hacer todas las pruebas experimentales con diferente composición del medio de cultivo. Además, fue muy importante implementar un sistema de adquisición de datos para registrar el voltaje generado en los diferentes tratamientos.

#### **4.3.1 Construcción de las celdas de combustible microbianas de sedimento**

Las celdas microbianas empleadas consistieron en recipientes de vidrio cilíndrico. Cada una con un diámetro de 46 mm y 120 mm de alto y un volumen total de 145 mL con un electrodo en la zona inferior y otro en la zona superior. Cada electrodo consistió en una placa de grafito de 20 mm x 20 mm x 3 mm (área de 40 mm<sup>2</sup>), con muescas para enrollar un alambre de cobre. La figura 4.3 muestra las dimensiones de la celda y la disposición de los electrodos. Antes de armar la celda, los electrodos se limpiaron con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio [59]. Estos se sumergieron en 0.5 M HCl por 30 min y posteriormente en 0.5 M NaOH por 30 min, posteriormente se lavaron con jabón libre de fosfatos, se enjuagaron, se colocaron en agua destilada y posteriormente se enrolló un alambre de cobre para colocarlos en la celda. Un electrodo se colocó en la parte inferior de la celda a una distancia de 1 cm del fondo del recipiente y el otro electrodo se colocó a 4 cm de la parte superior de la columna. Estos dispositivos con los electrodos se taparon y se esterilizaron en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min.

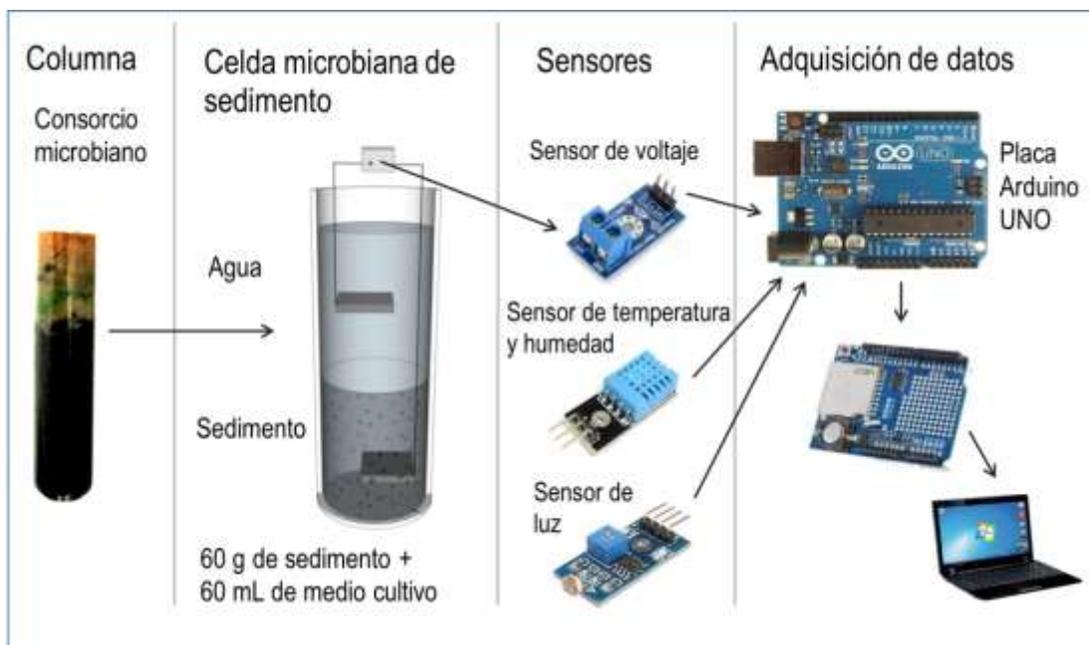
Se pesaron 60 g de sedimento húmedo (lodo) en recipientes de vidrio de 250 mL y se esterilizaron en autoclave a 121 °C (15 psi) durante 2.75 h con la finalidad de tener mayor reproducibilidad al eliminar cualquier microorganismo presente y trabajar sólo con el consorcio microbiano descrito en la sección anterior. Posteriormente, en cada recipiente se agregaron 60 mL de medio de cultivo (cada uno con diferente composición como se describe más adelante) y se esterilizaron a 121 °C (15 psi) por 20 min. Se enfriaron rápidamente y se inocularon con 8 mL de lodo del consorcio desarrollado anteriormente. Cada recipiente se agitó y su contenido se colocó en la celda con los electrodos, de tal forma que al agregar el lodo y sedimentarse, el electrodo inferior permaneció enterrado en el sedimento y el electrodo superior sumergido en el líquido, igual que en otras celdas de combustible microbianas de sedimento [8,22].



**Figura 4.3.** Columna de Winogradsky con la posición de electrodos, sus dimensiones y el circuito eléctrico con el sensor de voltaje (elaborado en SketchUp).

#### 4.3.2 Desarrollo de un sistema de adquisición de datos con Arduino

El sistema de adquisición de datos se desarrolló utilizando una placa de Arduino UNO, una placa de expansión data logger y sensores de voltaje (FZ0430) para medir el potencial de circuito abierto en la celda microbiana de sedimento. Adicionalmente se incluyó un sensor de temperatura y humedad relativa (DHT11) para registrar estas variables ambientales y un sensor de luz (con fotorresistencia LDR) para registrar los periodos de luz y oscuridad. Se utilizaron diferentes "sketchs" (códigos) para el uso de cada sensor, dependiendo de la fase experimental. Cada sketch se realizó en el entorno de desarrollo integrado de Arduino usando el lenguaje de programación y tomando en cuenta las características de los sensores [60,61]. Los sketchs utilizados se muestran en el anexo 1. Los datos adquiridos por los sensores se grabaron, cada minuto, en una memoria SD (Fig. 4.4).



**Figura 4.4.** Celda microbiana con los electrodos de grafito, sensores de voltaje, temperatura-humedad y luz conectados al sistema de adquisición de datos compuesto por una placa Arduino UNO y una placa de expansión para memoria SD.

#### 4.4 Determinación de los efectos de la composición del medio de cultivo y fotoperiodo en la generación de voltaje

Se modificó la composición del medio de cultivo para favorecer el crecimiento de diferentes comunidades microbianas en los dispositivos y determinar su efecto en la generación de voltaje. También se realizó una prueba que consistió en exponer algunos dispositivos a diferentes periodos de luz y oscuridad, con la finalidad de inhibir la fotosíntesis oxigénica en la zona superior durante el periodo de oscuridad y evaluar su efecto en la generación de voltaje. Esto se realizó en 5 fases consecutivas que corresponden al objetivo 4 y 5 (Fig. 4.1):

**Fase I)** se probó el desempeño del sistema durante 45 días con papel y otras fuentes de carbono. **Fase II)** se probaron 5 relaciones papel/sulfato por triplicado y se registró el voltaje generado durante 20 días. **Fase III)** se evaluó el efecto de la oscuridad con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante 45 días en 3 celdas del tratamiento C de la fase II. **Fase IV)** se aplicó un diseño factorial en el cual se probaron nueve tratamientos por triplicado. Este se realizó con tres fuentes de carbono para registrar el voltaje generado durante 45 días. **Fase V)** los resultados obtenidos de la fase IV se analizaron con el modelo de superficie de respuesta y se probaron las condiciones propuestas por el modelo (por triplicado) para incrementar la generación de voltaje. Los detalles de estas etapas se describen a continuación.

#### 4.4.1 Fase I: Prueba de desempeño con papel y otras fuentes de carbono

Estas celdas utilizó sedimento enriquecido con sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; J.T. Baker), carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ; Reasol) y papel tipo kraft (marca britz) triturado como fuente de celulosa, todos estos compuestos se agregaron al 1 % peso con respecto al peso del sedimento (60 g). El papel tiene un alto contenido de celulosa, esto se debe a que durante su fabricación la lignina y gran parte de la hemicelulosa que están presentes en la madera son removidos [62,63]. Se calculó la cantidad de carbono orgánico agregada considerando la fórmula química de la celulosa,  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ ; por lo tanto, al colocar 1 % de papel, la cantidad aproximada de carbono orgánico fue de 0.444 % peso. También se consideró la fórmula química del sulfato de magnesio para calcular la cantidad de sulfato agregada que fue de 0.390 % peso. Esto corresponde a una razón másica carbono/sulfato de 1.14. Estas celdas se elaboraron por triplicado, se incubaron a temperatura ambiente ( $23.1 \pm 1.3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), con iluminancia constante de  $1775 \pm 225 \text{ lux}$  (tubo LED 6500 K, 16 W) y se midió el voltaje generado por 45 días con el sistema de adquisición de datos (sketch anexo 1-A).

Posteriormente se realizó una prueba preliminar cambiando la composición del medio. En un dispositivo se duplicó la concentración de papel (es decir, se colocó el 2 % peso) y el resto de los reactivos se mantuvo en 1 % peso, esto representó una razón másica carbono/sulfato de 2.29. En otro dispositivo se duplicó la concentración de sulfato (es decir, se colocó 2 % peso) para obtener una razón másica carbono/sulfato de 0.57. El voltaje generado se registró por 45 días con el sistema de adquisición de datos.

También se probaron fuentes de carbono simples: lactato de calcio y glucosa para determinar el efecto en la generación de voltaje. El medio de cultivo se preparó con la fuente de carbono orgánico al 1 % peso, sulfato de magnesio al 2 % peso y carbonato de calcio al 1 % peso. Las celdas se elaboraron por duplicado, se incubaron a temperatura ambiente, con iluminación constante y se monitorearon por 45 días con el sistema de adquisición de datos (sketch anexo 1-A).

#### 4.4.2 Fase II: Efecto de la razón másica papel/sulfato

En esta fase se probó el efecto de la proporción de papel y sulfato cambiando únicamente la concentración de sulfato. Se utilizó papel tipo kraft como fuente de carbono y se probaron diferentes proporciones de carbono y sulfato por triplicado, que corresponden a cinco tratamientos con diferente razón másica carbono/sulfato: A) 0.14, B) 0.28, C) 0.57, D) 1.14 y E) 2.29. Estas celdas microbianas se elaboraron por triplicado, se incubaron a temperatura ambiente ( $23.1 \pm 1.3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), con iluminancia constante de  $1775 \pm 225 \text{ lux}$  (tubo LED 6500 K, 16 W) y se monitorearon con el sistema de adquisición de datos durante 20 días (sketch anexo 1-A). La tabla 4.1 muestra las cantidades colocadas de los compuestos y la razón másica carbono/sulfato. Los porcentajes de los compuestos se pesaron respecto al peso del sedimento húmedo (60 g) y se agregó carbonato de calcio al 0.5 % peso.

**Tabla 4.1.** Tratamientos con 5 relaciones carbono/sulfato utilizando papel como fuente de carbono y cambiando únicamente la cantidad de sulfato: carbono (C) y sulfato (SO<sub>4</sub>).

Tratamiento	Composición de papel (% peso)	Contenido de carbono orgánico* (% peso)	Composición de MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (% peso)	Contenido de sulfato (% peso)	Razón másica C/SO <sub>4</sub>
A	0.5	0.222	4	1.559	0.14
B	0.5	0.222	2	0.779	0.28
C	0.5	0.222	1	0.390	0.57
D	0.5	0.222	0.5	0.195	1.14
E	0.5	0.222	0.25	0.097	2.29

\* Contenido aproximado de carbono orgánico

Con los resultados obtenidos de la fase II se decidió utilizar el tratamiento C para aplicar un fotoperiodo y probar el efecto de la oscuridad en la generación de voltaje (fase III). También se utilizaron los resultados de la fase II para establecer las diferentes concentraciones de carbono y sulfato en el diseño factorial de tres niveles que corresponde a la fase IV.

#### 4.4.3 Fase III: Efecto del fotoperiodo

Para evaluar el efecto de la oscuridad en la generación de voltaje se utilizó un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 45 días a temperatura ambiente (20.9 ± 1.3 °C). El enriquecimiento correspondió al tratamiento C de la fase II, papel (0.5 % peso) como fuente de carbono (P) y sulfato de magnesio (1 % peso), razón másica carbono/sulfato de 0.57. Los dispositivos se elaboraron por triplicado y la generación de voltaje se monitoreó durante 45 días. Se utilizó el sistema de adquisición de datos de Arduino UNO con el sensor de luz y el sketch del anexo 1-B.

Con los resultados de esta fase se determinó que los dispositivos deben tener una exposición constante a la luz para favorecer la generación de voltaje.

#### 4.4.4 Fase IV: Diseño factorial para evaluar la generación de voltaje

En esta etapa se probó el efecto de 3 fuentes de carbono y la razón másica carbono/sulfato del medio de cultivo. Se utilizó un diseño factorial  $3^2$ , es decir, 3 niveles de concentración (baja, media y alta) para 2 factores [64]. Los factores utilizados fueron: la fuente de carbono (A) y el sulfato (B). Se generaron un total de 3 experimentos  $3^2$ , cada uno por triplicado, es decir, 27 celdas para cada fuente de carbono (lactato, celulosa y papel): en total se elaboraron 81 celdas.

Se seleccionó lactato de calcio,  $(C_3H_5O_3)_2Ca \cdot 5H_2O$ , como sustrato simple y celulosa y papel como sustratos complejos. Se utilizó la celulosa en forma de reactivo grado técnico cuya composición es conocida,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , y papel tipo kraft que tiene un alto contenido de celulosa [62,63]. El lactato y la celulosa ya han sido utilizadas previamente por distintos autores en celdas de combustible microbianas [5,11,65,66]. En cuanto a la fuente de sulfato, se utilizó sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) como compuesto necesario para el ciclo del azufre en las columnas de Winogradsky [18,19,21].

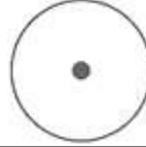
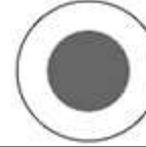
La razón másica entre la fuente de carbono orgánico y el sulfato se modificó tomando en cuenta la estequiometría y las relaciones de nutrientes que podrían favorecer a las bacterias sulfato-reductoras o a otros grupos de bacterias como metanogénicas y acetogénicas [25,67]. El porcentaje de la fuente de carbono y sulfato se colocó con respecto al peso de sedimento húmedo.

Se realizaron los cálculos de peso molecular para colocar la misma cantidad de carbono de cada una de las fuentes utilizadas. Las concentraciones definitivas de carbono fueron: 0.056 % peso (baja), 0.222 % peso (media) y 0.889 % peso (alta). El ajuste para la fuente de carbono implicó colocar 0.24, 0.94 y 3.8 % peso de lactato de calcio pentahidratado, y 0.125, 0.5 y 2 % peso de celulosa y papel.

También se hicieron los cálculos de la cantidad de sulfato, para los distintos niveles que fueron: 0.097 % peso (bajo), 0.389 % peso (medio) y 1.559 % peso (alto), estos valores corresponden a 0.25, 1 y 4 % peso de sulfato de magnesio heptahidratado.

La combinación de estos niveles permitió proponer 9 tratamientos con 5 proporciones de carbono y sulfato distintas. La razón másica carbono/sulfato de los tratamientos fue: 0.04 (T1), 0.14 (T2 y T4), 0.57 (T3, T5 y T7), 2.29 (T6 y T8) y 9.16 (T9) (Tabla 4.2). De esta manera, en el tratamiento T1, se utilizó un exceso de sulfato y en la condición T9, un exceso de carbono orgánico. Además, a todos los tratamientos se les añadió carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) al 0.5 % peso como fuente de carbono inorgánico.

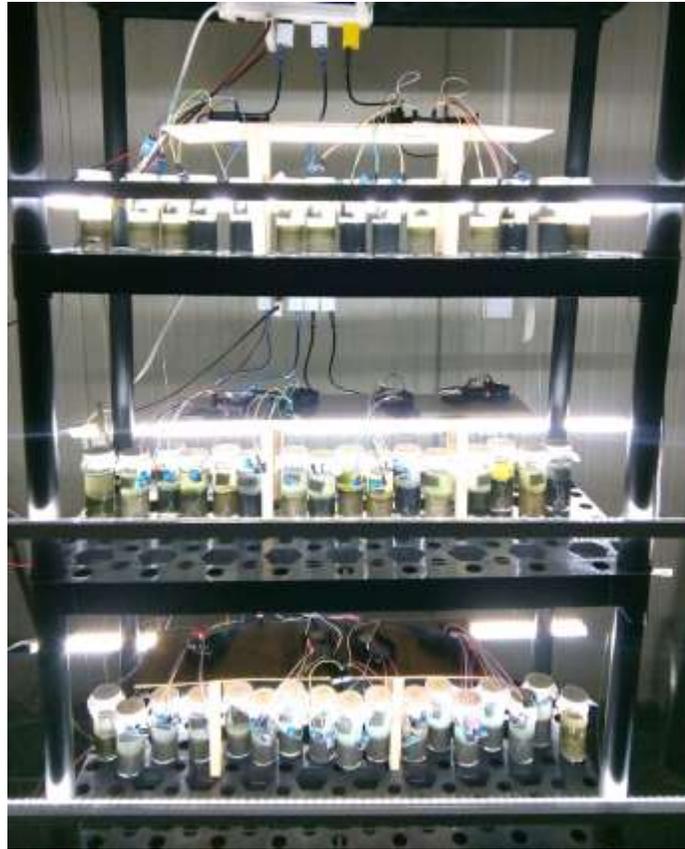
**Tabla 4.2.** Tratamientos 1 al 9 con 5 proporciones distintas de carbono y sulfato en el medio de cultivo. Diseño factorial 3<sup>2</sup>, con tres niveles: bajo, medio y alto con dos factores: carbono y sulfato. Estos tratamientos se emplearon para las tres fuentes de carbono: lactato, celulosa y papel.

		<b>Factor:</b> Proporción de carbono orgánico (C org)		
		Bajo C <sub>org</sub> = 0.056 %	Medio C <sub>org</sub> = 0.222 %	Alto C <sub>org</sub> = 0.889 %
<b>Factor:</b> Sulfato (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	Alto SO <sub>4</sub> = 1.559 %	T1 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.04 	T2 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.14 	T3 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.57 
	Medio SO <sub>4</sub> = 0.389 %	T4 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.14 	T5 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.57 	T6 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 2.29 
	Bajo SO <sub>4</sub> = 0.097 %	T7 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 0.57 	T8 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 2.29 	T9 C <sub>org</sub> /SO <sub>4</sub> = 9.16 

Los círculos representan la cantidad de carbono orgánico (gris) y sulfato (blanco) en cada tratamiento.

Adicionalmente se montaron cinco celdas extra como control abiótico, estas consistieron en celdas con los tratamientos T1, T3, T5, T7 y T9 para cada fuente de carbono, las cuales no incluyeron el inóculo del consorcio microbiano.

Las celdas de combustible microbianas de sedimento se colocaron en un laboratorio de ambiente controlado, a una temperatura de  $20.6 \pm 0.5$  °C, e iluminancia constante de  $1775 \pm 225$  lux (tubo LED 6500 K, 16 W). Se llevó a cabo el monitoreo del voltaje generado durante 45 días con un sistema de adquisición de datos con los sensores de voltaje (sketch anexo 1-A; Fig. 4.5).



**Figura 4.5.** Celdas microbianas conectadas a los sensores de voltaje y al sistema de adquisición de datos en el laboratorio de temperatura controlada.

#### **4.4.5 Fase V: Análisis del modelo superficie de respuesta y comprobación**

##### Análisis del modelo superficie de respuesta

Los resultados del diseño factorial (fase IV) se analizaron con el modelo superficie de respuesta en Statgraphics Centurion IX para obtener el efecto de los factores en la variable respuesta y las condiciones para incrementar el voltaje [64].

##### Comprobación de las condiciones sugeridas por el modelo de superficie de respuesta

Las condiciones propuestas por el modelo se utilizaron para la elaboración de celdas con razón másica carbono/sulfato de 0.34 para celulosa y 0.18 con papel. En este caso se elaboraron 3 réplicas de cada una de las condiciones mencionadas, se incubaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 0.9$  °C) con iluminancia constante de  $1775 \pm 225$  lux (tubo LED 6500 K, 16 W) y se monitorearon por 45 días con el sistema de adquisición de datos (sketch anexo 1-A).

## **4.5 Análisis de la comunidad bacteriana en dispositivos con diferentes nutrientes**

En función de los resultados obtenidos en la generación de voltaje (fase IV), se realizó una selección de las condiciones más contrastantes en cuanto a la generación de voltaje para analizar las comunidades bacterianas y determinar su relación con la generación de voltaje. Los tratamientos considerados para esta fase fueron T5 y T6 (Tabla 4.2) con el uso de papel (PT5 y PT6) y de lactato (LT5 y LT6). Se seleccionó el tratamiento PT5 que favoreció la generación de voltaje y los tratamientos LT5, LT6 y PT6 que generaron un voltaje casi nulo para distinguir los grupos de bacterias que favorecen la generación de voltaje. En función de los resultados se estableció el día 19 para tomar las muestras y analizar la comunidad bacteriana antes de que incrementara la generación de voltaje en el tratamiento PT6. Se hicieron las columnas por quintuplicado de estos 4 tratamientos para tener un total de 20 dispositivos. Estas celdas se incubaron a temperatura ambiente, con iluminancia constante de  $1775 \pm 225$  lux (tubo LED 6500 K, 16 W).

### **4.5.1 Monitoreo del voltaje en los tratamientos para el análisis de la comunidad bacteriana**

Estas celdas se monitorearon durante 19 días para registrar la generación de voltaje con el sistema de adquisición de datos (sketch anexo 1-A).

### **4.5.2 Extracción de ADN para el análisis de metagenómica**

De cada dispositivo se tomaron 3 muestras en el día 19. La primera muestra fue de agua (en la zona del electrodo superior), la segunda fue de sedimento (en la zona del electrodo inferior) y la tercera, correspondió a una mezcla de toda la columna. La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción de Jena Bioscience para bacterias con modificaciones al protocolo para aplicarlo a las muestras de sedimento (anexo 2). En el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I, se midió la concentración y pureza del ADN en el equipo nanoDrop (2000 Thermo Scientific™) y se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1 % para determinar la integridad del ADN [68]. Las muestras se guardaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su análisis en el Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., unidad Mazatlán.

### **4.5.3 Análisis de metagenómica 16S: Identificación de la comunidad bacteriana**

Se utilizaron los iniciadores 338F y 533R para amplificar la región V3 del gen 16S del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para la preparación de la biblioteca se realizaron reacciones de PCR con los índices para marcar los fragmentos de ADN de cada muestra y obtener los tagmentos (fragmentos etiquetados).

Se llevó a cabo la purificación con perlas y barra magnética. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y la cuantificación de tagmentos. La biblioteca se cargó en el depósito número 16 del cartucho de reactivo y se preparó la celda de flujo para realizar la secuenciación en el equipo MiniSeq de Illumina (Fig. 8.1, anexo 3) [69]. Después de la secuenciación los datos fueron analizados en el servidor del CIAD de Mazatlán, de acuerdo con las instrucciones para el análisis de metagenómica 16S para la identificación de grupos bacterianos en la página: <https://sites.google.com/a/ciad.mx/bioinformatica/home/metagenomica>. Las secuencias se limpiaron, se convirtieron a formato fasta, se eliminaron las secuencias quiméricas y por último se utilizó el script mg\_classifier y la base de datos de SILVA\_132 para asignar el taxón correspondiente a cada secuencia. Posteriormente se agruparon los resultados en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Se realizó un análisis con las curvas de rarefacción para determinar si el número de lecturas fue el adecuado para cada muestra.

#### **4.5.4 Análisis de la diversidad bacteriana**

Los índices de diversidad alfa se calcularon en PAST 4.03 [70], para conocer la riqueza y estructura de la comunidad bacteriana. Los índices calculados fueron el de riqueza específica, diversidad de Margalef, el índice de equidad de Shannon, el índice de dominancia de Berger-Parker y el índice de dominancia y equidad de Simpson. En cuanto a la diversidad beta se utilizó el índice de Morisita-Horn; este índice es cuantitativo y es sensible a la riqueza de especies y a las especies más abundantes [50].

#### **4.6 Estudio de la cinética microbiana en la columna de Winogradsky**

Con base en los resultados, se seleccionaron sólo dos condiciones para estudiar la cinética microbiana y el gradiente de condiciones en la columna de Winogradsky. El tratamiento T5 de lactato (LT5) y de papel (PT5) representaron las dos condiciones más contrastantes en cuanto a la generación de voltaje y también mostraron una comunidad bacteriana distinta en el día 19.

El estudio de la cinética microbiana en los dispositivos consistió en el análisis y sacrificio de tres celdas correspondientes a los días 0, 2, 5, 10, 17, 22, 27 y 31. Estas celdas se incubaron a temperatura ambiente ( $26 \pm 1.1$  °C) con iluminancia constante de  $1775 \pm 225$  lux (tubo LED 6500 K, 16 W). Se midieron parámetros fisicoquímicos y se tomaron muestras para determinar la concentración de sulfatos, sulfuros, azufre, carbohidratos totales, clorofila y biomasa. También se registró el voltaje con el sistema de adquisición de datos (sketch anexo 1-A). Se realizó un análisis estadístico para relacionar las variables con la generación de voltaje.

#### **4.6.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos**

La determinación de parámetros fisicoquímicos se realizó con diferentes sensores. En la zona superior e inferior de la columna se determinó la concentración de oxígeno disuelto (OD) (marca: DFRobot, SEN0237-A), el potencial redox (marca: Oumefar), y el pH (marca: BLANDSTRS). En la zona superior se realizó la medición de conductividad eléctrica (marca: KETOTEK), sólidos totales disueltos (STD) y la temperatura (marca: Haofy), y la salinidad con un refractómetro (marca: ATC).

#### **4.6.2 Determinación de concentración de sulfatos, sulfuros y azufre**

##### Sulfatos

Para determinar la concentración de sulfatos se tomó un volumen entre 50 y 300  $\mu\text{L}$  de muestra y se diluyeron en agua destilada para tener 1 mL, se agregó 1 mL del reactivo acondicionador y se agitó. Estos 2 mL se transfirieron a un microtubo con 60 mg de cloruro de bario, se agitó en vórtex durante 1 min y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro (HACH, DR-2500) a una longitud de onda de 420 nm [58]. La curva patrón (Fig. 8.2, anexo 4) y los cálculos utilizados para realizarla se muestran en el anexo 4.

##### Sulfuros

La muestra para sulfuro de hidrógeno se colocó en un microtubo con 500  $\mu\text{L}$  de NaOH al 0.5 N para incrementar el pH, evitar la pérdida de sulfuro y conseguir su precipitación [71], se dejó reposar por una noche y se eliminó el sobrenadante (quedando 200  $\mu\text{L}$ ). Posteriormente se agregaron 1,800  $\mu\text{L}$  del reactivo de cobre, se agitó e inmediatamente se midió la absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro (HACH DR-2500). Este protocolo es una modificación de la técnica para determinación de sulfuros en medios de cultivo con bacterias sulfato-reductoras [72]. La curva patrón (Fig. 8.3, anexo 5) y el procedimiento para realizarla se muestran en el anexo 5.

##### Azufre

El azufre es soluble en hexano y presenta una alta absorbancia a los 260 nm, lo que hace posible determinar su concentración en muestras ambientales [73]. Se colocaron 350  $\mu\text{L}$  de muestra de agua en un tubo eppendorf con 450  $\mu\text{L}$  de hexano. El microtubo se agitó verticalmente y en vórtex durante 60 s. Se dejó reposar para que se formaran 2 fases y se recuperó la fase superior (hexano) para colocarla una celda de cuarzo de 350  $\mu\text{L}$ . La absorbancia se midió en el espectrofotómetro UV-Vis (Agilent Cary 7000 UMS) a 274 nm. Para las muestras de sedimento se tomaron 30 a 50  $\mu\text{L}$  y se colocaron en un tubo eppendorf con 400  $\mu\text{L}$  de hexano, se agitó y se recuperó la fase de hexano y se midió en el espectrofotómetro. La curva patrón (Fig. 8.4, anexo 6) y los cálculos utilizados para realizarla se muestran en el anexo 6.

#### **4.6.3 Determinación de concentración de carbohidratos totales**

La determinación de carbohidratos totales se realizó tomando una muestra de sedimento de 50  $\mu\text{L}$ , a la que se le agregaron 1,000  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 1,000  $\mu\text{L}$  de la solución de fenol. Se agitó en vórtex y se colocaron 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Se agitó en vórtex, se dejó reposar durante 30 min y se centrifugó a 3,000 g durante 10 min. Posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Spectronic 21D) a 485 nm. Los tubos se enjuagaron, secaron y pesaron conservando el sedimento para relacionar la cantidad de carbohidratos con la muestra de sedimento [57]. Esta técnica también se utilizó para determinar carbohidratos en agua. Se realizaron 2 curvas patrón, una con glucosa (Fig. 8.6, anexo 7) y la otra con almidón (Fig. 8.7, anexo 7) y los cálculos utilizados se muestran en el anexo 7.

#### **4.6.4 Determinación de concentración de biomasa**

La cantidad de ADN ambiental se ha relacionado con la cantidad de biomasa bacteriana [74]. Para ello se realizó la extracción de ADN de las muestras de agua de la zona superior de la columna (cerca al electrodo superior) y del sedimento (cerca del electrodo inferior). Se midió la concentración de ADN en el nanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se calculó la concentración de ADN como un indicador de la biomasa bacteriana presente en las muestras.

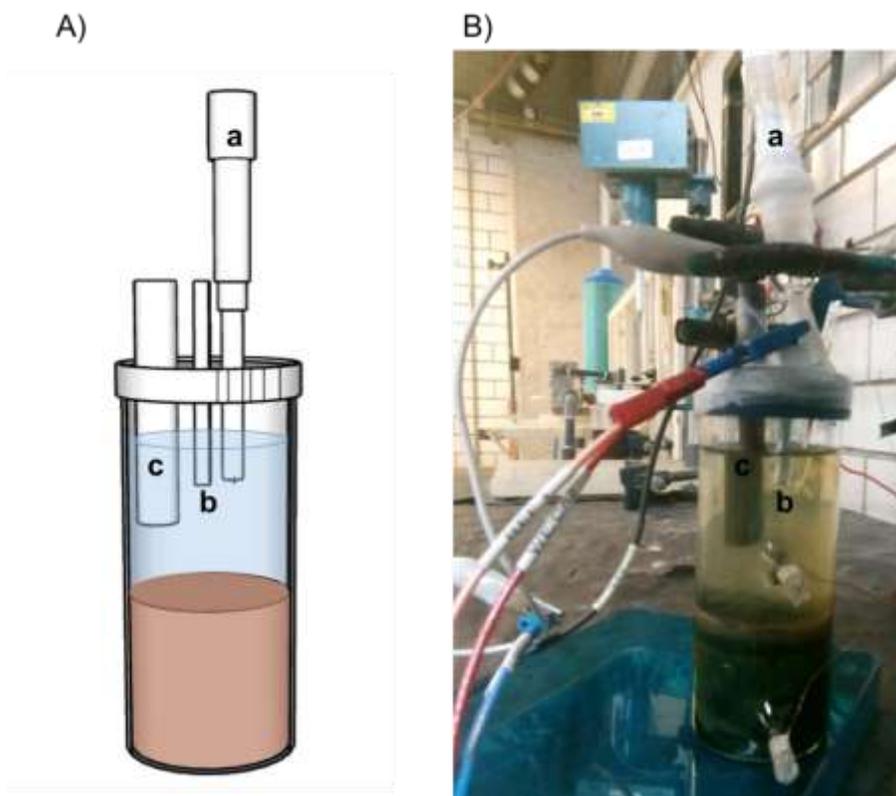
#### **4.6.5 Determinación de concentración de pigmentos fotosintéticos**

Para determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos se tomó 1.5 mL de muestra de la zona superior de la columna (cerca del electrodo) y se colocó en un microtubo. Se centrifugó 10 min a 10,000 rpm en una microcentrífuga (Costar, modelo 10M), se desechó el sobrenadante y se agregaron 1.5 mL de acetona. El microtubo se agitó verticalmente hasta deshacer el precipitado y se agitó en vórtex. Se dejó reposar por 30 min en oscuridad. Se centrifugó durante 1 min a 10,000 rpm y se realizaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro (Agilent Cary 7000 UMS) [75,76]. Se realizó un barrido de absorbancia de dos muestras (Fig. 8.8; anexo 8) y se seleccionaron las longitudes de onda 664 y 647 nm para hacer los cálculos y determinar la concentración de clorofila con la ecuación: Clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $-1.93(A_{647}) + 11.93(A_{664})$  [75–77].

### **4.7 Análisis electroquímico**

Se utilizó un sistema de tres electrodos (electrodo de referencia, electrodo de trabajo y contraelectrodo) en la celda microbiana de sedimento correspondiente al tratamiento PT5 (Fig. 4.6) para determinar el potencial de circuito abierto y la voltamperometría cíclica a través de un potencióstato BioLogic VMP3. El potencial del electrodo de trabajo fue monitoreado en relación al electrodo de referencia [78]. Se empleó un electrodo de sulfatos

(electrodo de referencia) con un capilar de Luggin con una solución saturada de sulfato de potasio. Este capilar se utiliza para disminuir la distancia entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. Para realizar el análisis en la parte superior se utilizó el electrodo de referencia con un capilar de Luggin de 70 mm de largo, un electrodo de trabajo de grafito de 3 x 4 x 50 mm cubierto con cinta teflón para dejar expuesta la menor área posible (3 x 4 mm) y como contraelectrodo una barra de grafito de 9 mm de diámetro x 100 mm de largo. Para realizar la medición de la parte inferior, el electrodo de referencia se colocó en un capilar de Luggin de 120 mm de largo, el electrodo de trabajo fue una placa de grafito de 20 x 20 x 3 mm, y el contraelectrodo se bajó lo más posible. Las voltamperometrías se hicieron en sentido anódico y posteriormente en sentido catódico. La ventana de potencial se determinó utilizando el medio de cultivo estéril en una celda abiótica sin sedimento tomando en cuenta los valores de pH. También se realizó la voltamperometría cíclica con el tratamiento PT5 con la comunidad bacteriana. La ventana de potencial fue de -0.9 a 0.4 V con una velocidad de barrido de 2 mV/s [78].



**Figura 4.6.** Sistema de tres electrodos A) esquema (elaborado en SketchUp) y B) fotografía. Electrodo de referencia dentro del capilar de Luggin (a), electrodo de trabajo (b) y contraelectrodo (c) para realizar el potencial de circuito abierto (OCP) y la voltamperometría cíclica (VC) con el potenciostato BioLogic VMP3

## 4.8 Estrategia para realizar la integración

Se tomaron los resultados más relevantes de cada sección experimental y se integraron para explicar la generación de voltaje en las columnas de Winogradsky operadas como un sistema bioelectroquímico. Se realizaron correlaciones entre el voltaje y los parámetros analizados en la cinética de la columna de Winogradsky. También se realizó un análisis de componentes principales en PAST 4.03 [70] de las celdas de la cinética para determinar las variables de mayor influencia sobre las características de las celdas.

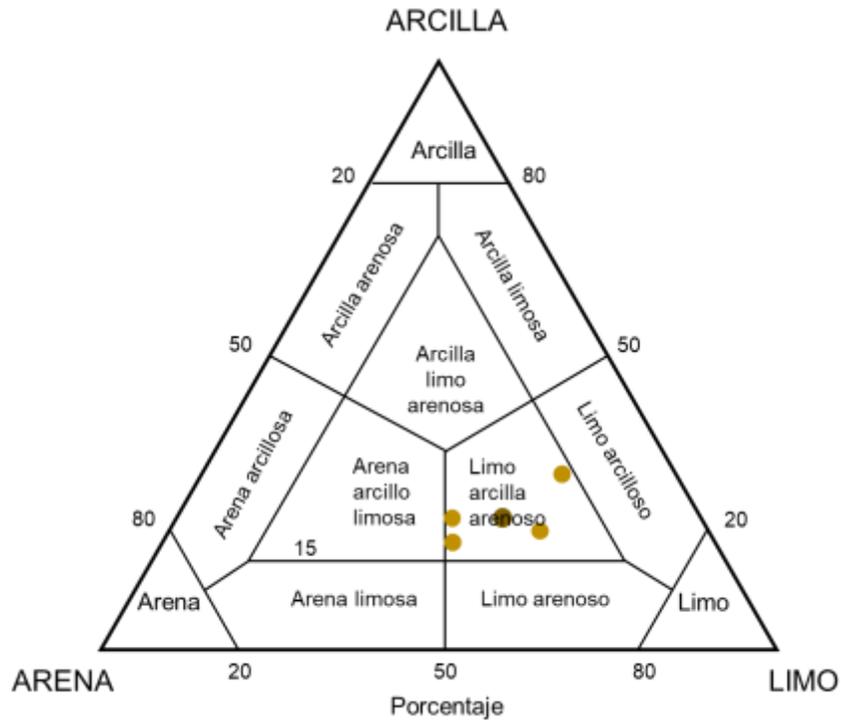
# 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Características del sedimento

El análisis granulométrico indicó que en el sedimento utilizado en las celdas predominó el limo con  $48.1 \pm 8.8$  %, seguido por arena  $29.2 \pm 12.5$  % y por último arcilla con  $22.7 \pm 5.0$  %, siendo un sedimento limo-arcillo-arenoso (Fig. 5.1). Es común encontrar sedimentos lodosos con diferentes porcentajes de contenido de arena, limo y arcilla en ambientes acuáticos costeros. Estos porcentajes pueden variar según el sitio y el tiempo debido a la hidrodinámica ambiental [79].

El contenido promedio de agua en el sedimento fue del 46.2 % peso/peso. La materia orgánica representó entre un  $6.7 \pm 1.6$  % (que corresponde a  $67 \pm 16$  mg/g) del peso seco de la muestra y el contenido de carbonatos fue de  $6.9 \pm 0.9$  % ( $69 \pm 9$  mg/g). La concentración de carbohidratos totales en el sedimento fue de  $8.2 \pm 1.1$  mg/g; esto representa menos del 13 % de la materia orgánica. Por lo general, una gran parte de la materia orgánica de los sedimentos permanece sin identificar. Los carbohidratos totales constituyen entre el 8 y el 48 % del carbono orgánico presente en sedimentos marinos [80,81].

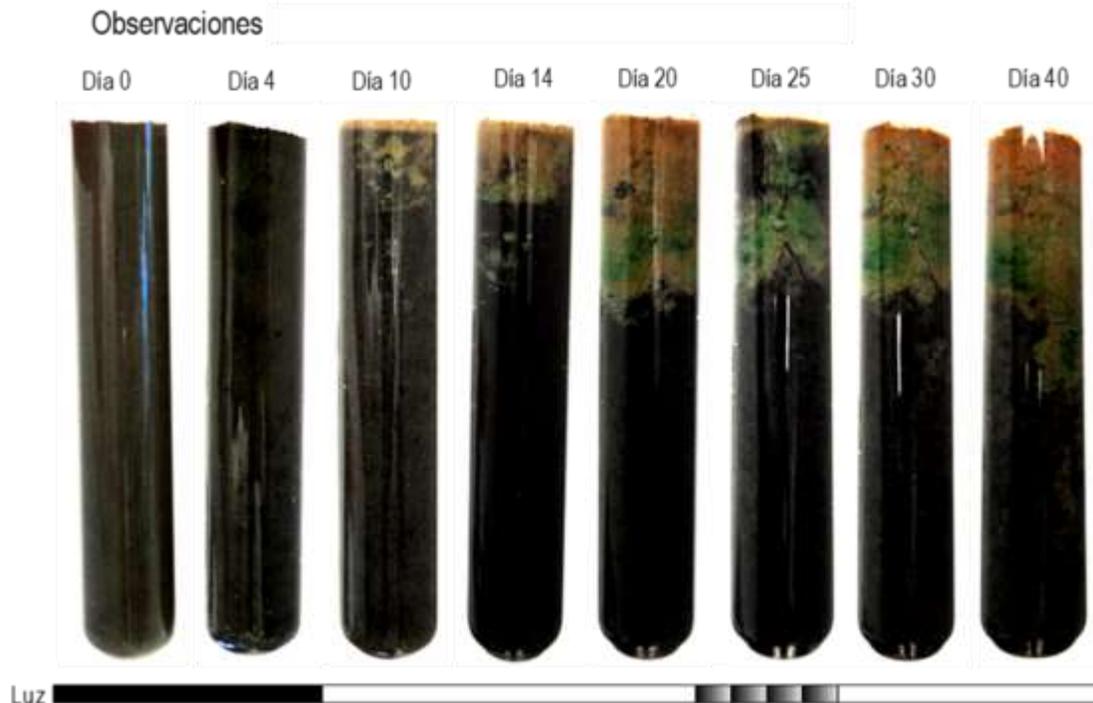
La concentración de sulfato en el sedimento fue de 1.3 mg/g. El contenido de sulfatos puede variar ampliamente en diferentes ambientes acuáticos. En sistemas de agua dulce la concentración es baja ( $10 \mu\text{M}$  a  $500 \mu\text{M}$ ), mientras que en ambientes marinos se reporta un valor de 28 mM ( $2.69$  mg/g) [53]. En una zona de mezcla de agua, como el estuario de Tecolutla, se puede esperar una concentración cercana a 1.3 mg/g de sulfato en el agua intersticial del sedimento.



**Figura 5.1.** Diagrama ternario de Trefethen para la clasificación de sedimento con base en el tamaño de partícula [56]. Los puntos claros corresponden a las muestras analizadas y el punto oscuro al promedio.

## 5.2 Obtención del consorcio microbiano en columnas de Winogradsky

Las primeras columnas de Winogradsky que se elaboraron en tubos (22 mm de diámetro y 170 mm de largo) permitieron obtener el consorcio microbiano. El enriquecimiento de estas columnas favoreció el desarrollo de los microorganismos, lo que pudo apreciarse con los cambios de coloración característicos de estas columnas [18,19]. En los primeros 5 días se observó un oscurecimiento del sedimento provocado por la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. Posteriormente, se desarrollaron manchas verdes características de las bacterias fototróficas del azufre que se extendieron hasta formar una zona verde que abarcó una tercera parte de la columna de sedimento (Fig. 5.2). Esta comunidad bacteriana fue usada para inocular los dispositivos para la generación de voltaje.



**Figura 5.2.** Apariencia de la columna de Winogradsky como resultado del crecimiento de la comunidad microbiana durante los 40 días de incubación con un enriquecimiento de sulfato de magnesio como fuente de azufre y papel tipo kraft como fuente de celulosa. La barra inferior representa el periodo de oscuridad (negro) y de luz (blanco).

### 5.3 Celdas microbianas de sedimento y sistema de adquisición de datos

En los objetivos 2 y 3 se consideró el diseño de la celda microbiana de sedimento y la implementación del sistema de adquisición de datos. El cumplimiento de estos objetivos fue indispensable para realizar las fases experimentales en las que se probó el efecto de diferentes fuentes de carbono y distintas proporciones de carbono y sulfato en la generación de voltaje. Los dispositivos empleados en este trabajo fueron de un volumen total de 145 mL, lo cual representa un tamaño pequeño si consideramos las celdas de combustible microbianas de sedimento empleadas en otras investigaciones. Bhande *et al.* [9] y Sajana *et al.* [11] emplearon celdas con un volumen cercano a los 20 L, Song *et al.* [82], Wang *et al.* [14] y Zhu *et al.* [8] usaron celdas de 1.4 L, Ribot-Llobet *et al.* [16] usaron un recipiente de 1 L y Commault *et al.* [13] usaron probetas de 500 mL.

El desarrollo del sistema de adquisición de datos realizado basado en Arduino, representa un aporte tecnológico significativo que permitió realizar la medición de voltaje cada minuto y guardarla. El voltímetro desarrollado es de alta impedancia y permitió medir el voltaje generado en la celda microbiana de sedimento; sin este dispositivo no se hubiera podido realizar el monitoreo de voltaje. En otros trabajos se realizó la medición de voltaje cada día

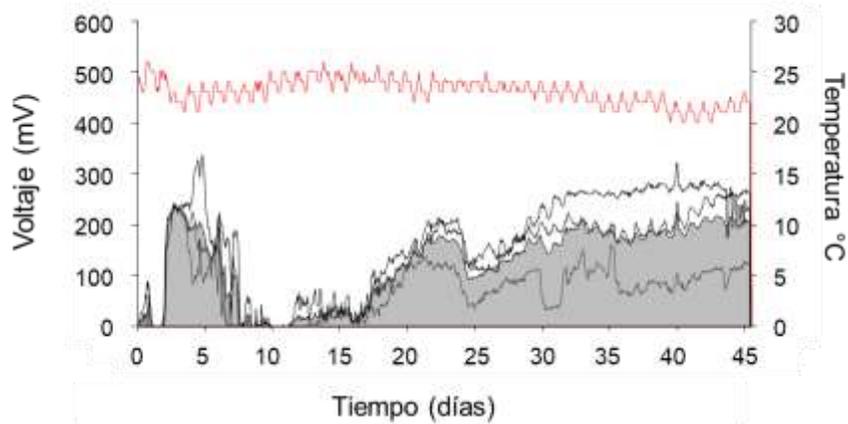
con el uso de un multímetro [9,11]. También otros autores han empleado multímetros con sistemas de adquisición de datos (Keithley Instruments 2700, EE. UU.) para registrar el voltaje generado en intervalos de 10 o 30 minutos [8,14,82]. Estos sistemas son caros con un costo de hasta \$ 3,900 dólares (Tektronix). En cambio, el costo para hacer el sistema de adquisición de datos con Arduino fue de alrededor de \$ 50 dólares. Con el dispositivo utilizado fue posible registrar continua y simultáneamente el voltaje generado en muchos dispositivos con diferente enriquecimiento.

## **5.4 Composición del medio de cultivo y efecto del fotoperiodo en la generación de voltaje**

### **5.4.1 Fase I: Prueba de desempeño con papel y otras fuentes de carbono**

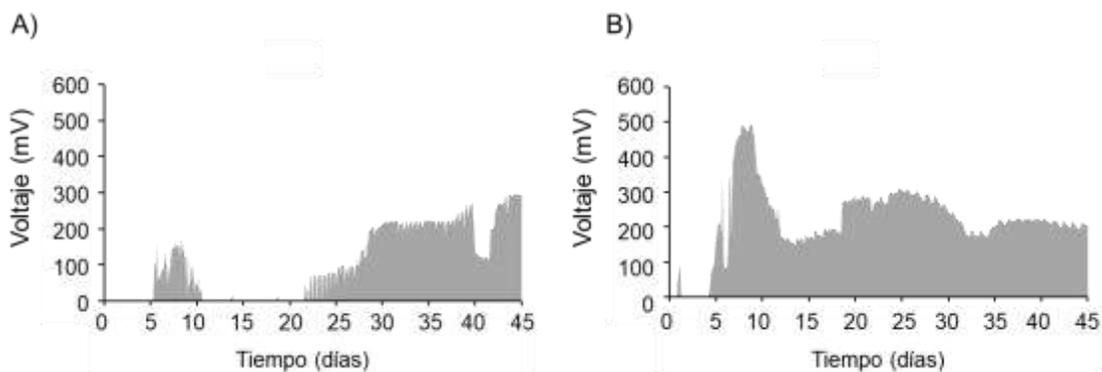
En esta fase se probó el efecto del papel y otras fuentes de carbono sobre la generación de voltaje. En los primeros sistemas empleados para medir el voltaje generado en las columnas de sedimento se utilizó sulfato de magnesio (1 % peso), carbonato de calcio (1 % peso) y papel (1 % peso) como fuente de celulosa, esta razón másica carbono/sulfato fue de 1.14. El voltaje generado a lo largo del tiempo fue variable (Fig. 5.3). Inicialmente se observó, un pico de 80 mV en el primer día, una disminución de voltaje y posteriormente un incremento de 230 mV entre los días 3 al 5. La producción de voltaje nuevamente disminuyó entre los días 8 a 15, y después se incrementó, con variaciones, hasta llegar a los  $190 \pm 12$  mV. Una de las réplicas alcanzó un máximo de 328 mV en el día 5 y otra mostró un voltaje cercano a los 300 mV después del día 30. Las pequeñas variaciones en el voltaje corresponden a las variaciones de temperatura diurna (línea roja, Fig. 5.3). La cantidad de voltaje generado con la razón másica carbono/sulfato de 1.14 se consideró aceptable debido a que en otros trabajos se alcanzó un voltaje de 300 mV [16] o incluso un voltaje menor a 50 mV [8].

El potencial de celda se asocia a los potenciales redox de las especies químicas presentes en la parte inferior y superior del sedimento. Por lo tanto, los potenciales redox que podrían contribuir a la generación de voltaje son principalmente sulfato/sulfuro debido a procesos anaeróbicos de reducción de sulfato en la zona inferior de la columna y oxígeno/agua en su zona superior. El potencial del par redox sulfato/sulfuro es de - 220 mV, mientras que el potencial del oxígeno/agua es de - 820 mV [1,34] y pueden contribuir a la generación de voltaje en la columna de Winogradsky.



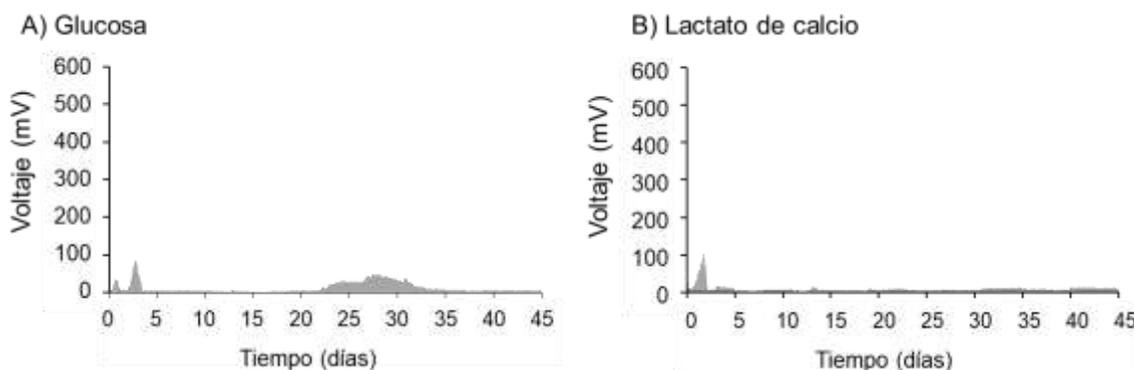
**Figura 5.3.** Generación de voltaje al utilizar papel y sulfato al 1 % (razón másica carbono/sulfato de 1.14). Las líneas negras corresponden a los resultados de las tres réplicas, el área sombreada al promedio del voltaje y la línea roja a la temperatura ambiental.

Las pruebas que se realizaron posteriormente consistieron en duplicar la concentración de papel en un dispositivo y duplicar la concentración de sulfato en otro dispositivo. Se observó que al duplicar la concentración de papel a 2 % peso (razón másica carbono/sulfato de 2.29), la generación de voltaje fue menor que al usar 1 % peso de esta fuente de carbono. Mientras que, al duplicar la concentración de sulfato a 2 % peso (razón másica carbono/sulfato de 0.57), la generación de voltaje fue mayor (Fig. 5.4). A partir de los resultados obtenidos se decidió trabajar con una razón másica carbono/sulfato de 0.57 y además se probaron otras fuentes de carbono. Las pequeñas variaciones en el voltaje, también corresponden a las variaciones de temperatura diurna.



**Figura 5.4.** Generación de voltaje al cambiar la composición del medio: A) concentración de papel al 2 % (razón másica carbono/sulfato de 2.29). B) concentración de sulfato al 2 % (razón másica carbono/sulfato de 0.57).

Se probó la glucosa y lactato de calcio como fuentes de carbono orgánico simples con una razón másica carbono/sulfato de 0.57. Sin embargo, estas fuentes de carbono no favorecieron la generación de voltaje. Con la glucosa, se observó un pico inicial y después se registró un voltaje inferior a los 100 mV durante 10 días, lo que se puede considerar un tiempo corto de generación de voltaje (Fig. 5.5 A). Con el lactato se observó un pico de 100 mV en los primeros 5 días y después el voltaje fue casi nulo (Fig. 5.5 B).



**Figura 5.5.** Generación de voltaje al utilizar fuentes de carbono simples: A) glucosa y B) lactato de calcio con una razón másica carbono/sulfato de 0.57.

En otras investigaciones se han empleado lactato y glucosa como fuentes de carbono en celdas de combustible microbianas [5]. En estos dispositivos se alcanzó un voltaje de 160 mV [83] y 500 mV [84], respectivamente. Sin embargo, las condiciones de operación en estas celdas son distintas a las celdas con sedimento. En las celdas microbianas con sedimento también se han utilizado fuentes de carbono simples y complejas. Ribot-Llobet *et al.* [16] utilizaron acetato como donador de electrones y obtuvieron una generación de voltaje que alcanzó los 300 mV. Sin embargo, es más frecuente el uso de celulosa en las celdas de combustible microbianas de sedimento y se han reportado voltajes variables desde 40 mV [8] hasta 680 mV [9].

Los compuestos orgánicos pueden ser oxidados completamente o incompletamente dependiendo del aceptor final de electrones que se encuentre en el ambiente y del metabolismo de las bacterias [45]. La glucosa se puede degradar hasta  $\text{CO}_2$  en la respiración aeróbica (Tabla 1.1; ec. 14); o bien puede degradarse incompletamente en la fermentación a compuestos más simples como etanol, ácido láctico, ácido propanoico y ácido acético (Tabla 1.1; ec. 2, 3 y 4) [48]. Estos compuestos orgánicos tienen diferente capacidad para donar electrones y también pueden contribuir a la generación de voltaje por el potencial del par redox. Por ejemplo, el potencial del par redox  $\text{CO}_2/\text{glucosa}$  ( $24 e^-$ ) es de

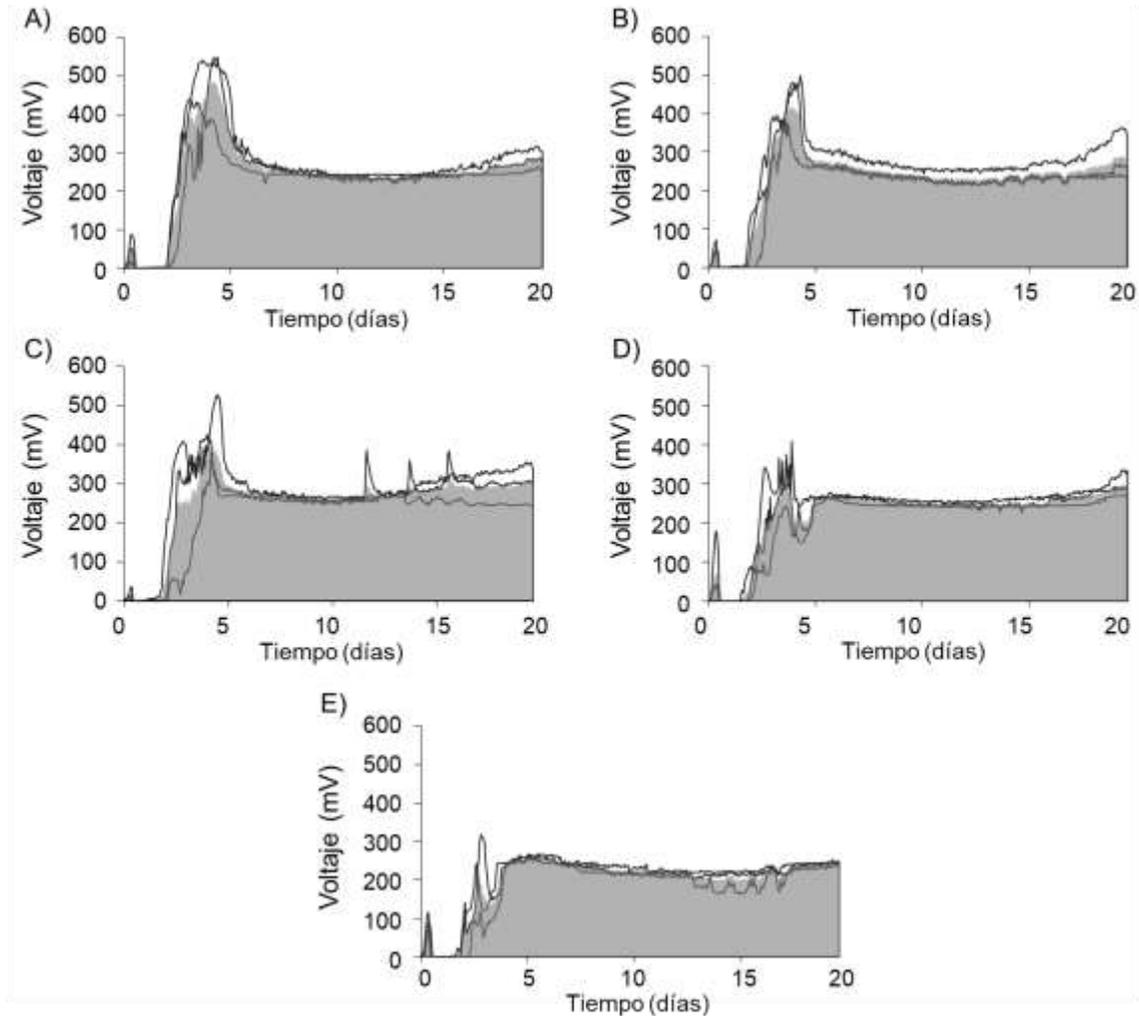
- 430 mV, el potencial del par redox  $\text{CO}_2/\text{acetato}$  ( $8 e^-$ ) es de - 280 mV y el potencial del par redox piruvato/lactato ( $2 e^-$ ) es de - 190 mV [1,31].

Al utilizar el papel como fuente de carbono se favoreció la generación de voltaje (Fig. 5.3 y 5.4). Esto puede estar relacionado con dos características importantes: 1) El papel no es soluble en agua y precipita con el sedimento. 2) Es un compuesto que puede donar varios electrones al ser degradado. Con la hidrólisis de la celulosa (presente en el papel) se liberan moléculas de glucosa (Tabla 1.1; ec. 1). Cada molécula de glucosa puede ser degradada incompletamente, lo que resulta en una gran variedad de pares redox que pueden contribuir con la generación de voltaje. En el caso de la glucosa también existe una degradación que genera una gran variedad de pares redox, sin embargo, la glucosa es soluble en agua y el potencial generado en las zonas superior e inferior pueden ser similares y generar una diferencia de potencial cercana a cero. En contraste, el lactato (una fuente de carbono simple) puede donar menos electrones y generar menos pares redox al ser degradado lo que limita la generación de voltaje.

Los resultados de la fase I indicaron que el papel fue una buena opción para la generación de voltaje y que la razón másica carbono/sulfato podría influir en la cantidad de voltaje generado, por lo que se desarrolló la fase II, que utilizó papel como fuente de carbono con diferentes razones másicas carbono/sulfato.

#### **5.4.2 Fase II: Efecto de la razón másica papel/sulfato**

En esta fase se usó papel como fuente de carbono y se evaluó el efecto de la proporción de carbono y sulfato. La concentración de papel se dejó fija y se cambió la concentración de sulfato para obtener cinco tratamientos con distinta razón másica carbono/sulfato: A) 0.14, B) 0.28, C) 0.57, D) 1.14 y E) 2.29 (Fig. 5.6). Se observó un efecto positivo en la generación de voltaje con una mayor concentración de sulfato. En todos los tratamientos se registró un pico de voltaje antes del día 6. Este pico fue más alto en el tratamiento A (mayor concentración de sulfato, razón másica carbono/sulfato de 0.14) con un valor de 500 mV. Este pico de voltaje fue menor en el resto de los tratamientos conforme se disminuyó la concentración de sulfato y se aumentó la razón másica carbono/sulfato; por ejemplo, en el tratamiento E, el voltaje fue de 300 mV. Estos picos de voltaje podrían estar relacionados con el cambio de potencial del electrodo en la zona inferior dado por la concentración de sulfuro generado durante la sulfato-reducción [34]. Después del día 6, la generación de voltaje fue constante y en todos los tratamientos se mantuvo por arriba de los 200 mV.



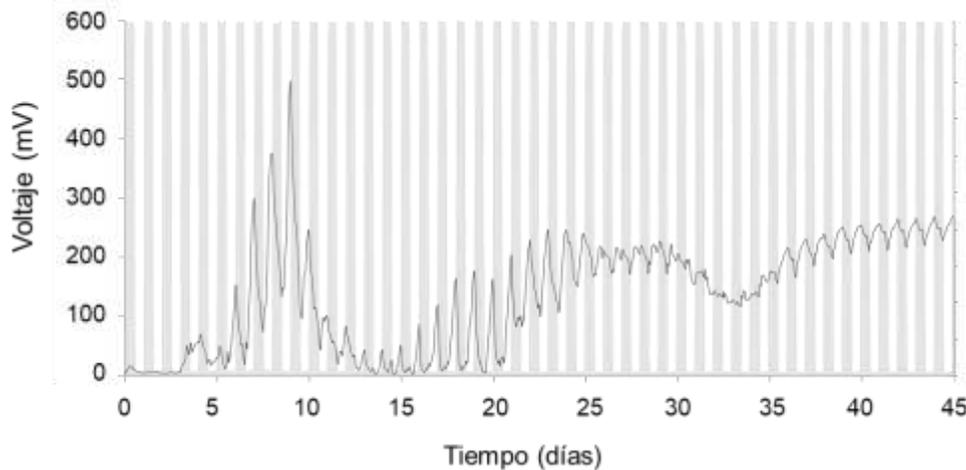
**Figura 5.6.** Generación de voltaje al utilizar papel en 5 tratamientos con distinta razón másica carbono/sulfato: A) 0.14, B) 0.28, C) 0.57, D) 1.14 y E) 2.29. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.

Al cambiar la concentración de sulfato para modificar la razón másica carbono/sulfato, se observó poca variación en la generación de voltaje. Por este motivo, se decidió cambiar tanto la concentración de la fuente de carbono, como la de sulfato (fase IV). Además de evaluar el efecto de la razón másica carbono/sulfato también era necesario conocer el efecto de la oscuridad en la generación de voltaje por lo tanto en la fase III se realizó un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

### 5.4.3 Fase III: Efecto del fotoperiodo

En este trabajo, se incluyó el análisis de la influencia de la oscuridad en la generación de voltaje a través de un fotoperiodo, debido a que en otros trabajos se ha demostrado que la luz tiene un efecto positivo en la generación de electricidad en celdas de combustible microbianas de sedimento, por la presencia de organismos fotosintéticos [13,15].

Al exponer las celdas a un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad se registró un voltaje intermitente (Fig. 5.7). Durante los periodos de exposición a la luz se observó un incremento en el voltaje y durante los periodos de oscuridad la cantidad de voltaje disminuyó. Commault *et al.* [13] reportaron un patrón similar en una celda de combustible microbiana de sedimento; con un aumento en la generación de corriente durante el periodo de luz y menor cantidad de corriente en oscuridad.



**Figura 5.7.** Efecto de la luz y oscuridad, fotoperiodo (12 h luz y 12 h oscuridad) en la generación de voltaje con el medio de cultivo con papel tratamiento C fase II. El fondo blanco representa el tiempo de luz y el fondo gris el periodo de oscuridad.

La iluminación es un factor importante que limita la distribución de los grupos fototróficos a lo largo de la columna de Winogradsky [18,19]. En este sistema, las bacterias sulfato-reductoras oxidan las fuentes de carbono orgánico en la zona inferior (sedimento), mientras que en la interfase agua-sedimento y en la zona superior, existen organismos fototróficos aerobios (microalgas y cianobacterias) [19] que reducen el carbono inorgánico y oxidan el agua con producción de oxígeno [48]. El oxígeno es el aceptor final de electrones y una alta concentración de este en la zona catódica favorece la generación de electricidad [1]. Commault *et al.* [13] mencionan que la reducción de oxígeno en la zona catódica es un factor limitante para la generación de electricidad y es necesario favorecer el desarrollo de una comunidad microbiana fototrófica para incrementar la concentración de oxígeno. Contrario a lo anterior, otros trabajos han reportado una relación inversa entre la generación

de electricidad y la iluminación, es decir, la generación de corriente aumentó durante la oscuridad y disminuyó con la iluminación [85].

Evaluar el fotoperiodo es necesario para establecer las condiciones de operación de este tipo de sistemas para poder convertir la energía solar en energía eléctrica [86]. Los resultados de esta fase corroboran que la iluminación favorece la generación de voltaje.

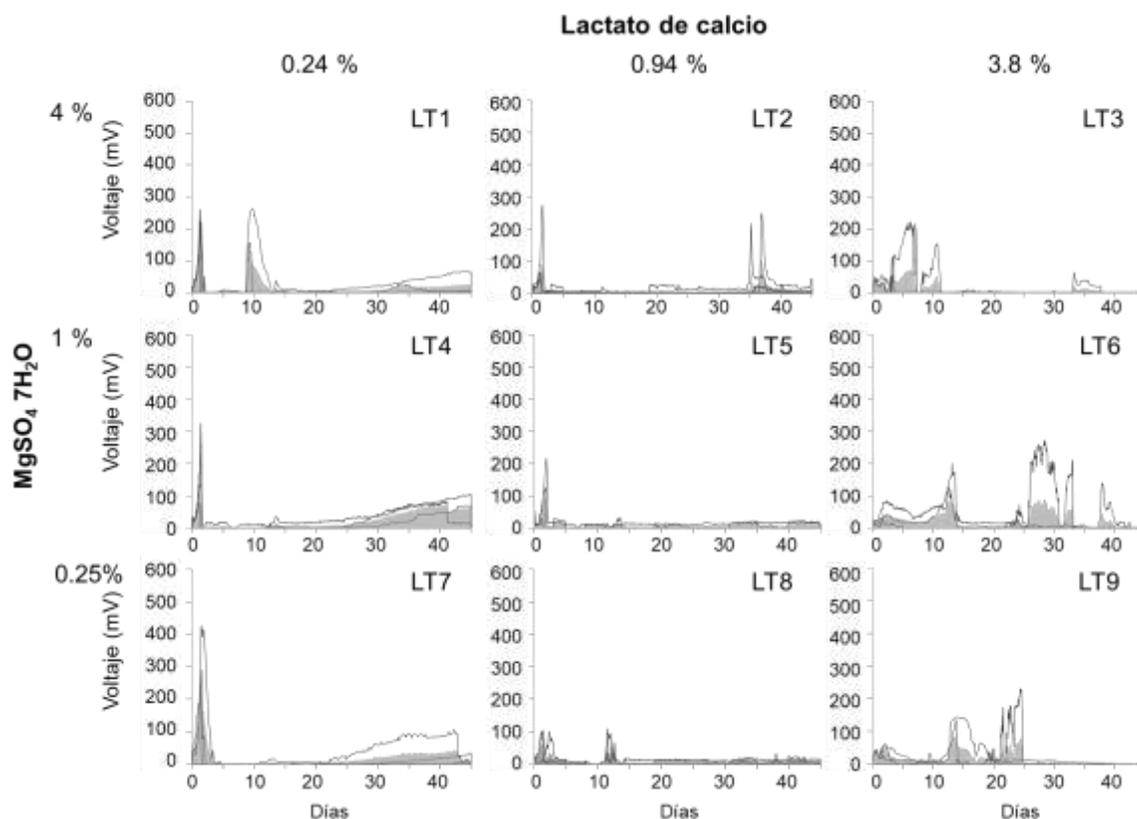
#### 5.4.4 Fase IV: Diseño factorial

En esta fase se probó el efecto de 3 fuentes de carbono (lactato, celulosa y papel) con diferentes proporciones de carbono y sulfato. Al cambiar la razón másica carbono/sulfato se favoreció el crecimiento de diferentes comunidades microbianas y por ende cambió la apariencia de las celdas de combustible microbianas de sedimento en el tiempo (Fig. 5.8). Las columnas con una alta concentración de carbono orgánico (tratamientos T3, T6 y T9), mostraron un sedimento más oscuro desde los primeros días hasta el final de la prueba (día 45), tanto con lactato, como con celulosa y papel. Mientras que el resto de las celdas que tenían una concentración media y baja de carbono orgánico, mostraron un sedimento con manchas verdes que crecieron con el paso del tiempo, las cuales se extendieron hasta cubrir gran parte del sedimento en el día 45.

Fuente de Carbono	Bajo: 0.06 %	Medio 0.22 %	Alto: 0.89 %
<b>Sulfato (SO<sub>4</sub>)</b> Alto: 1.56 %	 T1	 T2	 T3
Medio: 0.39 %	 T4	 T5	 T6
Bajo: 0.10 %	 T7	 T8	 T9

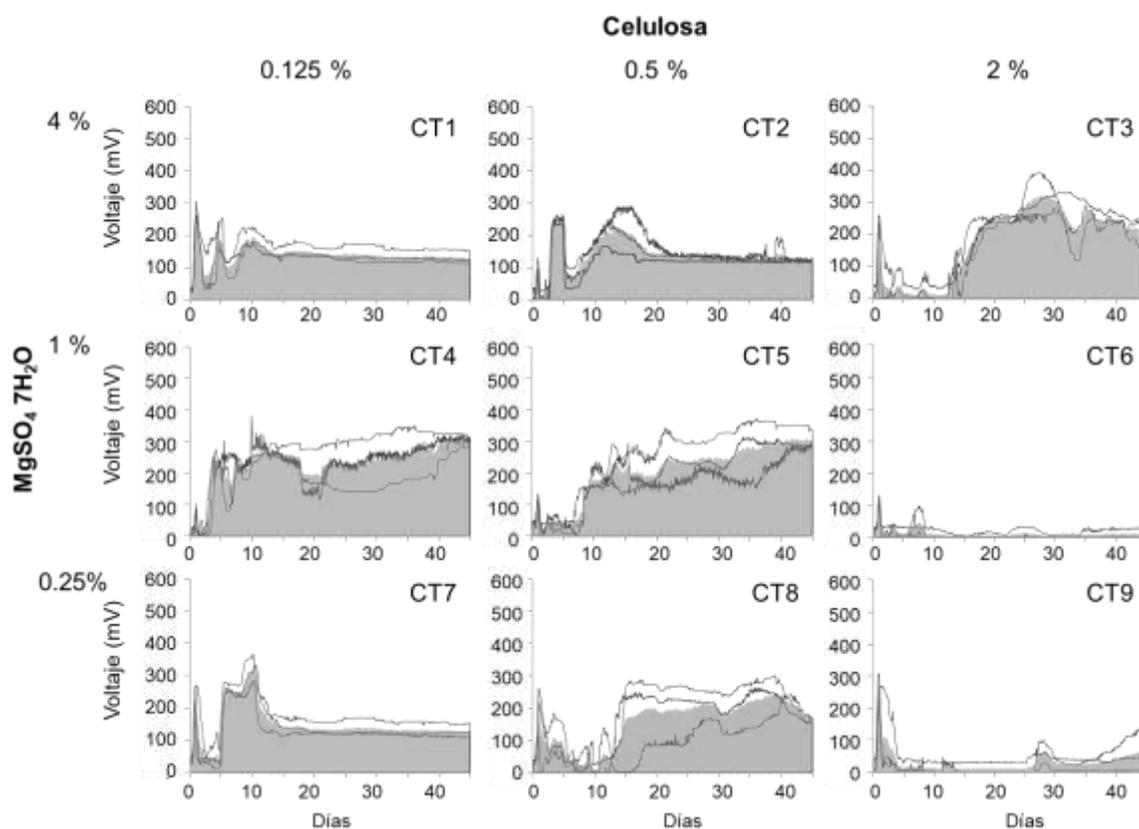
**Figura 5.8.** Apariencia de las celdas de combustible microbianas de sedimento con distinta razón carbono/sulfato del medio de cultivo en el día 45. Tratamientos T1 a T9 correspondientes al diseño experimental de lactato.

En cuanto a la generación de voltaje se obtuvieron resultados muy contrastantes al utilizar las diferentes fuentes de carbono. Como se indicó en el método, las concentraciones de las fuentes de carbono orgánico y sulfato se ajustaron para mantener las proporciones másicas de nutrientes que podrían favorecer a las bacterias sulfato-reductoras o a bacterias metanogénicas y acetogénicas [25,67]. A pesar de que el lactato no favoreció la generación de voltaje en la fase I (Fig. 5.5 B), se decidió incluir esta fuente de carbono en la fase IV, porque se esperaba encontrar una razón másica carbono/sulfato en la que se incrementara la generación de voltaje. Con el lactato de calcio se registraron algunos picos de producción de voltaje, los cuales alcanzaron un valor máximo de 286 mV. Sin embargo, la generación de voltaje en el tiempo fue poco constante y baja. Además, con este sustrato no se observó un patrón en el voltaje generado al modificar la razón carbono/sulfato en los diferentes tratamientos (Fig. 5.9).



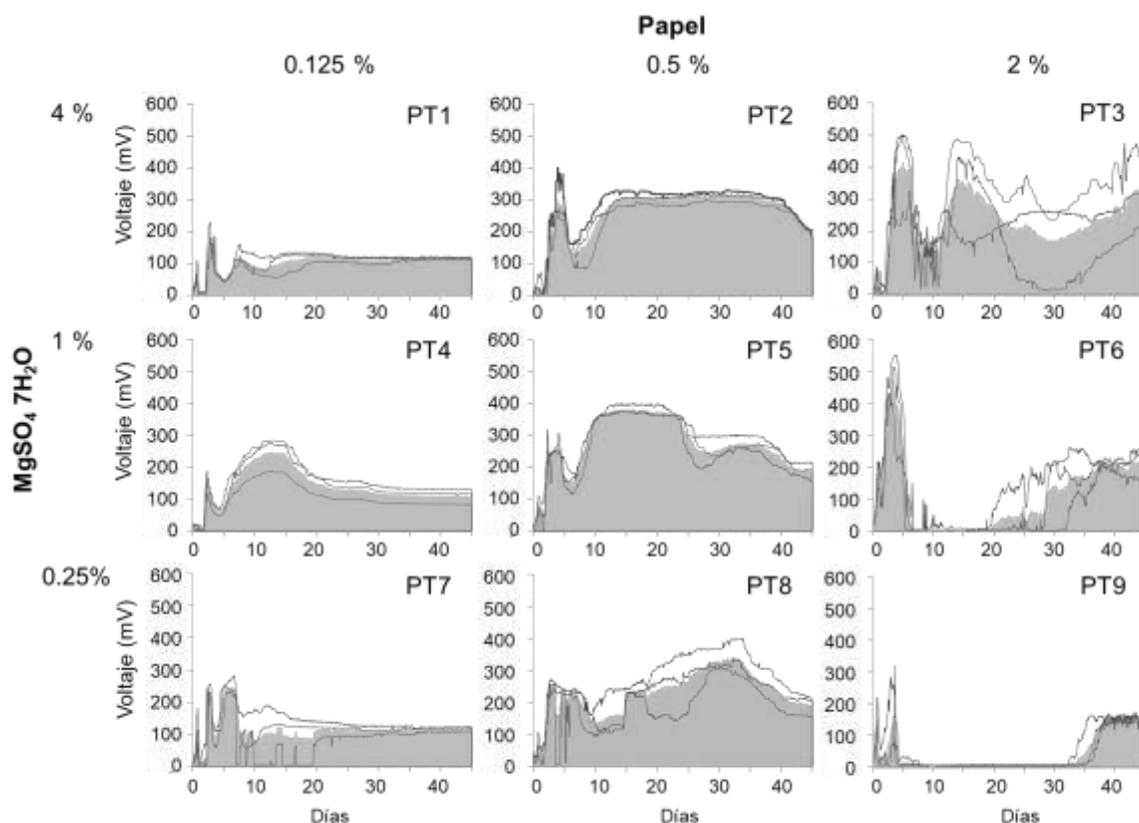
**Figura 5.9.** Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar lactato de calcio (L) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.

En contraste, al utilizar celulosa como sustrato, se observó un patrón en la generación de voltaje al cambiar la razón másica carbono/sulfato (Fig. 5.10). La generación de voltaje se inhibió casi por completo en los tratamientos CT6 y CT9 que tuvieron una alta concentración de celulosa respecto al sulfato. En contraste, en otras condiciones, con una menor concentración de celulosa, se registró un voltaje estable cercano a los 140 mV durante varios días (tratamientos CT1 y CT7). Con los tratamientos CT4 y CT5 se generó un voltaje variable entre los 200 y 300 mV durante 40 días. Durante el monitoreo de las celdas, se registró un pico inicial de voltaje en los primeros cuatro días, seguido por una disminución (antes del día 5), y un segundo pico en los tratamientos CT1, CT2, CT4, CT7, y CT8. En algunos tratamientos se observó un tercer pico con una estabilización posterior en la generación de voltaje (en CT1, CT2 y CT7), con valores cercanos a 140 mV. En otros casos después del segundo pico, el voltaje fue variable (CT3, CT4, CT5 y CT8). En los tratamientos CT6 y CT9 se registró un pico inicial y después un voltaje bajo.



**Figura 5.10.** Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar celulosa (C) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.

El uso de papel como fuente de carbono orgánico mostró un comportamiento, en la generación de voltaje, similar al obtenido con la celulosa (Fig. 5.11). Al usar este sustrato con una concentración alta de carbono y baja de sulfato también se inhibió la generación de voltaje. En el tratamiento PT9, se observó un pico inicial de voltaje y posteriormente no se registró voltaje por varios días. En contraste, en los tratamientos PT1, PT4 y PT7, que tuvieron una baja concentración de papel, se registró una producción de voltaje constante por varios días cercana a los 120 mV. Por otra parte, en los tratamientos PT2 y PT5, se obtuvieron mejores resultados con un voltaje constante durante varios días. En el tratamiento PT2 se registraron valores cercanos a los 300 mV durante 30 días. En el tratamiento PT5 se registraron dos mesetas con una producción de voltaje estable, una de 380 mV en los días 10 al 24 y la otra de 280 mV en los días 27 al 39. En estas celdas, también se observaron de uno a tres picos de voltaje, seguidos por una estabilización (tratamientos PT1, PT2, PT4 y PT7), aunque en algunos casos se observaron fluctuaciones (PT3, PT6 y PT8). Es importante mencionar que en los tratamientos PT3 y PT6 (con altas concentraciones de papel) se registraron los picos de voltaje más altos (500 mV) en los primeros siete días.



**Figura 5.11.** Generación de voltaje con distintas proporciones de carbono y sulfato al utilizar papel (P) y sulfato de magnesio en los distintos niveles: bajo, medio y alto. Las líneas corresponden a los resultados de las tres réplicas y el área sombreada al promedio.

De esta manera se comprobó que la celulosa y el papel como fuente de carbono pueden favorecer la generación de voltaje en determinadas concentraciones y proporciones.

La relación entre fuente de celulosa y sulfato se modificó considerando la proporción de nutrientes que podrían favorecer el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras u otros grupos bacterianos, como bacterias acetogénicas y metanogénicas [25]. Estos grupos de bacterias se han vinculado con la generación de voltaje, tanto sulfato-reductoras [66] como metanogénicas [87]. Por ejemplo, la alta concentración de sulfato en el tratamiento T1 pudo favorecer a las bacterias reductoras de sulfato, pero la baja concentración de la fuente de carbono pudo limitar el desarrollo de una comunidad microbiana abundante. En el tratamiento T9, la baja concentración de sulfato y la alta concentración de la fuente de carbono, pudo inhibir la sulfurogénesis por competencia entre bacterias anaerobias [25,67]. Por tanto, para favorecer la generación de voltaje, el aumento de la concentración de sulfato debe ir acompañado de la adición de celulosa o papel, como en los tratamientos CT4 y CT5 o PT2 y PT5 (que corresponden a una razón celulosa/sulfato de 0.14 y 0.57, respectivamente, para cada fuente de carbono). Es posible que en los tratamientos CT7 y PT7 la baja concentración de celulosa y de sulfato limitara el desarrollo de las bacterias [25] y también la generación de voltaje.

Además de la proporción del carbono respecto al sulfato, también la concentración de estos compuestos en el medio de cultivo tuvo gran influencia en los resultados. Una misma razón másica carbono/sulfato se obtuvo con diferentes concentraciones de estos compuestos (Tabla 4.2). Al utilizar la misma razón carbono/sulfato, pero con diferente masa, es decir, diferente concentración, se generó una cantidad de voltaje distinta (Fig. 5.10 y 5.11). Esto fue notable en los tratamientos T6 y T8, cuya razón carbono/sulfato fue de 2.29, pero las concentraciones de ambos nutrientes fueron distintas. En el tratamiento T6, la concentración de carbono fue 0.89 % peso y de sulfato 0.39 % peso, mientras que en el T8 las concentraciones fueron de 0.22 % peso y 0.09 % peso, respectivamente. En estos casos se observó que el tratamiento T8 favoreció la producción de voltaje, tanto al utilizar celulosa (CT8) como papel (PT8).

De manera similar, al considerar la razón másica carbono/sulfato de 0.57 (tratamientos: T3, T5 y T7), los resultados variaron al utilizar concentraciones diferentes de carbono y sulfato. Se registró una mayor generación de voltaje en la condición donde el medio de cultivo tenía una concentración intermedia de carbono y sulfato (tratamiento T5), tanto con papel, como con celulosa.

En los tratamientos T2 y T4, cuya razón másica carbono/sulfato fue de 0.14, se registró un voltaje más alto en CT4 respecto a CT2 al utilizar celulosa (Fig. 5.10); pero al utilizar papel, se obtuvieron mejores resultados en PT2 que en PT4 (Fig. 5.11).

Es posible suponer que la concentración de los compuestos es muy importante para el desempeño de la celda, ya que puede influir en el desarrollo de las comunidades

bacterianas, pero además también se requiere considerar que la fuente de carbono puede influir dadas las diferencias entre los tratamientos T2 y T4 al utilizar celulosa o papel.

En las celdas control que no contaban con el consorcio microbiano, se registraron valores de voltaje muy bajos durante los primeros días, posteriormente se registró un incremento de voltaje paulatino a partir del día 20. En estas celdas el voltaje promedio fue menor a 80 mV y no se observó ningún pico de voltaje.

Los resultados obtenidos con el lactato fueron inconsistentes, pobres y no fue posible observar un patrón en la generación de voltaje. En contraste, al utilizar celulosa y papel se observó un patrón en la generación de voltaje y se obtuvieron resultados muy similares en las réplicas de cada condición. Si bien, las variaciones de potencial no fueron idénticas, éstas tuvieron un comportamiento similar. Algunos autores han reportado una baja reproducibilidad al evaluar las celdas de combustible microbianas a pesar de considerar algunos factores como el inóculo, la temperatura, las características de la celda y el protocolo utilizado [88,89]. Existen factores y procesos multivariantes complejos que no se pueden controlar, tales como los procesos de transporte de masa y la competencia entre bacterias por los recursos. Las comunidades microbianas que se encuentran en los dispositivos pueden competir por el mismo sustrato o bien, distintos grupos de bacterias pueden degradar los compuestos [25,35,67]. Además, existen fenómenos de transporte de masa como el biogás que se difunde hacia arriba, pero es retenido por el sedimento. Además, el sedimento puede limitar la transferencia de masa de materia orgánica y de productos, lo que a su vez, puede provocar una baja reproducibilidad en los resultados [90].

La concentración de sulfato presente de forma natural en el sedimento (1.3 mg/g) es baja en comparación con las cantidades de sulfato añadidas a los dispositivos utilizados en la fase IV. El sulfato agregado en el nivel bajo (1.0 mg/g en los tratamientos T7, T8 y T9) fue similar al encontrado en el sedimento ambiental y, por lo tanto, su concentración final se calcula que fue de 2.3 mg/g. En los tratamientos de la fase IV en los que se colocó un nivel medio de sulfato (3.9 mg/g en los tratamientos T4, T5 y T6), la concentración final fue unas 3 veces mayor que la concentración de sulfato originalmente presente en el sedimento. En las unidades experimentales que utilizaron el nivel alto de sulfato (15.6 mg/g en los tratamientos T1, T2 y T3), la concentración colocada representó una cantidad diez veces mayor que la encontrada en las muestras de sedimento.

Así, las pruebas de la fase IV en las concentraciones intermedias y altas de sulfato, se llevaron a cabo con un enriquecimiento importante de sulfato respecto a los niveles originales en el sedimento. En contraste, la cantidad de celulosa agregada en los tratamientos T1, T4 y T7 (1.3 mg/g) representa sólo una pequeña proporción del total de carbohidratos presentes en el sedimento original, ya que en T2, T5 y T8, la cantidad colocada (5.0 mg/g) fue similar a los valores de carbohidratos encontrados en las muestras de sedimento (8.2 mg/g). Si bien hay que considerar que, en los tratamientos T3, T6 y T9, la celulosa agregada (20.0 mg/g) fue 2.5 veces mayor que los carbohidratos presentes en el sedimento. Sin duda, las bacterias también podrían utilizar los carbohidratos totales presentes de forma natural en el sedimento, a pesar de lo cual, el enriquecimiento de

carbono permitió observar el efecto de cada tratamiento en la generación de voltaje. Se apreció que un enriquecimiento de la fuente de carbono en el sedimento en ciertas cantidades derivó en un incremento en la generación de voltaje.

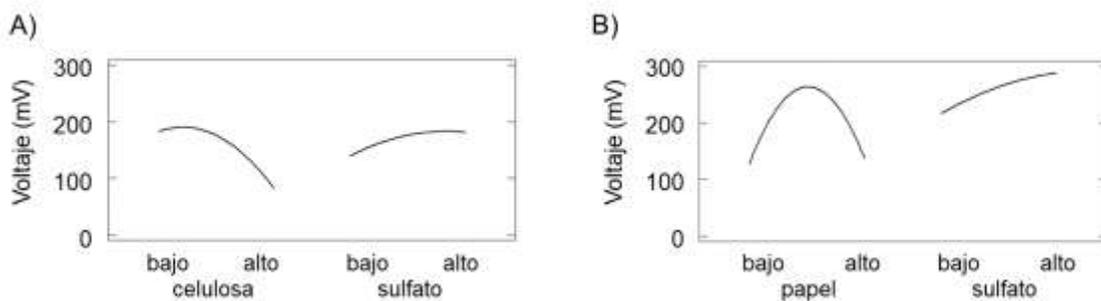
Existen además otros factores que influyen en el aprovechamiento del carbono. Se ha reportado que la temperatura y el tiempo de esterilización son factores importantes para la liberación de materia orgánica disuelta a partir de la materia orgánica contenida en el sedimento [90].

La celulosa ha sido utilizada previamente por otros autores en las celdas de combustible microbianas para la generación de electricidad [8,11,90,91]. Sajana *et al.* [11] reportaron que la adición de 2 % peso de celulosa aumenta la generación de voltaje (valor máximo de 970 mV) en las celdas de combustible microbianas de sedimento, pero al usar una concentración del 4 % peso, la generación de voltaje se retrasa y disminuye alrededor de 150 mV. En contraste, Bhande *et al.* [9] reportan que al adicionar 6 % peso de celulosa se genera un voltaje mayor (680 mV), respecto al valor de 480 mV del control (sin adición de celulosa). Estos resultados pueden estar influenciados por la cantidad de materia orgánica presente en el sedimento utilizado en cada estudio. Por lo tanto, es importante analizar las características del sedimento utilizado. Además, la celulosa como fuente de carbono presenta características que deben ser consideradas al trabajar en las celdas microbianas. La degradación de la celulosa es un proceso complejo que genera varios productos que son utilizados por varios grupos de bacterias. Estas a su vez producen otros compuestos más simples que pueden estar relacionados con la generación de electricidad [11,46]. Sin embargo, cuando la cantidad de materia orgánica disponible es alta, se puede presentar una inhibición de los microorganismos por la acumulación de ácidos grasos, por ejemplo, al incrementar la concentración de celulosa [11].

#### **5.4.5 Fase V: Análisis del modelo superficie de respuesta y comprobación**

##### Análisis del modelo superficie de respuesta

El análisis de los resultados del diseño factorial, descrito en la fase IV, se llevó a cabo con el modelo de superficie de respuesta. La gráfica de efecto de los factores incluidos en el diseño factorial (Fig. 5.12), mostró que la concentración de carbono en los niveles bajo-medio favorece la generación de voltaje al utilizar celulosa, y que el voltaje disminuye al incrementar su concentración. En el caso del papel, la concentración en el nivel medio favorece la generación de voltaje, y al disminuir o aumentar su concentración, la producción de voltaje se reduce. Por otra parte, al aumentar la concentración de sulfato, se obtiene un efecto positivo en la generación de voltaje, tanto en los tratamientos con celulosa, como con papel.



**Figura 5.12.** Gráfica de efecto de los factores en la generación de voltaje. Factores: fuente de carbono a partir de celulosa (A) o papel (B) y el sulfato.

El modelo de superficie de respuesta se elaboró con los resultados del diseño factorial al utilizar celulosa (Fig. 5.10) y papel (Fig. 5.11) como fuentes de carbono. A partir del modelo se obtuvieron ecuaciones polinomiales de segundo orden para estimar la generación de voltaje con distinto contenido de carbono y sulfato al utilizar celulosa (ecuación 5.1) y al utilizar papel (ecuación 5.2).

$$V = 176.13 - 49.74C + 20.37S - 43.44C^2 + 39.16CS - 15.46S^2 \quad (\text{ec. 5.1})$$

$$V = 263.90 - 4.96P + 35.71S - 131.29P^2 + 50.98CS - 11.11S^2 \quad (\text{ec. 5.2})$$

Donde: V = voltaje (mV), C = concentración de celulosa (ecuación 5.1), P = concentración de papel (ecuación 5.2), S = concentración de sulfato.

El análisis estadístico del modelo por medio de ANOVA se muestra en las tablas 5.1 (celulosa) y 5.2 (papel). Un valor de F alto con un valor de p bajo indica que el modelo de regresión es significativo. El valor de p también indica la importancia de cada término de la ecuación para la generación de voltaje y la interacción de los términos. La celulosa (C) y los términos celulosa-sulfato (CS) fueron estadísticamente significativos (Tabla 5.1), mientras que, en el diseño experimental con papel, los términos sulfato (S) y papel-papel ( $P^2$ ) y papel-sulfato (PS) fueron estadísticamente significativos (Tabla 5.2). Esto indica que el ajuste del modelo utilizando papel fue mejor que el de celulosa.

**Tabla 5.1.** Análisis de varianza (ANOVA) de la generación de voltaje en la columna de Winogradsky al utilizar celulosa como fuente de carbono.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
C: celulosa	44541	1	44541	15.15	<b>0.001*</b>
S: sulfato	7470	1	7470	2.54	0.127
CC	11324	1	11324	3.85	0.065
CS	18408	1	18408	6.26	<b>0.022*</b>
SS	1434	1	1434	0.49	0.493

\* Diferencias estadísticas; CC, interacción celulosa-celulosa; CS, interacción celulosa-sulfato; SS, interacción sulfato-sulfato.

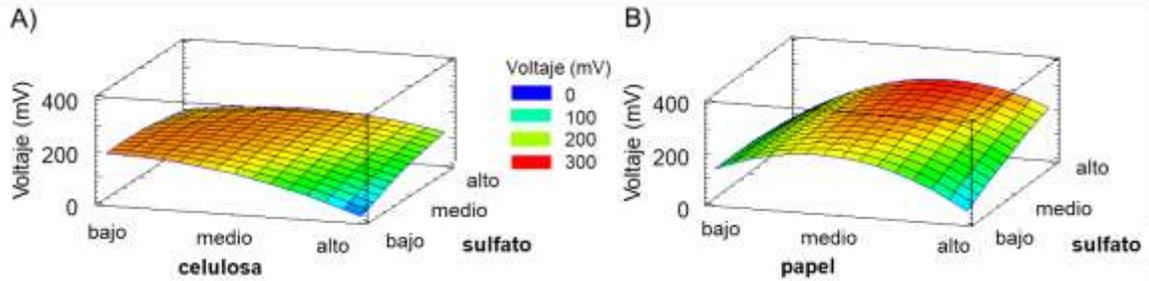
**Tabla 5.2.** Análisis de varianza (ANOVA) de la generación de voltaje en la columna de Winogradsky al utilizar papel como fuente de carbono.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
P: papel	443	1	443	0.45	0.513
S: sulfato	22955	1	22955	23.08	<b>0.0001*</b>
PP	103429	1	103429	103.99	<b>0.0000*</b>
PS	31181	1	31181	31.35	<b>0.0000*</b>
SS	740	1	740	0.74	0.3989

\* Diferencias estadísticas; PP, interacción papel-papel; PS, interacción papel-sulfato; SS, interacción sulfato-sulfato.

El valor de  $R^2$  indica el valor la correlación entre los valores observados y la predicción por el modelo. Al usar celulosa como fuente de carbono el valor de  $R^2$  fue de 0.62, mientras que al usar papel el valor de  $R^2$  fue de 0.89. Lo anterior indica que el modelo generado con papel como fuente de carbono podría predecir mejor la generación de voltaje con diferentes concentraciones de papel y sulfato.

A partir del modelo de superficie de respuesta se obtuvieron las condiciones para maximizar la generación de voltaje (Fig. 5.13). La concentración recomendada de celulosa fue 0.25 % peso y 0.85 % peso de sulfato ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), que representan una razón másica carbono/sulfato de 0.34. En el caso del papel, el máximo se calculó en 0.64 % peso de papel y 4 % peso de sulfato ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) lo que representa una razón másica carbono/sulfato de 0.18.

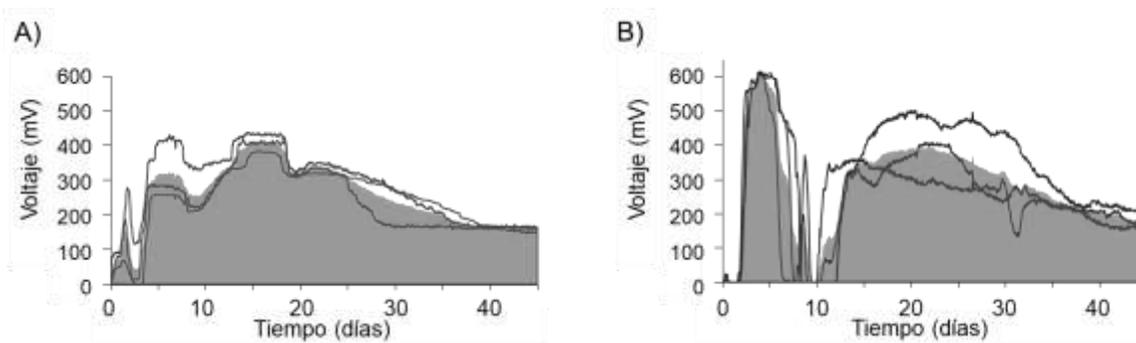


**Figura 5.13.** Gráfica del modelo de superficie de respuesta para encontrar las condiciones en las que se maximiza la generación de voltaje en función de la razón carbono/sulfato al utilizar celulosa (A) y papel (B) como fuente de carbono.

#### Comprobación de las condiciones sugeridas por el modelo de superficie de respuesta

Al probar las condiciones calculadas por el modelo de superficie de respuesta se obtuvo un incremento en la generación de voltaje (Fig. 5.14). El promedio del voltaje generado al utilizar celulosa fue de 257 mV con un máximo de 400 mV, que fue un valor superior al obtenido en las condiciones probadas previamente, en las cuales el promedio fue de 227 mV en la condición (CT4).

Al utilizar la condición propuesta por el modelo con el uso de papel, se registró un máximo de 600 mV, que fue mayor al voltaje generado en las condiciones anteriores; en este caso se obtuvo un promedio de 283 mV. Este valor fue más alto que el promedio del tratamiento PT5 (275 mV). El uso del modelo de superficie de respuesta permitió obtener un incremento en la generación de voltaje al cambiar la proporción de carbono orgánico y sulfato del medio de cultivo. Es importante resaltar que, al utilizar las condiciones óptimas, la generación de voltaje fue más estable con celulosa. Esto podría estar relacionado con las proporciones de celulosa y sulfato necesarias para que se lleven a cabo las reacciones de sulfato-reducción. Mientras que al utilizar el papel como fuente de carbono, la generación de voltaje fue irregular con un comportamiento similar a la condición previa PT3. Los voltajes generados con las condiciones propuestas por el modelo no fueron tan estables como los registrados previamente en la fase IV (tratamientos PT2 y PT5 de la figura 5.11).



**Figura 5.14.** Generación de voltaje en celdas con las condiciones resultantes del análisis de superficie de respuesta para incrementar la producción de voltaje con: A) celulosa (0.25 % peso) y sulfato (0.85 % peso) con una razón másica carbono/sulfato de 0.34 y B) papel (0.64 % peso) y sulfato (4 % peso) con una razón másica carbono/sulfato de 0.18.

La diferencia de potencial que se generó en estas columnas se debió a las comunidades bacterianas que se desarrollaron en la zona inferior y superior de la columna de Winogradsky, con una distancia de 7 cm. Se ha reportado que al incrementar la distancia entre electrodos también se registra una mayor generación de voltaje. Un ánodo enterrado en el sedimento a 10 cm de profundidad genera cuatro veces más voltaje que un ánodo enterrado a 2 cm de profundidad, esto se debe a que el potencial redox es más negativo al aumentar la profundidad [26]. Bhande *et al.* [9] y Sajana *et al.* [11] reportan altos voltajes (684 y 950 mV, respectivamente), en celdas de combustible microbianas de sedimento con 150 cm de altura y aireación en la zona superior. Tales condiciones favorecen un ambiente más reductor en la zona inferior y uno más oxidante en la zona superior. En el presente estudio se incrementó la generación de voltaje por arriba de los 300 mV y un máximo de 600 mV al cambiar la proporción de celulosa y sulfato en una columna de Winogradsky de 12 cm de altura.

Pocos investigadores han empleado un modelo superficie de respuesta para incrementar la generación de voltaje e identificar el efecto de diferentes factores en sistemas bioelectroquímicos. Al-Shehri *et al.* [39] lograron incrementar la generación de voltaje de 684 mV a 738 mV (aumento del 8 %) al cambiar la composición del medio de cultivo en una celda de combustible microbiana de dos cámaras. Este sistema presenta características distintas porque no tiene sedimento, sin embargo, en las celdas microbianas con sedimento, probadas en el presente estudio, también se logró un incremento en la generación de voltaje. En el presente estudio al usar celulosa en el nivel propuesto por el modelo se obtuvo un incremento del 20 % con respecto al tratamiento CT5 (Fig. 5.10) y el doble de producción de voltaje en comparación con la primera condición evaluada (Fig. 5.3). Al utilizar papel en el nivel óptimo se alcanzó un pico inicial de voltaje de 600 mV, esto representa el triple al compararlo con los 200 mV de primera condición evaluada (Fig. 5.3).

Se consideró importante conocer la comunidad bacteriana presente en los dispositivos por lo que se seleccionaron algunos tratamientos para poder comparar las comunidades y explicar la generación de voltaje.

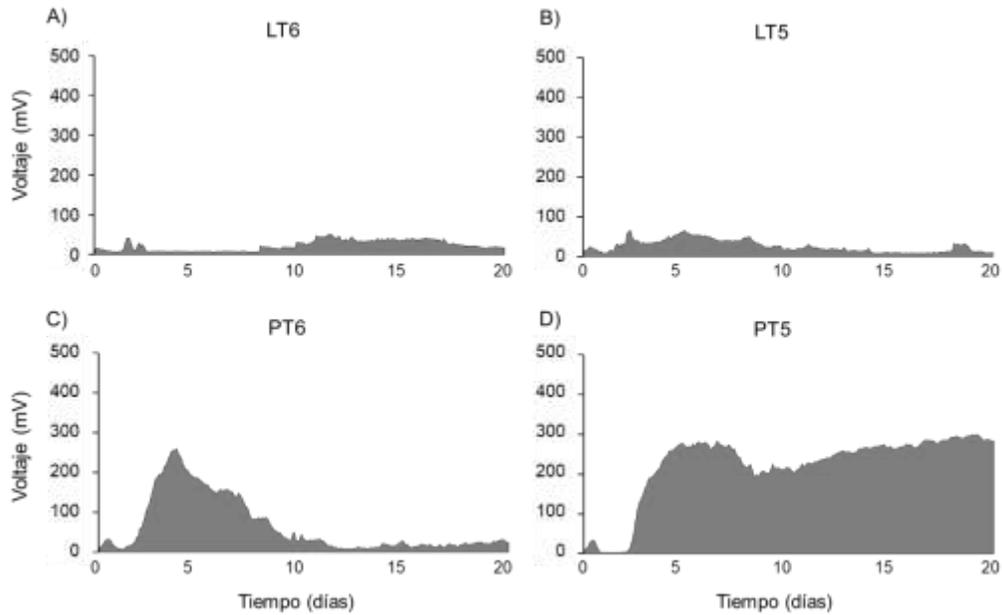
## **5.5 Comunidad bacteriana en dispositivos con diferentes nutrientes**

Se seleccionó el tratamiento con papel PT5 (Fig. 5.11) para analizar la comunidad bacteriana y relacionar los grupos de bacterias con la generación de voltaje. En este tratamiento se registró un voltaje constante, que podría estar relacionado con condiciones biológicas estables. Además, se seleccionaron tres tratamientos en los que la generación de voltaje fue casi nula para comparar las comunidades bacterianas con respecto al tratamiento PT5 con la finalidad de distinguir los grupos de bacterias que favorecen la generación de voltaje. Las condiciones con menor generación de voltaje fueron: dos con lactato (LT5 y LT6; Fig. 5.9) y otro con papel (PT6; Fig. 5.11).

Los resultados de esta sección se presentan en el orden: LT6, LT5, PT6 y PT5 para facilitar la descripción de las comunidades microbianas donde el voltaje fue limitado (LT6, LT5, PT6) con respecto al tratamiento (PT5) donde se favoreció la generación de voltaje.

### **5.5.1 Generación de voltaje en los tratamientos para el análisis de la comunidad bacteriana**

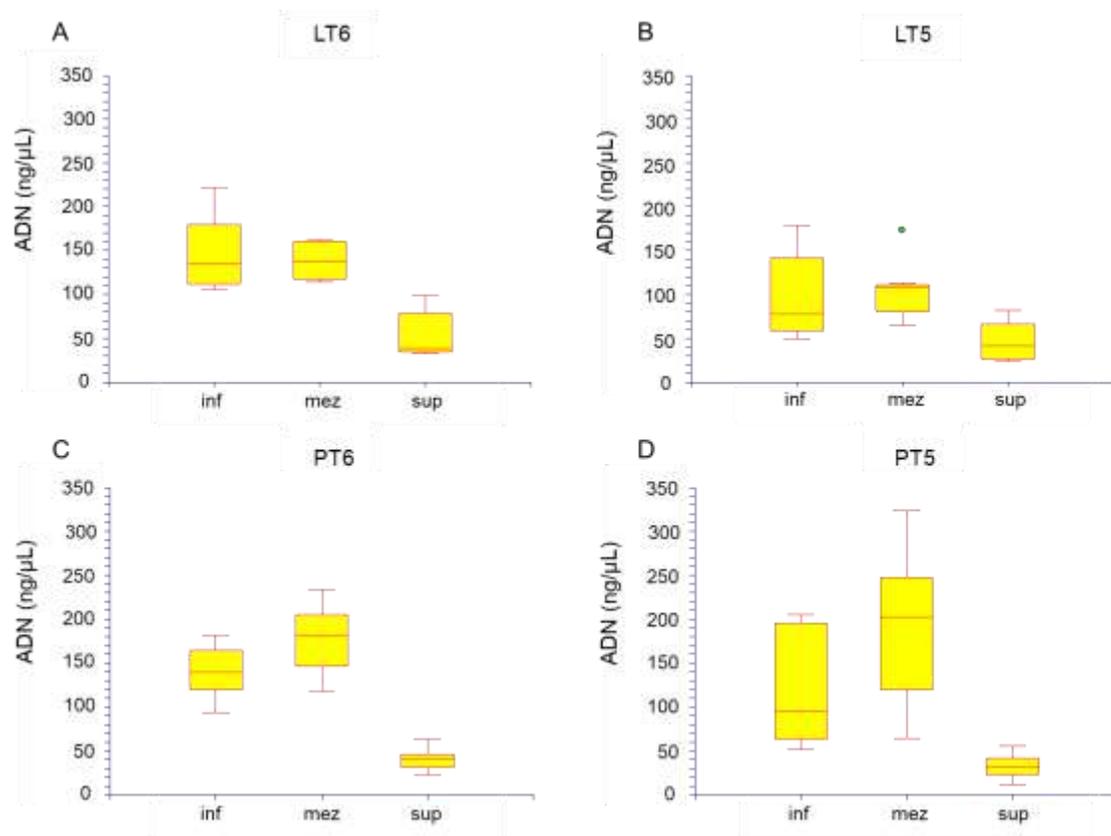
Los 4 tratamientos se elaboraron por quintuplicado y se midió el voltaje en los dispositivos durante 19 días (Fig. 5.15). Los tratamientos de lactato generaron un voltaje muy bajo, menor a 100 mV. En el tratamiento PT6, con alta concentración de papel, se observó un pico de voltaje de 270 mV en el día 4. En el tratamiento PT5, se generó un voltaje entre los 200 y 300 mV a partir del día 4.



**Figura 5.15.** Promedio del voltaje generado con 5 réplicas de cuatro tratamientos A) LT6, B) LT5, C) PT6 y D) PT5. En una celda microbiana de sedimento monitoreada por 19 días antes de tomar las muestras para la extracción de ADN.

### 5.5.2 Extracción de ADN para el análisis de metagenómica

En el día 19 se tomaron las muestras para extraer el ADN e identificar la comunidad bacteriana por secuenciación masiva. La concentración de ADN en las celdas microbianas de sedimento fue mayor en la zona inferior y en la muestra de mezcla, mientras que la concentración de ADN en la zona superior (agua) fue menor (Fig. 5.16). Estos resultados coinciden con lo reportado en varios trabajos que indican una mayor concentración de microorganismos en sedimento que en la columna de agua [92]. La concentración de ADN de muestras ambientales de suelo se ha relacionado con la cantidad de biomasa bacteriana [74]; y se ha utilizado para evaluar la biomasa microbiana en suelo con distintos tratamientos [93].



**Figura 5.16.** Concentración de ADN en muestras de los tratamientos A) LT6, B) LT5, C) PT6 y D) PT5 de las muestras de la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).

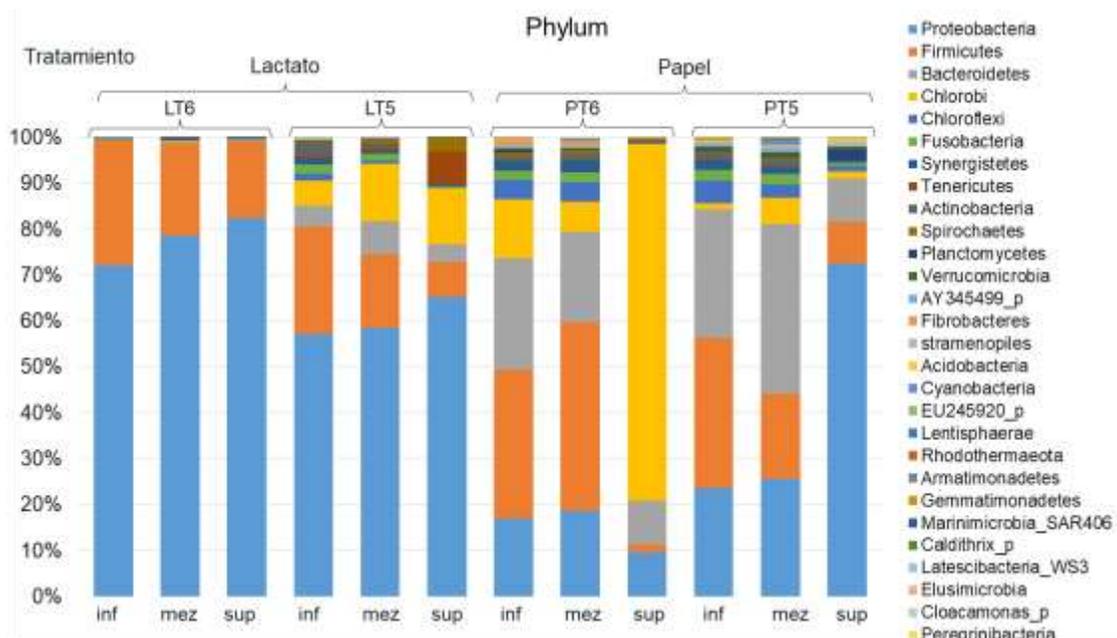
Aparentemente la cantidad de biomasa bacteriana de las diferentes zonas (Fig. 5.16) no tiene relación con la generación de voltaje (5.15). Sin embargo, la composición de la comunidad bacteriana puede influir en la cantidad de voltaje generado. La presencia o ausencia de algunos grupos bacterianos puede determinar las reacciones metabólicas que ocurrirán, la concentración de los productos metabólicos y el gradiente de condiciones redox a lo largo de la columna de Winogradsky [21].

### 5.5.3 Composición de la comunidad bacteriana

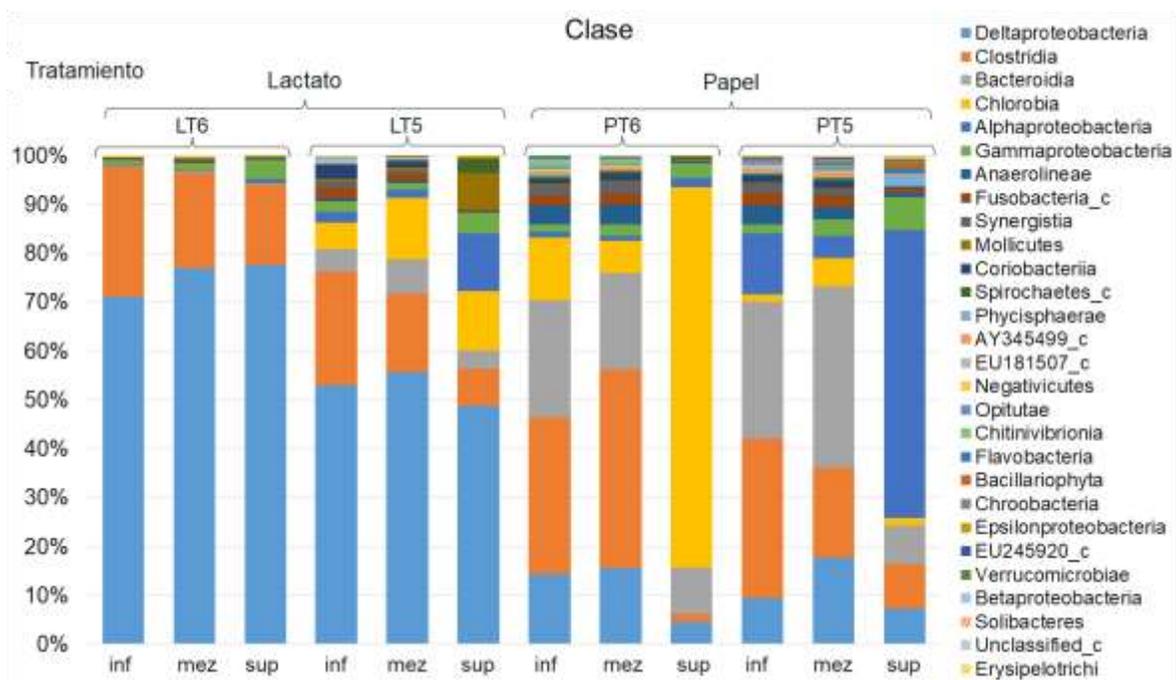
La secuenciación masiva de la región V3 del gen 16S y el análisis bioinformático permitieron conocer la comunidad bacteriana presente en los distintos tratamientos. Se obtuvo un total de 1,975,598 fragmentos, después de la alineación el total fue de 1,737,664 y con la eliminación de secuencias quiméricas el total fue de 1,333,407. El tamaño mínimo de los fragmentos fue de 170 y el máximo de 250 pares de bases. La asignación taxonómica se realizó con la base de datos SILVA 132 y se obtuvieron en total 3902 unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Las curvas de rarefacción alcanzaron la asíntota por lo que el

número de lecturas fue adecuado (Fig. 8.10 a 8.13; anexo 9). Se observaron diferencias importantes en la estructura de la comunidad bacteriana en los distintos tratamientos y para cada muestra: zona inferior (sedimento), mezcla y zona superior (agua), esto se puede observar a nivel de phylum (Fig. 5.17), clase (Fig. 5.18) y orden (Fig. 5.19).

El phylum *Proteobacteria* fue abundante en los tratamientos con lactato. La clase *Deltaproteobacteria* fue muy abundante en los tratamientos LT6 (con 71 a 78 %) y LT5 (49 a 55 %). El phylum *Proteobacteria* también fue abundante en la zona superior del tratamiento PT5, con una abundancia del 73 %, pero en este caso la clase dominante fue *Alphaproteobacteria* con un 59 %, y sólo el 7 % fueron *Deltaproteobacteria* y 7 % *Gammaproteobacteria*. El phylum *Firmicutes*, clase *Clostridia* estuvo presente en todos los tratamientos y fue más abundante en la zona inferior (23 a 32 %) y mezcla (16 a 40 %), respecto a la muestra de la zona superior (2 a 17 %). La clase *Bacteroidia* (phylum *Bacteroidetes*) fue más abundante en los tratamientos con el papel (PT6 y PT5), con 20 a 37 % en la zona inferior y mezcla, mientras que en los tratamientos LT6 y LT5, la abundancia de la clase *Bacteroidia* fue menor al 7 %. La clase *Chlorobia* (phylum *Chlorobi*) fue muy abundante (78 %) en la zona superior del tratamiento PT6, y en los demás tratamientos y zonas, su abundancia fue del 1 % al 13 %, a excepción del tratamiento LT6 donde fue menor al 0.02 % (Fig. 5.17 y 5.18).



**Figura 5.17.** Composición de las comunidades bacterianas a nivel de phylum con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).



**Figura 5.18.** Composición de las comunidades bacterianas a nivel de clase con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).

La figura 5.19, muestra los resultados de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de orden en los distintos tratamientos.

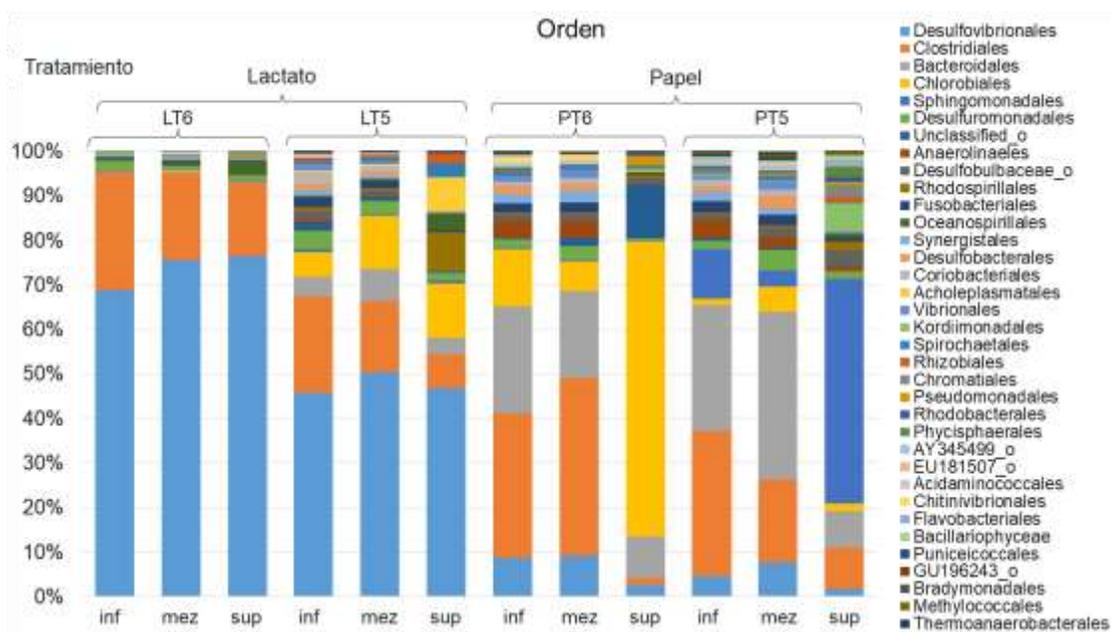
Al utilizar el lactato en concentración alta (tratamiento LT6); los órdenes más abundantes fueron los *Desulfurovibrionales* (69 a 76 %), seguido por *Clostridiales* (17 a 27 %), *Oceanospirillales* (0.6 a 3 %) y *Desulfuromonadales* (1 a 2 %). También se presentaron otros órdenes, pero la abundancia de estos fue menor al 1 %.

Con una concentración baja de lactato (tratamiento LT5), los órdenes *Desulfurovibrionales* (45 a 50 %) y *Clostridiales* (16 a 21 %) fueron muy abundantes, aunque también fueron predominantes otros órdenes, entre ellos los *Chlorobiales* (5 a 12 %), *Bacteroidales* (4 a 7 %), *Desulfuromonadales* (2 a 4 %), *Acholeplasmatales* (0.4 a 7 %), *Oceanospirillales* (0.4 a 4 %), *Spirochaetales* (0.3 a 3 %), *Rhizobiales* (0.5 a 2 %), *Fusobacteriales* (0.4 a 2 %), *Rhodospirillales* (8 %) y otros órdenes cuyas abundancias relativas fueron menores al 1%.

Al utilizar el papel en concentración alta (tratamiento PT6) en la zona inferior y en la mezcla el orden más abundante fue *Clostridiales* (32 a 39 %), seguido de *Bacteroidales* (19 a 24 %), *Desulfovibrionales* (9 %), *Chlorobiales* (7 a 13 %), *Anaerolineales* (4 %), *Fusobacteriales* (2 %), *Synergistales* (2 %), *Vibrionales* (1 a 2 %), *Chitinivibrionales* (1 %) y otros menores al 1%. En la zona superior el orden *Chlorobiales* fue el más abundante con 66 %, seguido por *Bacteroidales* (9 %), *Desulfovibrionales* (2.5 %), *Pseudomonadales* (2

%) y otros órdenes, es importante mencionar que en este tratamiento se registró un alto número de casos no clasificados (12 %).

Con la concentración baja de papel (tratamiento PT5), los órdenes más abundantes en la zona inferior fueron los *Clostridiales* (18 a 32 %), *Bacteroidales* (28 a 36 %), *Desulfovibrionales* (5 a 7 %), *Chlorobiales* (1 a 6 %), *Sphingomonadales* (3 a 11 %), *Desulfuromonadales* (2 a 4 %), *Anaerolineales* (2 a 4 %), *Desulfobacterales* (1 a 3 %), *Fusobacteriales* (2 %), *Synergistales* (1 a 2 %), *Vibrionales* (1 a 2 %), *Coriobacteriales* (1 %) y otros órdenes menos abundantes (< 1 %). La composición de la comunidad bacteriana de la zona superior fue radicalmente diferente, con mayor número de *Sphingomonadales* (48 %), seguido por *Clostridiales* (9 %), *Bacteroidales* (8 %), *Kordiimonadales* (6 %), *Chromatiales* (2.5 %), *Phycisphaerales* (2 %), *Desulfovibrionales* (1.6 %), *Chlorobiales* (1.5 %), *Desulfuromonadales* (1.5 %), *Rhizobiales* (1 %), *Rhodobacterales* (1 %), *Flavobacteriales* (1 %), *Bacillariophyceae* (1 %) y otros órdenes cuyas abundancias representaron menos del 1 %.



**Figura 5.19.** Composición de las comunidades bacterianas a nivel de orden con los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 en la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).

El número de casos no clasificados fue mayor en niveles taxonómicos más específicos. A nivel orden el porcentaje de casos no clasificados fue menor al 2 %, excepto en el tratamiento PT6 de la zona superior, donde que fue de 12 %. A nivel familia el porcentaje de no clasificados fue de 0.17 % (LT6 zona superior) hasta 50 % (PT6 zona superior). Mientras que a nivel género, el porcentaje de no clasificados fue de 29 % (PT6 zona inferior)

hasta 78 % (PT6 zona superior). Los porcentajes de la composición bacteriana y los casos no clasificados a nivel familia y género se muestran en el anexo 10 (Fig. 8.14 y 8.15, respectivamente).

Los órdenes *Desulfovibrionales* y *Desulfobacterales* estuvieron presentes en todas las muestras. Estos se caracterizan por ser bacterias anaerobias capaces de reducir el sulfato [19,94]. Las bacterias del orden *Clostridiales* son anaerobias y el género *Clostridium* tiene algunas especies capaces de degradar la celulosa [45,95]. El orden *Chlorobiales* corresponde a bacterias fototróficas anoxigénicas del azufre que oxidan el sulfuro de hidrógeno [19,48]. El orden *Bacteroidales* que tiene bacterias facultativas que son capaces de degradar compuestos orgánicos complejos como la celulosa [45]. Este grupo de bacterias estuvo presente en los tratamientos LT5, PT6 y PT5, pero fue más abundante en la zona inferior y la mezcla de los tratamientos con papel. El orden *Sphingomonadales* presenta especies aerobias y facultativas que son consideradas heterótrofas [20].

Algunos grupos de bacterias se consideran bioindicadores de diferentes zonas en la columna de Winogradsky, tal es el caso de *Deltaproteobacteria* (reductores de sulfato), *Firmicutes* (*Clostridiales*) y *Bacteroidales*, que fueron distintivos de la zona inferior, [19] y *Sphingomonadales* que fueron abundantes en la zona superior [20]. Sin embargo, es importante considerar que dentro de las clases y órdenes es frecuente encontrar géneros y especies con diferentes características metabólicas [48]. Por ejemplo, los géneros *Clostridium* y *Acidaminobacter* que pertenecen al orden *Clostridiales* son anaerobias, sin embargo, *Clostridium* es Gram-positiva, formadora de endosporas y suele producir mezclas de ácidos orgánicos y alcoholes por la fermentación de carbohidratos, mientras que, el género *Acidaminobacter* es Gram-negativa, no formadora de esporas, y el acetato es el principal producto de fermentación [96]. Por lo tanto, es conveniente realizar un análisis a nivel de género para obtener información relevante.

Para el análisis a este nivel taxonómico, se consideraron los géneros que presentaron una abundancia mayor al 1 %, los cuales se muestran en las tablas 5.3 y 5.4. Los géneros con abundancia inferior al 1 % se consideraron raros [19] y no fueron incluidos en el análisis.

Los géneros más abundantes en el tratamiento LT6 incluyeron a *Desulfomicrobium* (orden *Desulfovibrionales*) bacteria anaerobia, Gram-negativa, sulfato-reductora que utiliza compuestos orgánicos simples como lactato, piruvato, etanol y formiato [94]. El segundo género más abundante fue *Clostridium*. En el tratamiento LT5, *Desulfomicrobium* también fue el género más abundante, y otros géneros anaerobios como *Chlorobaculum*, *Proteiniclasticum*, *Pelobacter*, *Mangroviflexus*, *Acidaminobacter* y *Clostridium* se encontraron en diferentes porcentajes (Tabla 5.3).

Los tratamientos con papel (PT6 y PT5; Tabla 5.4) presentaron géneros anaerobios en la zona inferior, como *Mangroviflexus*, *Desulfomicrobium* y otros. En la zona superior del tratamiento PT6, fue abundante *Chlorobaculum* (orden *Chlorobiales*), bacteria anaerobia verde del azufre que oxida el sulfuro y usa CO<sub>2</sub> para formar carbohidratos [48]. En cambio, en el tratamiento PT5, la zona superior presentó bacterias facultativas como

*Draconibacterium*, *Novosphingobium* y *Muricauda*, entre otras. También se detectaron bacterias aerobias como *Kordiimonas*, *Loktanella*, *Luteolibacter* y diatomeas (*Pleurosigmataceae*, *Gyrosigma*) (Tabla 5.4).

**Tabla 5.3.** Abundancia relativa de los géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con lactato (tratamientos LT6 y LT5).

LT6 zona inferior		LT6 zona superior		LT5 zona inferior		LT5 zona superior	
géneros	%	géneros	%	géneros	%	géneros	%
<i>Desulfomicrobium</i>	64.8	<i>Desulfomicrobium</i>	65.7	<i>Desulfomicrobium</i>	14.4	<i>Desulfomicrobium</i>	21.9
<i>Clostridium</i>	20.2	<i>Clostridium</i>	12.6	<i>Proteiniclasticum</i>	8.6	<i>Chlorobaculum</i>	15.9
<i>Pelobacter</i>	6.4	<i>Marinobacterium</i>	6.7	<i>Pelobacter</i>	8.2	<i>Azospirillum</i>	9.9
<i>Marinobacterium</i>	1.7	<i>Proteiniclasticum</i>	3.1	<i>Mangroviflexus</i>	5.8	AB598274_g (fam <i>Acholeplasmataceae</i> )	9.4
<i>Acidaminococcus</i>	1.3	<i>Pelobacter</i>	2.4	<i>Acidaminobacter</i>	5.2	<i>Marinobacterium</i>	6.8
Otros (raros)	5.7	<i>Alkaliphilus</i>	1.3	<i>Clostridium</i>	5.2	<i>Sphaerochaeta</i>	4.4
		<i>Desulfovibrio</i>	1.1	<i>Chlorobaculum</i>	4.0	<i>Proteiniclasticum</i>	2.8
		Otros (raros)	7.2	GQ396959_g (fam <i>Coriobacteriaceae</i> )	3.9	<i>Acidaminobacter</i>	2.7
				<i>Alkaliphilus</i>	2.6	<i>Pelobacter</i>	2.7
				<i>Propionigenium</i>	2.5	<i>Clostridium</i>	2.3
				<i>Ilyobacter</i>	2.5	<i>Mangroviflexus</i>	2.0
				<i>Desulfobulbus</i>	2.3	<i>Draconibacterium</i>	1.5
				<i>Photobacterium</i>	2.1	<i>Bartonella</i>	1.4
				<i>Desulfobacter</i>	1.9	Otros (raros)	16.1
				<i>Draconibacterium</i>	1.4		
				<i>Aminivibrio</i>	1.3		
				GQ396981_g (ord <i>Bacteroidales</i> )	1.3		
				<i>Azospirillum</i>	1.1		
				<i>Ercella</i>	1.1		
				<i>Desulfuromonas</i>	1.1		
				Otros (raros)	23.4		

**Tabla 5.4.** Abundancia relativa de los géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con papel (tratamiento PT6 y PT5).

PT6 zona inferior		PT6 zona superior		PT5 zona inferior		PT5 zona superior	
géneros	%	géneros	%	géneros	%	géneros	%
AB239481_g (fam <i>Christensenellaceae</i> )	21.3	<i>Chlorobaculum</i>	45.8	<i>Mangroviflexus</i>	9.4	<i>Mangroviflexus</i>	9.0
<i>Mangroviflexus</i>	17.9	<i>Draconibacterium</i>	13.6	AB239481_g (fam <i>Christensenellaceae</i> )	7.9	<i>Proteiniclasticum</i>	6.7
<i>Desulfomicrobium</i>	10.3	<i>Desulfomicrobium</i>	4.3	<i>Novosphingobium</i>	6.1	<i>Draconibacterium</i>	6.5
<i>Draconibacterium</i>	4.6	<i>Marinobacterium</i>	4.0	<i>Desulfomicrobium</i>	4.6	<i>Kordiimonas</i>	5.4
<i>Chlorobaculum</i>	3.3	<i>Pseudomonas</i>	2.3	<i>Sphingomicrobium</i>	4.5	<i>Novosphingobium</i>	5.1
<i>Acidaminobacter</i>	3.1	<i>Charonomicrobium</i>	2.2	AF286038_g (fam <i>Ruminococcaceae</i> )	4.4	AY771958_g (fam <i>Desulfobulbaceae</i> )	3.7
<i>Pelobacter</i>	2.5	<i>Sphaerochaeta</i>	2.1	<i>Draconibacterium</i>	3.5	<i>Desulfomicrobium</i>	2.7
<i>Desulfobacter</i>	2.2	<i>Proteiniclasticum</i>	1.7	<i>Acidaminobacter</i>	3.2	<i>Gyrosigma</i> ( <i>Pleurosigmataceae</i> )	2.4
LDWW_g (ord Chitinivibrionales)	2.1	FJ628299_g (ord <i>Bacteroidales</i> )	1.7	<i>Ercella</i>	3.0	<i>Acidaminobacter</i>	2.4
GQ249567_g (ord <i>Anaerolineales</i> )	2.0	<i>Kordiimonas</i>	1.2	<i>Ilyobacter</i>	2.8	<i>Pelobacter</i>	2.2
<i>Aminivibrio</i>	1.9	Otros (raros)	21.3	<i>Aminivibrio</i>	2.6	JF272039_g (fam <i>Phycisphaeraceae</i> )	2.1
<i>Photobacterium</i>	1.8			<i>Clostridium</i>	2.4	<i>Muricauda</i>	2.0
KE159538_g (fam <i>Lachnospiraceae</i> )	1.5			GQ396959_g (fam <i>Coriobacteriaceae</i> )	2.4	<i>Thiopfundum</i>	1.9
AF286038_g (fam <i>Ruminococcaceae</i> )	1.4			<i>Pelobacter</i>	2.2	<i>Magnetovibrio</i>	1.8
<i>Ilyobacter</i>	1.3			<i>Acetivibrio</i>	2.1	<i>Ercella</i>	1.8
GQ396959_g (fam <i>Coriobacteriaceae</i> )	1.2			<i>Sphingorhabdus</i>	2.1	<i>Chlorobaculum</i>	1.6
<i>Ercella</i>	1.2			GQ249567_g (ord <i>Anaerolineales</i> )	2.0	GQ249567_g (ord <i>Anaerolineales</i> )	1.5
<i>Proteiniclasticum</i>	1.0			FJ202371_g (fam <i>Lachnospiraceae</i> )	1.5	<i>Loktanella</i>	1.4
Otros (raros)	19.3			<i>Christensenella</i>	1.4	<i>Luteolibacter</i>	1.4
				HQ904159_g (fam <i>Ruminococcaceae</i> )	1.4	<i>Pseudomonas</i>	1.4
				<i>Herbinix</i>	1.2	<i>Ilyobacter</i>	1.3
				<i>Desulfobacter</i>	1.2	<i>Mesorhizobium</i>	1.3
				<i>Proteiniclasticum</i>	1.2	<i>Methylophaga</i>	1.2
				<i>Chlorobaculum</i>	1.1	Otros (raros)	33.4
				Otros (raros)	25.9		

En los tratamientos con lactato (LT6 y LT5) predominaron las bacterias anaerobias. En el tratamiento LT6 el porcentaje de bacterias anaerobias fue del 85 %. En el tratamiento LT5 fue superior al 50 %, si bien en este tratamiento también se presentaron bacterias facultativas (19 %) y aerobias (10 %). Es importante mencionar que el 10 % de bacterias aerobias correspondió al género *Azospirillum* que son bacterias púrpuras no del azufre, aerobias y microaerobias [97]. En el tratamiento PT6 también predominaron las bacterias anaerobias (74 % en la zona inferior y 54 % en la zona superior), aunque también se presentaron bacterias facultativas (24 % en la zona superior). En el tratamiento PT5 el porcentaje de bacterias anaerobias en la zona inferior también fue alto (52 %) y también tuvo presencia de bacterias facultativas y aerobias. Por otra parte, en la zona superior del tratamiento PT5 el porcentaje de bacterias anaerobias fue del 33 %, de bacterias facultativas de 22 % y de bacterias aerobias 13 %. En el tratamiento PT5 se generó un mayor voltaje lo que podría estar relacionado con el tipo de metabolismo de las bacterias. Debido a esto se elaboró una tabla para comparar el tipo de metabolismo de los géneros (con una abundancia mayor al 1 %) que se presentaron en la zona superior e inferior de los tratamientos (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Porcentaje de bacterias anaerobias, facultativas y aerobias en las zonas inferior y superior de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

Metabolismo	LT6 inferior	LT6 superior	LT5 inferior	LT5 superior	PT6 inferior	PT6 superior	PT5 inferior	PT5 superior
Aerobio	0.0	0.0	1.1	9.9	0.0	1.2	7.8	13.1
Facultativo	1.7	7.8	4.8	19.2	6.4	23.7	11.6	22.1
Anaerobio	86.2	85.1	70.7	54.8	74.3	53.8	52.5	32.7
Total	88.0	92.9	76.6	83.9	80.7	78.7	71.9	67.9

En esta tabla es posible observar la ausencia o un porcentaje bajo de bacterias aerobias en los tratamientos LT6 y PT6. También se observa una menor proporción de anaerobios en la zona superior del tratamiento PT5, así como mayor proporción de aerobios. La presencia de bacterias aerobias indica la presencia de oxígeno en la zona superior del tratamiento PT5 y esta condición oxidante incrementa la diferencia de potencial con respecto a la zona inferior (reductora) y se genera más voltaje.

Con el cambio de sustrato se modifica la comunidad microbiana y el metabolismo predominante en las columnas de Winogradsky. En el tratamiento LT6, la alta concentración de lactato limitó la diversidad de bacterias y también los procesos metabólicos siendo predominante la sulfato reducción que se atribuye al género *Desulfomicrobium* (orden *Desulfurovibrionales*) y la fermentación realizada por *Clostridium* (orden *Clostridiales*). En el tratamiento LT5, con la presencia del género *Chlorobaculum* (orden *Chlorobiales*)

bacteria fototrófica del azufre, también se lleva a cabo la oxidación del azufre, lo que cierra el ciclo del azufre y otros procesos anaerobios (Fig. 5.20 A y B).

Los tratamientos con papel favorecieron la presencia de bacterias hidrolíticas (orden *Bacteroidales*) que pueden degradar la celulosa en compuestos más simples y con esto también la activación de los procesos fermentativos. Además de que se aprecia que el ciclo del azufre estuvo activo por la presencia de bacterias sulfato-reductoras (orden *Desulfurovibrionales*) y fototróficas verdes del azufre (orden *Chlorobiales*). En el tratamiento PT5, se activaron más procesos, además de los anteriores, ya que también se registró la presencia de bacterias heterotróficas (órdenes *Sphingomonadales* y *Kordiimonadales*) y microorganismos fototróficos oxigénicos (diatomea *Gyrosigma*) en la zona superior de la columna (Fig. 5.20 C y D). La presencia de microorganismos fotoautótrofos oxigénicos puede asociarse con la generación de voltaje [13,14].



**Figura 5.20.** Procesos metabólicos predominantes en las columnas de Winogradsky (en negro) considerando las comunidades microbianas presentes en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

#### 5.5.4 Análisis de diversidad

Las tablas 5.3 y 5.4 muestran los géneros con una abundancia mayor al 1 %, sin embargo, existen más géneros, por lo que es posible tener información a través de los índices de diversidad. También se consideró importante asociar la diversidad y estructura bacteriana con la generación de voltaje.

##### Diversidad alfa

La diversidad alfa informa acerca de la variedad de especies que se presentan en una comunidad a través de la riqueza de especies y de la abundancia de cada especie [50]. La tabla 5.6 muestra los índices de diversidad alfa calculados de las comunidades bacterianas de las muestras de la zona inferior, superior y mezcla de las columnas de Winogradsky con distinto enriquecimiento. La mayor riqueza específica se encontró en el tratamiento PT5 con más de 379 géneros, mientras que el tratamiento LT6 fue el que presentó menor número de géneros. Esto también se puede observar con el índice de Margalef, ya que se obtuvieron valores superiores a 37.6 en el tratamiento PT5, e inferiores a 12.3 en el tratamiento LT6. El índice de Shannon indicó que la mayor diversidad, en términos de riqueza y equidad correspondió al tratamiento PT5. El índice de Berger-Parker nos indicó la dominancia de un género (*Desulfomicrobium*) en el tratamiento LT6 con valores mayores a 0.65. También en la zona superior del tratamiento PT6 se registró un valor alto de dominancia (0.46) que correspondió al género *Chlorobaculum*. La dominancia de Simpson, que considera la contribución de todos los géneros, también fue alta en las muestras del tratamiento LT6. Y el inverso del índice de Simpson, indicó mayor uniformidad en los tratamientos LT5 y PT5.

La mayor diversidad bacteriana se encontró en el tratamiento PT5, y se podría relacionar una mayor diversidad con una mayor generación de voltaje. Sin embargo, no se ha confirmado que una mayor diversidad mejore el desempeño de la celda [10,23,42]. Por ejemplo, Jung *et al.* [17] probaron cuatro electrodos anódicos (de grafito y magnesio, con y sin quitina) en una celda de combustible microbiana de sedimento y encontraron que la comunidad más diversa (en el electrodo de magnesio) y la menos diversa (en el electrodo de magnesio con quitina) generaron los voltajes y densidades de potencia más altos. Por lo tanto, es posible que en ese estudio el alto desempeño en el sistema dependiera principalmente del material anódico y no de la diversidad microbiana. Por otro lado, la generación de electricidad en las celdas de combustible microbianas de sedimento se ha relacionado con especies de bacterias de la clase *Deltaproteobacteria* presentes en el ánodo [1,10,17,98].

**Tabla 5.6.** Índices de diversidad alfa de las columnas de Winogradsky con diferentes nutrientes (tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5) de la zona inferior (inf), mezcla (mez) y zona superior (sup).

Tratamiento muestra	LT6			LT5			PT6			PT5		
	inf	mez	sup									
Riqueza	86	111	95	326	257	202	265	272	186	379	358	345
Margalef	9.6	12.3	10.3	35.9	29.1	21.2	28.5	30.3	22.1	39.1	38.1	37.6
Shannon	1.27	1.06	1.49	3.77	3.15	2.98	3.23	3.76	2.59	4.02	4.02	4.19
Berger-Parker	0.65	0.82	0.66	0.14	0.34	0.22	0.21	0.13	0.46	0.09	0.14	0.09
SimpsonD	0.46	0.67	0.45	0.05	0.13	0.10	0.10	0.05	0.23	0.03	0.04	0.03
SimpsonE	0.54	0.33	0.55	0.95	0.87	0.90	0.90	0.95	0.77	0.97	0.96	0.97

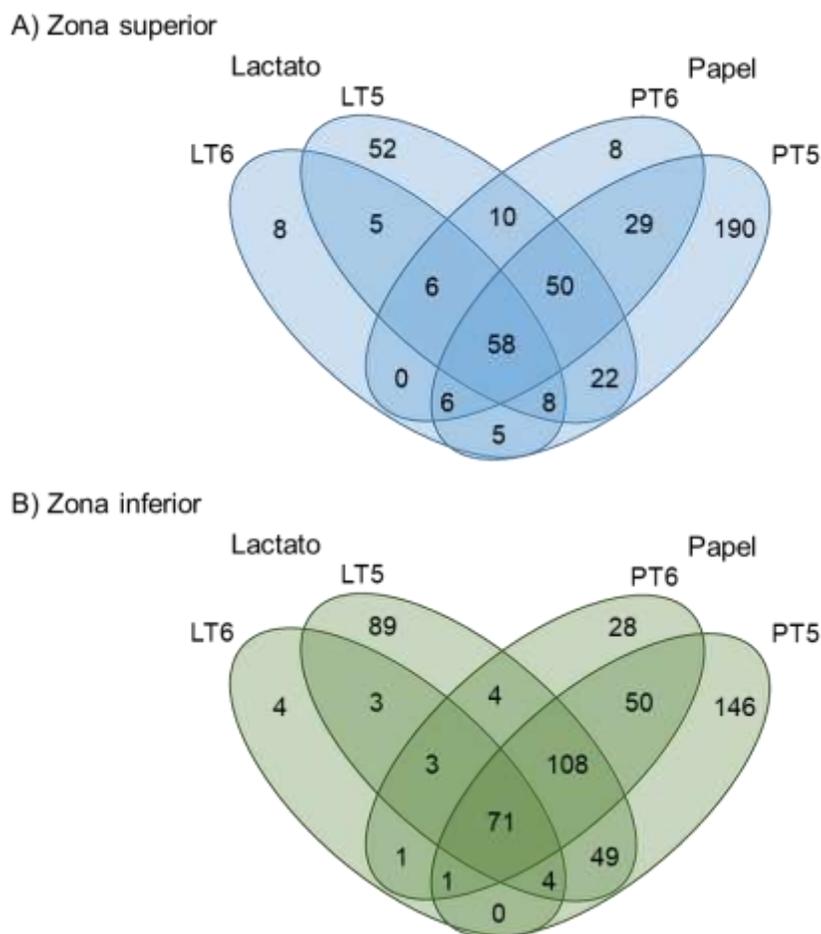
### Diversidad beta

La diversidad beta nos permite calcular el reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades, hábitats o gradientes ambientales [50]. Una manera de hacer comparaciones es contando las especies que son compartidas por distintos sitios y contar por separado los taxones que son exclusivos de cada sitio para crear un diagrama de Venn [99].

Los diagramas de Venn nos muestran el número de géneros que se presentan en los diferentes tratamientos y nos dan información sobre la similitud entre las comunidades bacterianas (Fig. 5.21). En la zona inferior fue posible observar que todos los tratamientos comparten 71 géneros. Los tratamientos LT6, PT6 y PT5 comparten 108 géneros, y los tratamientos PT6 y PT5 comparten 50 géneros. Se encontraron 4 géneros que fueron exclusivos en el tratamiento LT6, mientras que en el tratamiento PT5 fueron 146 géneros.

En la zona superior todos los tratamientos comparten 58 géneros. Los tratamientos LT6, PT6 y PT5 comparten 50 géneros. Se encontraron 8 géneros que fueron exclusivos en el tratamiento LT6 y otros 8 géneros exclusivos en el tratamiento PT6. En contraste, en el tratamiento PT5 se registraron 190 géneros exclusivos. Las diferencias en los grupos de bacterias en la zona superior del tratamiento PT5 podrían explicarse por la comunidad predominantemente aerobia que se presentó en esta condición (Tabla 5.5).

En otros trabajos se ha reportado el diagrama de Venn con las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) [42,92]. Sin embargo, es importante considerar que estas OTUs pueden incluir varias secuencias que podrían pertenecer a una especie de bacteria. Los diagramas de Venn de la zona inferior y superior con los OTUs se muestra en el anexo 11 (Fig. 8.16), y no se incluyeron en el presente análisis.



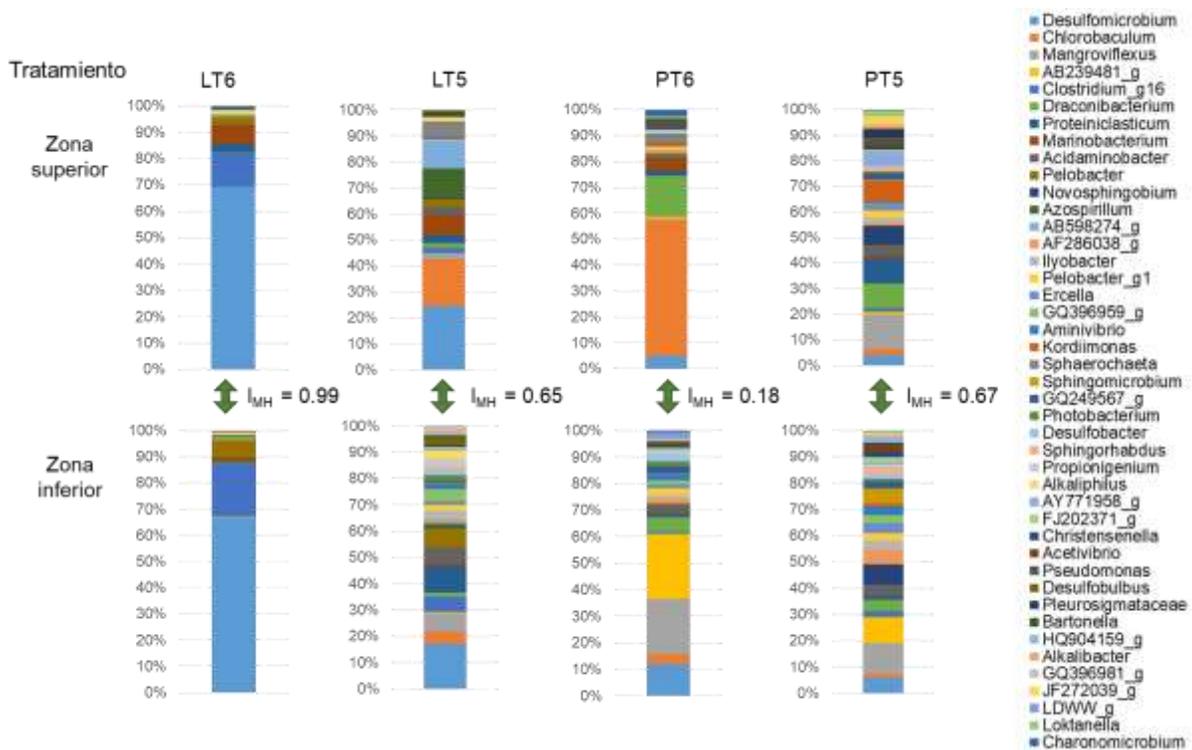
**Figura 5.21.** Diagramas de Venn con los géneros de bacterias presentes en la zona superior (A) e inferior (B) de la columna de Winogradsky en los distintos tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

La zona inferior y superior de la columna de Winogradsky se pueden considerar sitios con características distintas y por lo tanto, se esperan que se presenten diferentes comunidades bacterianas con grupos característicos de cada zona [19,20]. Los resultados del índice de Morisita-Horn para la zona inferior y superior de las columnas se muestran en la figura 5.22. Este índice tuvo un valor de 0.99 en el tratamiento LT6 e indicó que la comunidad bacteriana de la zona inferior fue muy similar a la comunidad de la zona superior. En el tratamiento LT5, la comunidad bacteriana presentó poca similitud entre la zona superior e inferior con un valor de 0.65. Este cambio se asoció a una mayor abundancia de los géneros *Chlorobaculum*, *Marinobacterium*, *Azospirillum* y *Sphaerochaeta* en la zona superior.

En el tratamiento PT6 el valor del índice de Morisita-Horn fue de 0.18, lo que indicó poca similitud de la comunidad bacteriana entre la zona inferior y superior. Los principales cambios en estas comunidades fueron una mayor abundancia de *Mangroviflexus* en la zona inferior y una mayor abundancia de *Chlorobaculum* y *Marinobacterium* en la zona superior.

En el tratamiento PT5, se registró un índice de 0.67, que indicó poca similitud entre la comunidad bacteriana de la zona inferior y superior. La zona superior presentó una mayor abundancia de *Kordiimonas*, *Draconibacterium*, *Proteiniclasticum* y *Gyrosigma* (*Pleurosigmataceae*). En la tabla 5.7 se muestran los géneros con una abundancia mayor al 1 % y que estuvieron presentes en la zona inferior, la zona superior y ambas zonas de este tratamiento.

Los nutrientes utilizados en la columna de Winogradsky modificaron la estructura de la comunidad microbiana a lo largo de la columna [19,20]. En los tratamientos LT6 y LT5 se presentaron, tanto en la zona inferior como superior, grupos de bacterias anaerobias como *Desulfomicrobium*, *Pelobacter* y *Clostridium*, que pertenecen a grupos de bacterias que se consideran bioindicadores de la zona inferior. En el tratamiento PT6, también se presentaron bacterias anaerobias en la zona inferior como, *Desulfomicrobium* y *Mangroviflexus*. En este tratamiento, la zona superior presentó al género *Chlorobaculum*, que fue muy abundante y es una bacteria anaerobia fototrófica del azufre que pertenece a los *Chlorobiales*. Este orden es considerado como bioindicador de zonas medias e inferiores de la columna [20]. En el tratamiento PT5, con concentraciones de papel y de sulfato similares a las utilizadas en estudios previos, se encontraron bioindicadores típicos reportados para las diferentes profundidades de la columna de Winogradsky. Como fue el caso de la clase *Alphaproteobacterias*, específicamente el orden *Sphingomonadales* que se ha reportado en la zona superior de la columna y del orden *Clostridiales* que fue abundante en la zona inferior [19,20].



**Figura 5.22.** Valor del índice de Morisita-Horn ( $I_{MH}$ ) que indican el recambio de géneros en la composición de las comunidades bacterianas entre la zona superior e inferior de la columna de Winogradsky en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

**Tabla 5.7.** Géneros presentes en diferentes zonas de las celdas con papel tratamiento PT5.

Géneros presentes en zonas:		
Inferior y superior	Inferior	Superior
<i>Mangroviflexus</i>	AB239481_g ( <i>Christensenellaceae</i> )	<i>Kordiimonas</i>
<i>Novosphingobium</i>	<i>Sphingomicrobium</i>	AY771958_g ( <i>Desulfobulbaceae</i> )
<i>Draconibacterium</i>	AF286038_g ( <i>Ruminococcaceae</i> )	<i>Gyrosigma</i> ( <i>Pleurosigmataceae</i> )
<i>Proteinclasticum</i>	<i>Aminivibrio</i>	JF272039_g ( <i>Phycisphaeraceae</i> )
<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Muricauda</i>
<i>Acidaminobacter</i>	GQ396959_g ( <i>Coriobacteriaceae</i> )	<i>Thiopfundum</i>
<i>Ercella</i>	<i>Acetivibrio</i>	<i>Magnetovibrio</i>
<i>Pelobacter</i>	<i>Sphingorhabdus</i>	<i>Loktanella</i>
<i>Ilyobacter</i>	FJ202371_g ( <i>Lachnospiraceae</i> )	<i>Luteolibacter</i>
GQ249567_g ( <i>Anaerolinaeles</i> )	<i>Christensenella</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Chlorobaculum</i>	HQ904159_g ( <i>Ruminococcaceae</i> )	<i>Mesorhizobium</i>
	<i>Desulfobacter</i>	<i>Methylophaga</i>
	<i>Herbinix</i>	

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que al cambiar la fuente de carbono y la razón carbono/sulfato se puede modificar la comunidad bacteriana y el gradiente de condiciones a lo largo de la columna. El tratamiento PT5 donde se favoreció la producción de voltaje presentó una comunidad muy diversa y su composición fue distinta en las diferentes zonas. La comunidad de la zona inferior fue característica de condiciones anaerobias, mientras que la comunidad de la zona superior presentó grupos de bacterias aerobias, facultativas y anaerobias. Esto puede ser una característica esencial para la generación de voltaje. En otros trabajos se ha propuesto que un biocatodo fototrófico aerobio favorece la generación de voltaje en celdas de combustible microbianas de sedimento [13].

### 5.5.5 Comunidad bacteriana y su relación con la generación de voltaje

Se ha sugerido que algunas bacterias electrógenas como *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, son capaces de transferir electrones directamente al electrodo a través de proteínas de membrana (citocromo c) o a través de nanocables (pili conductivo) [29,100]. Se ha reportado la presencia de especies del género *Geobacter* en celdas de combustible microbianas de sedimento [12]. Sin embargo, estas especies pueden estar ausentes o ser muy escasas en las columnas de Winogradsky [19,20,47]. Actualmente, se ha reportado que especies del género *Desulfovibrio* presentan el mismo sistema de nanocables y proteínas de citocromo c, que podrían ser útiles para la transferencia de electrones al ánodo [41]. El género *Desulfomicrobium* también presenta proteínas del citocromo c para la transferencia de electrones [94] y podría tener un papel similar al de *Desulfovibrio*. Sin embargo, también es posible que la transferencia de carga en las columnas de sedimento se realice indirectamente, es decir, que la carga pase de los compuestos químicos, generados por las bacterias, a los electrodos [29,30]. Por ejemplo, el sulfuro generado durante la sulfato-reducción puede donar electrones al ánodo [30].

En el presente estudio se observó una mayor generación de voltaje al incrementar la concentración de sulfatos en el diseño experimental (Fig. 5.12); por lo tanto, las bacterias sulfato-reductoras: *Desulfovibrionales*, *Desulfuromonadales* y *Desulfobacterales* que participan en el ciclo del azufre, podrían estar involucradas en la generación de voltaje en las columnas de sedimento. Además, se detectó la presencia de bacterias de la familia *Desulfobulbaceae*, que podrían formar filamentos o cables conductivos y transferir la carga al ánodo [32,33].

Además, otros autores han asociado la generación de electricidad en celdas de combustible microbianas con los procesos involucrados en el ciclo del azufre [34,41,59], por la transferencia de carga a los electrodos.

Las bacterias sulfato-reductoras en la zona inferior de las celdas de combustible microbianas de sedimento se han asociado anteriormente con la generación de electricidad

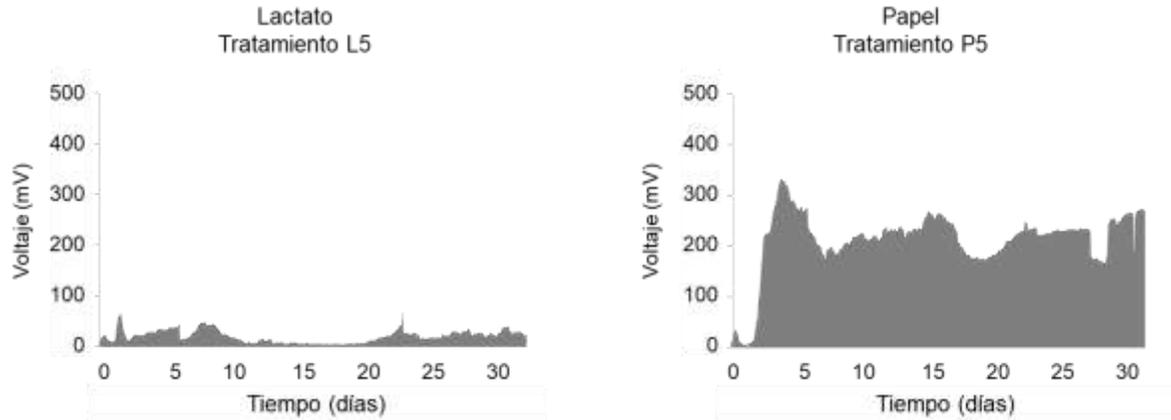
[10]. El sulfuro de hidrógeno generado por la reducción del sulfato, es un mediador redox eficiente para el ánodo [43]. Una mayor concentración de sulfato en el sedimento podría favorecer el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras y mejorar la generación de voltaje al cambiar el potencial de ánodo [26]. Gao *et al.* [66] usaron molibdato para inhibir la actividad de las bacterias sulfato-reductoras y detectaron una disminución en el voltaje; con esto demostraron la contribución de estas bacterias en la generación de voltaje en una celda de combustible microbiana.

Sin embargo, es importante considerar que también la abundancia de los grupos de bacterias puede cambiar con el tiempo. En la columna de Winogradsky, la abundancia de la clase *Deltaproteobacteria* decrece con el tiempo [47], por lo tanto, la abundancia de los órdenes *Desulfovibrionales*, *Desulfuromonadales* y *Desulfobacterales* pudo ser mayor en los primeros días en el tratamiento PT5. Otras bacterias como los *Clostridiales*, pueden ser responsables de la generación de electricidad en las celdas de combustible microbianas, ya que han sido reportadas como bacterias electrógenas [42]. Es necesario tener una comunidad anaerobia en la zona inferior de la columna y que se generen condiciones aerobias en la zona superior para favorecer la generación de voltaje [13,14].

En los tratamientos con lactato, se registró una diferencia de potencial baja por la presencia de bacterias anaerobias en ambas zonas (inferior y superior). En contraste, en el tratamiento PT5, las condiciones anaerobias en el ánodo y el ambiente predominantemente aerobio en el cátodo, incrementaron la diferencia de potencial. La tasa de degradación del lactato es rápida y la producción de ácido sulfhídrico puede inhibir el crecimiento de otras bacterias [67], esto podría evitar la generación de condiciones aerobias en la zona superior. En contraste, la tasa de degradación de la celulosa es relativamente lenta [8]. La hidrólisis es un proceso que limita la degradación rápida de los compuestos [67]. Esto podría promover el crecimiento de una comunidad aerobia en la zona superior y la generación de electricidad se puede prolongar por varios días.

## 5.6 Cinética microbiana en las columnas de Winogradsky

La cinética microbiana en las columnas de sedimento nos permite conocer la dinámica de las bacterias y los procesos metabólicos que pueden presentarse en la columna, a partir de la concentración de los compuestos y los parámetros físico-químicos (como la concentración de oxígeno y el potencial redox). Se seleccionaron los tratamientos LT5 (baja generación de voltaje) y PT5 (alta generación de voltaje) para comparar la dinámica de ambos sistemas. En estas celdas también se registró la generación de voltaje (Fig. 5.23).



**Figura 5.23.** Voltaje generado en las celdas de la cinética microbiana con los tratamientos LT5 y PT5 (razón másica carbono/sulfato de 0.57).

### 5.6.1 Parámetros fisicoquímicos

La concentración de oxígeno y el potencial redox se analizaron juntos. El valor del potencial redox indica si un ambiente es oxidante o reductor y depende de la cantidad de compuestos oxidantes o reductores presentes en el medio. Los valores positivos corresponden a un ambiente oxidante, mientras que los valores negativos indican un ambiente reductor con disponibilidad de electrones. En condiciones aerobias el oxígeno (agente oxidante) está presente, mientras que en condiciones anaerobias no hay oxígeno y se presentan agentes reductores [101,102]. Estos parámetros fisicoquímicos mostraron un patrón contrastante en los tratamientos LT5 y PT5 (Fig. 5.24).

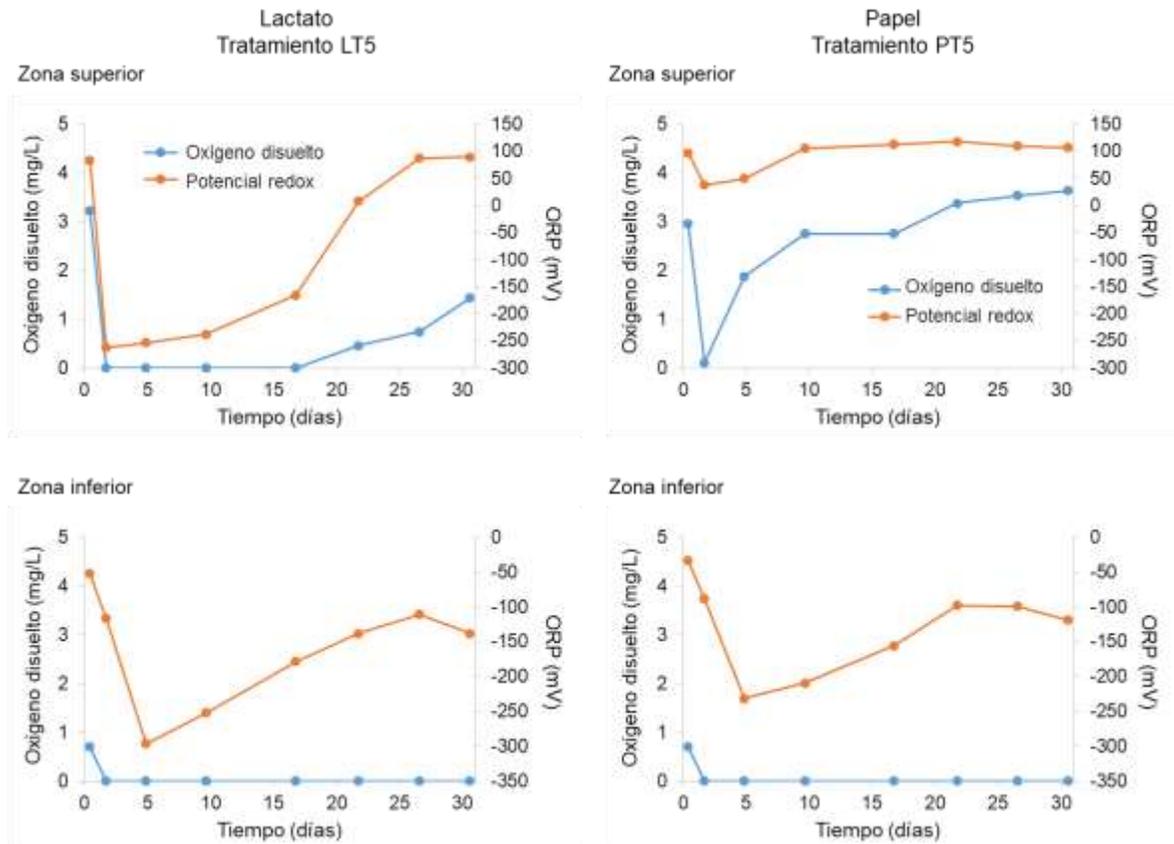
Al utilizar el lactato (LT5), se registraron valores negativos de potencial redox y condiciones anaerobias tanto en la zona inferior como en la zona superior de la columna en los primeros días; después del día 20 se detectaron valores positivos de potencial redox y oxígeno disuelto en la zona superior. Pagaling *et al.* [103] reportaron condiciones de potencial redox positivas en la zona superior durante los primeros días, pero posteriormente se alcanzaron valores negativos en toda la columna de Winogradsky.

En contraste, al utilizar el papel (PT5), se registraron valores negativos de potencial redox y ausencia de oxígeno disuelto en la parte inferior, mientras que se registraron valores positivos de potencial redox y condiciones aerobias en la parte superior de la columna durante toda la cinética (Fig. 5.24).

En las columnas de Winogradsky, se han reportado condiciones aerobias en la zona superior y anaerobias en la zona inferior [21]. Además, la presencia de cianobacterias y algunos grupos de *Alphaproteobacterias* en la zona superior confirman el ambiente aerobio en las columnas de Winogradsky [19,20,47], tal como se registró en los dispositivos del tratamiento PT5, en donde estos dos grupos estuvieron presentes. Es importante

mencionar que en los trabajos anteriores se ha utilizado alguna fuente de celulosa y los resultados reportados son similares a los obtenidos en este estudio en el tratamiento PT5.

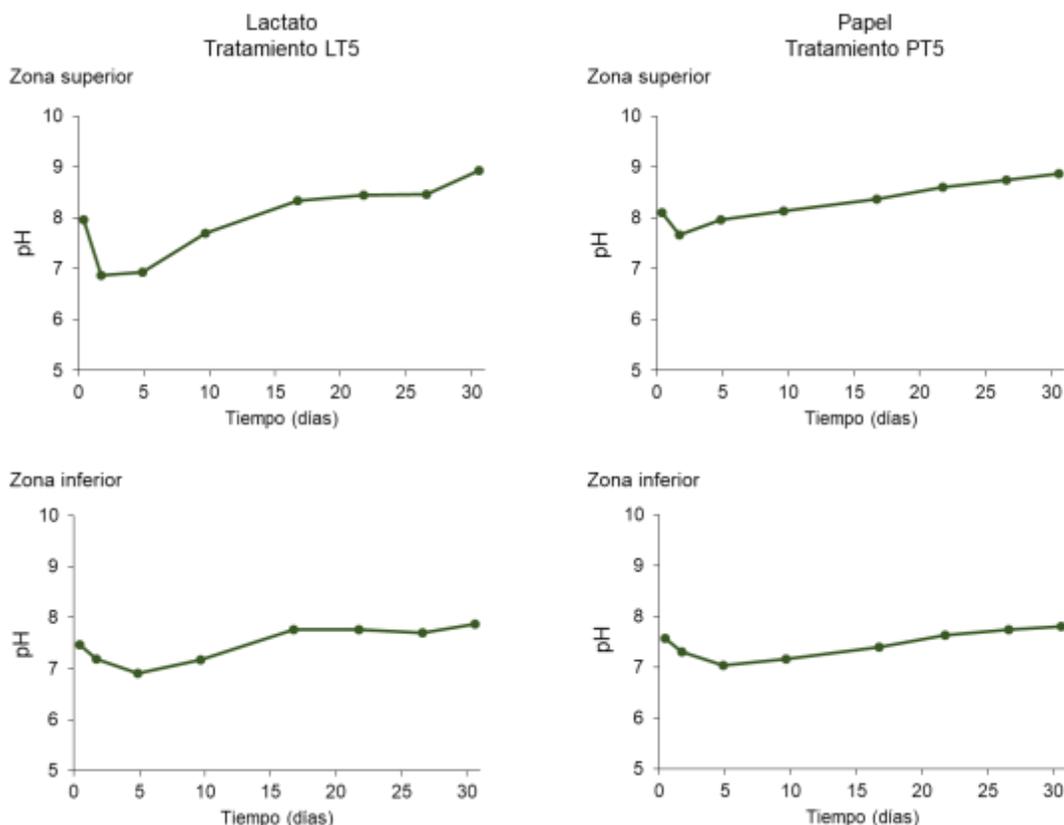
En las celdas de combustible microbianas de sedimento, también se han reportado condiciones aerobias en la zona superior y anaerobias en la zona inferior [89]. La diferencia de ambientes en la zona inferior y superior favorece la generación de voltaje en las celdas de combustible microbianas de sedimento [13].



**Figura 5.24.** Valores de oxígeno disuelto y potencial redox en la zona superior e inferior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

Los valores de pH mostraron una disminución en los primeros 5 días y posteriormente se registró un aumento de pH (Fig. 5.25). En el tratamiento PT5, el pH en la zona superior tuvo un valor mínimo de  $7.7 \pm 0.15$  y un valor máximo de  $8.9 \pm 0.06$ ; en la zona inferior el valor mínimo fue de  $7.0 \pm 0.06$  y el máximo de  $7.8 \pm 0.1$ . En el tratamiento LT5, el pH en la zona superior tuvo un valor mínimo de  $6.9 \pm 0.06$  y un valor máximo de  $8.9 \pm 0.06$ ; en la zona inferior el valor mínimo fue de  $6.9 \pm 0.01$  y el máximo de  $7.9 \pm 0.06$ . La disminución de pH en los primeros días podría estar relacionada con la degradación de las fuentes de carbono

y formación de ácidos orgánicos, proceso conocido como acidogénesis [45,104]. Posteriormente, se registró un aumento de pH, que podría estar relacionado con la generación de iones bicarbonato generados durante el metabolismo desasimilativo de las bacterias [104,105]; además, el bicarbonato puede formar carbonato e incrementar más el pH [106].



**Figura 5.25.** Valores de pH en la zona superior e inferior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

Otros parámetros se mantuvieron constantes en ambos tratamientos. La temperatura se registró entre los 22 y 25 °C (Fig. 8.17, anexo 12). La salinidad osciló entre 14 y 17 partes por mil (‰), la concentración de sólidos totales disueltos (STD) tuvo valores entre 2,890 y 3,326 ppm y la conductividad eléctrica (CE) se mantuvo entre los 6140 y 7079 mS/m (Fig. 8.18, anexo 12).

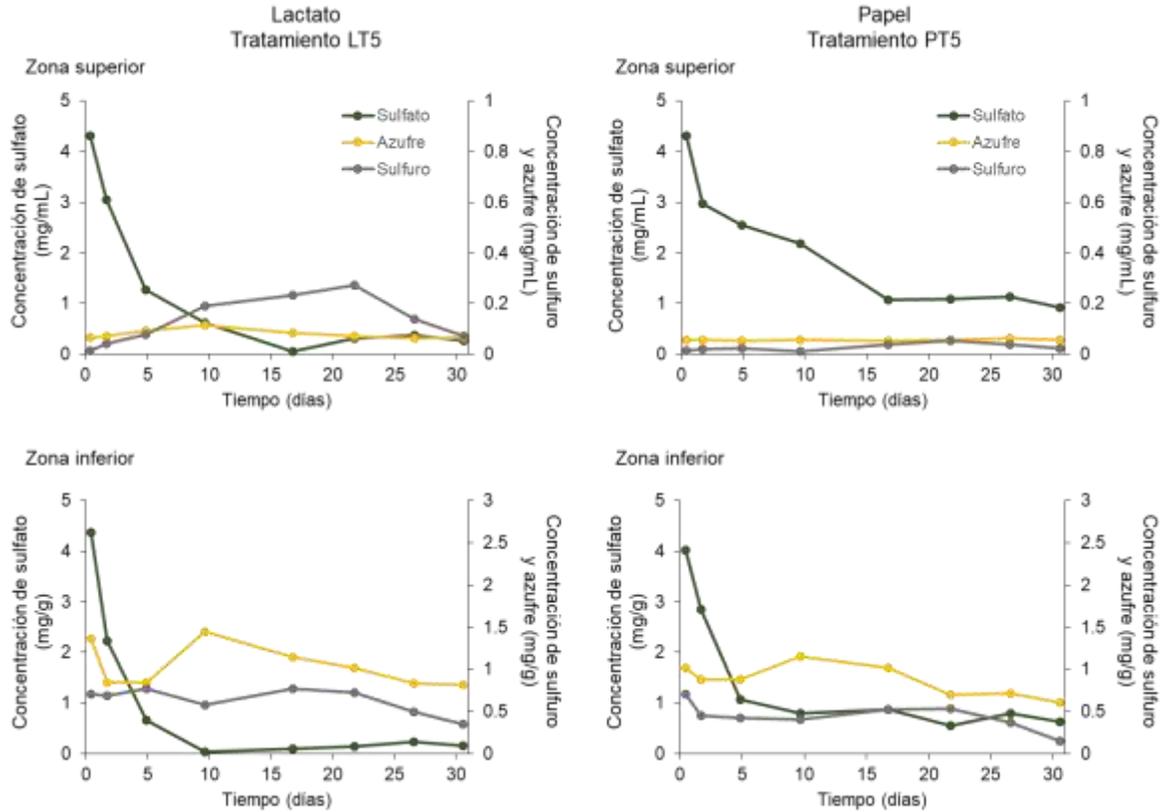
### 5.6.2 Sulfato, sulfuro y azufre

El azufre es un elemento que puede presentarse en diferentes formas químicas como resultado de la actividad metabólica de los microorganismos y de las condiciones ambientales [107]. El sulfato es utilizado por las bacterias sulfato-reductoras y se transforma en sulfuro y azufre durante este proceso [30].

Se determinó la concentración de azufre en forma de sulfato, sulfuro y azufre elemental. La concentración de sulfato al inicio de la cinética fue de  $4.3 \pm 0.36$  mg/mL, y disminuyó en la zona superior e inferior de ambos tratamientos por la actividad de las bacterias sulfato-reductoras (Fig. 5.26). En el sedimento (zona inferior) se registró una concentración de sulfuro mayor a 0.4 mg/g, mientras que en la zona superior fue menor a 0.27 mg/mL.

Se registraron concentraciones más altas de sulfuro en la zona superior en el tratamiento LT5 ( $0.27 \pm 0.1$  mg/mL), que en PT5 ( $0.05 \pm 0.01$  mg/mL) en el día 22. En el tratamiento LT5 se presentó un ambiente reductor (valores negativos de potencial redox; Fig. 5.24) que podrían favorecer la presencia y actividad de bacterias sulfato-reductoras. Las bacterias anaerobias necesitan un potencial redox inferior a -100 mV [108]. Además, el sulfuro de hidrógeno en forma de gas se desplaza de la zona inferior a la superior [21], y esto pudo contribuir a detectar mayores concentraciones de sulfuro en la zona superior del tratamiento LT5 (Fig. 5.26). Por otra parte, se registró un aumento en la concentración de azufre elemental en la zona inferior (1.45 mg/mL, en el día 9). Esta forma del azufre es insoluble en agua lo que dificulta su disponibilidad para los microorganismos y es más estable [107]. Sin embargo, el azufre puede ser reducido por bacterias sulfato-reductoras u oxidado por bacterias fototróficas del azufre [30]; lo que explicaría la disminución de azufre en los días posteriores.

El sulfato es la forma más oxidada de azufre, mientras que el sulfuro es la forma más reducida. Sin embargo, existen otros intermediarios en el ciclo del azufre con estados de oxidación y reducción intermedios, tales como el sulfito, el tiosulfato y el tetrionato. Estas formas del azufre se encuentran en concentraciones muy bajas (escala micromolar) en el sedimento debido a que reaccionan rápidamente con compuestos orgánicos e inorgánicos o son utilizados rápidamente por los microorganismos [107], por lo que no se analizaron en esta investigación.



**Figura 5.26.** Consumo de sulfato y concentración de sulfuro y azufre elemental en la zona inferior y superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

La remoción de sulfato en la columna de Winogradsky fue superior al 79 %; un valor alto si lo comparamos con un microcosmo elaborado con muestras de la zona costera de Santa Rosa, Florida, EE.UU. que mostró una remoción de sulfato de 20 % [109].

Los valores de remoción de sulfato en la columna de Winogradsky y los reportados en reactores tipo RAFA (reactores anaerobios de flujo ascendente) son similares. En un reactor de este tipo, empleado para el tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato, se reportó una eficiencia de remoción de sulfato que va del 40 % al 90 %, la cual depende de la carga de sulfato [110]. El porcentaje de remoción del sulfato en cultivos anaerobios de bacterias sulfato-reductoras se ha reportado entre el 52 % y 63 % dependiendo del inóculo utilizado [104]. En la columna de Winogradsky analizada en la presente investigación, la eficiencia de remoción del sulfato fue del 79 % en la zona superior y 84 % en la zona inferior en el tratamiento PT5. En cambio, en el tratamiento LT5, la remoción del sulfato fue del 93 % en la zona superior y del 96 % en la zona inferior. Por lo tanto, sería posible proponer un sistema basado en la columna de Winogradsky para el tratamiento de aguas residuales con altas concentraciones de sulfato. Es importante considerar que en el tratamiento LT5 hay una importante formación de sulfuro; 0.27 mg/mL en la zona superior y 0.77 mg/mL en la

zona inferior. El sulfuro es tóxico, oloroso y corrosivo por lo que es necesario eliminarlo en los reactores que se emplean para el tratamiento de aguas residuales. En un reactor para remover metales pesados del agua residual se emplea un segundo reactor para eliminar el exceso de sulfuro y convertirlo en azufre elemental mediante bacterias oxidantes de sulfuro [24].

Muchas aguas residuales presentan una alta concentración de sulfatos como las originadas en la industria alimentaria, farmacéutica, papelera, así como en la fabricación de detergentes y la minería. Estas aguas residuales podrían utilizarse para la generación de electricidad en sistemas bioelectroquímicos [30,43].

Si bien en el tratamiento LT5, la generación de voltaje fue muy baja, es posible considerar que la alta concentración de sulfuro de hidrógeno generada en esta condición puede usarse como una fuente de energía. El sulfuro de hidrógeno puede ser empleado como una fuente para la producción de hidrógeno [104]. Existen técnicas térmicas, termoquímicas, electroquímicas, fotoquímicas y plasmóquímicas que permiten descomponer el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en hidrógeno ( $H_2$ ) y compuestos azufrados. La energía para extraer el hidrógeno del sulfuro de hidrógeno es menos alta ( $\Delta G^\circ = 33.44 \text{ kJ/mol}$ ) que la energía necesaria para extraer el hidrógeno de la molécula del agua ( $\Delta G^\circ = 237.19 \text{ kJ/mol}$ ) [111]. La concentración de sulfuro generado en el tratamiento LT5 es similar a la cantidad de sulfuro generada en cultivos anaerobios de bacterias sulfato-reductoras que podrían usarse para la generación del hidrógeno como combustible renovable [104].

### 5.6.3 Carbohidratos totales

La concentración de carbohidratos totales en la zona superior fue baja ( $0.11 \pm 0.07 \text{ mg/mL}$ ). En el tratamiento LT5 no se agregó papel y en el tratamiento PT5 el papel agregado no es soluble en agua y sedimenta. En contraste, la concentración de carbohidratos totales en la zona inferior del tratamiento LT5 fue de  $8.2 \pm 0.74 \text{ mg/g}$ . En esta condición no se agregó papel, sin embargo, es común encontrar carbohidratos totales en el sedimento como un componente de la materia orgánica [80,81].

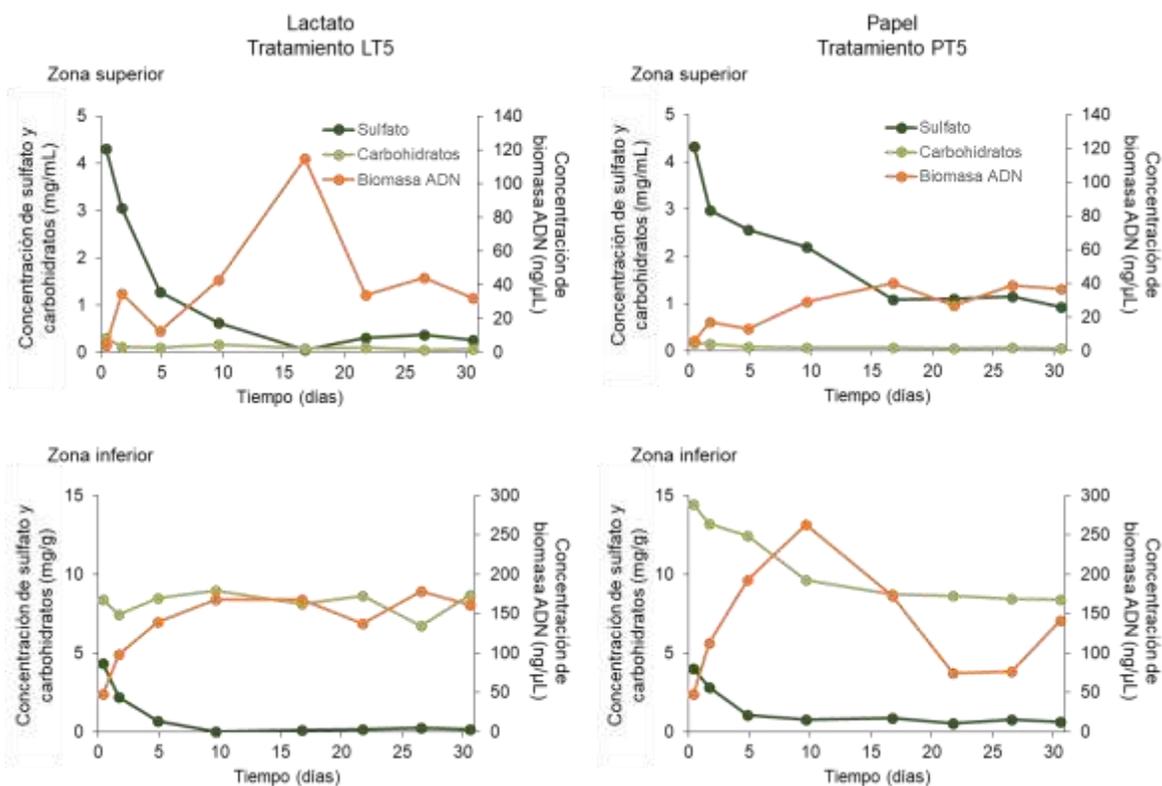
En el tratamiento PT5 (en la zona inferior) se detectaron los carbohidratos totales presentes en el sedimento de forma natural más los carbohidratos añadidos en forma de papel. La concentración inicial de carbohidratos totales fue de  $14.4 \pm 1.4 \text{ mg/g}$  y disminuyó en los primeros 17 días hasta alcanzar una concentración de  $8.7 \pm 1.1 \text{ mg/g}$  (Fig. 5.27). Al final de la cinética, la concentración carbohidratos fue de  $8.4 \pm 1.8 \text{ mg/g}$ , este valor es similar a la cantidad de carbohidratos que se detectó al caracterizar el sedimento ( $8.2 \pm 1.1 \text{ mg/g}$ ). En la degradación del papel participan bacterias hidrolíticas que rompen los enlaces de los polisacáridos (celulosa). Posteriormente bacterias fermentadoras utilizan los carbohidratos para formar ácidos orgánicos [24].

Es posible utilizar la columna de Winogradsky para el tratamiento de residuos de papel o agrícolas con alto contenido de celulosa. La remoción de papel en el tratamiento PT5 (zona

inferior) fue del 58 % en el día 30 de la cinética (Fig. 5.27). La degradación de la celulosa es relativamente lenta, se reporta una remoción del 41 al 68 % después de 180 días y entre 48 a 73 % después de 350 días [8]. La celulosa es el biopolímero más abundante de la Tierra y se generan millones de toneladas de residuos de celulosa vegetal que pueden ser utilizadas para generar energía eléctrica en celdas de combustible microbianas [14,91,112].

#### 5.6.4 Biomasa

La biomasa, medida como la cantidad de ADN extraído, fue mayor en la zona inferior (sedimento) en comparación con la zona superior en ambos tratamientos. En la zona inferior se registró un valor máximo de 179 ng/μL en LT5 y de 263 ng/μL en PT5. En la zona superior el tratamiento con lactato alcanzó valores cercanos a 115 ng/μL, mientras que en el tratamiento con papel fue inferior a 40 ng/μL (Fig. 5.27).



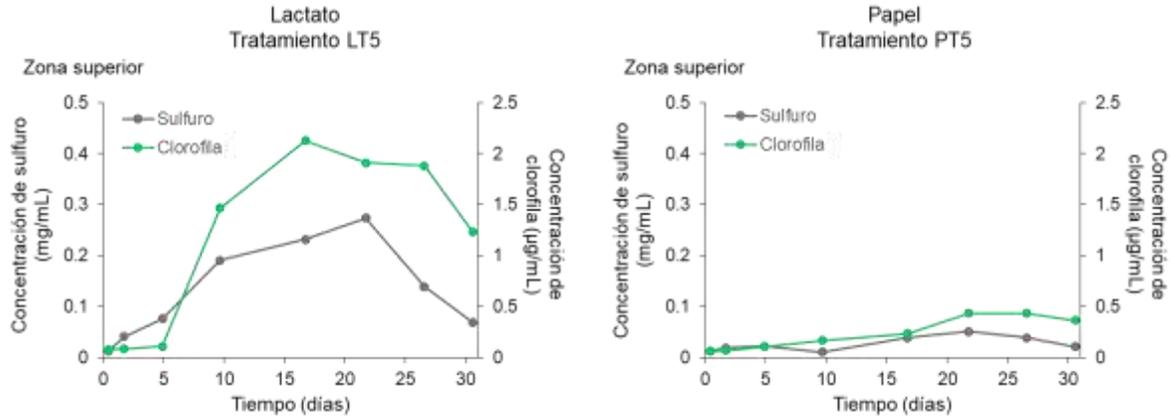
**Figura 5.27.** Consumo de sulfato y carbohidratos para la formación de biomasa en la zona inferior y superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

Se observó una disminución en la concentración de sulfato y un incremento de la biomasa en ambos tratamientos (LT5 y PT5) en los primeros 15 días (Fig. 5.27). Se pudo observar que el consumo de sulfato fue más rápido cuando se utilizó lactato (LT5) como fuente de carbono. El aumento de biomasa también se relacionó con el consumo de carbohidratos en la zona inferior del tratamiento PT5. El consumo de sulfato y la formación de biomasa se relacionan con el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras [113].

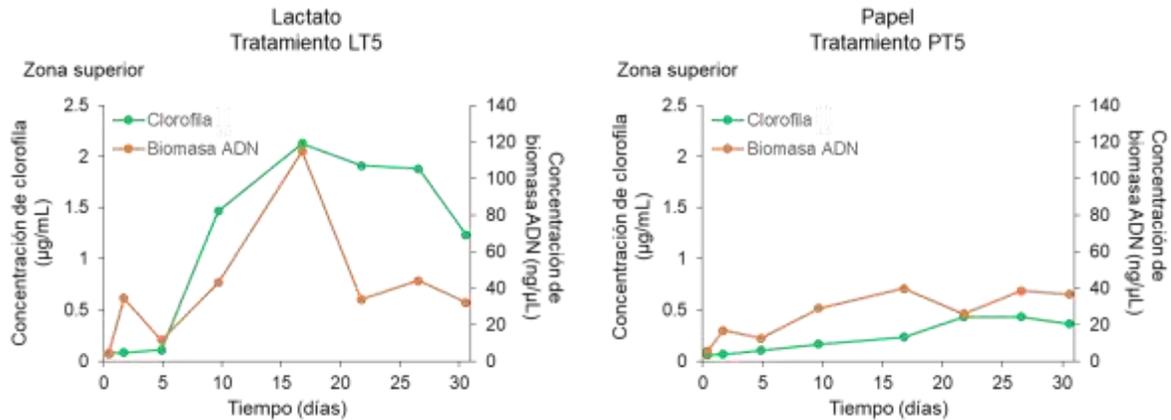
### 5.6.5 Pigmentos fotosintéticos

La extracción de pigmentos fotosintéticos con acetona y la lectura de absorbancias permitieron calcular la concentración de clorofilas en las muestras (Fig 5.28). Se alcanzó un valor máximo de 2.13 µg/mL en el tratamiento con lactato, mientras que en el tratamiento con papel, el máximo fue de 0.44 µg/mL. Esto indica una mayor biomasa de microorganismos fotosintéticos anoxigénicos en el tratamiento con lactato.

La concentración de clorofila también se asoció al sulfuro de hidrógeno generado durante la reducción del sulfato. En la zona superior de la columna del tratamiento LT5, se registró un incremento en la concentración de sulfuro seguido por un aumento de clorofila (Fig. 5.28). Se observó un aumento en la concentración de pigmento y de biomasa (Fig. 5.29). Este comportamiento de las variables se presentó en el tratamiento con lactato donde predominan las bacterias sulfato-reductoras y fototróficas del azufre. Es posible que la cantidad de clorofila corresponda a las bacterias verdes del azufre, ya que se encontró el género *Chlorobaculum* (orden Chlorobiales) en un 15.9 % en el análisis de la comunidad bacteriana en el día 19 (Tabla 5.3). Por lo tanto, es posible que esta clorofila pertenezca a las bacterias verdes del azufre. Además, el barrido de absorbancia de las muestras (Fig. 8.8; anexo 8) es similar al reportado por otros autores que estudiaron a las bacterias verdes del azufre en muestras ambientales y realizaron la extracción con acetona (Fig. 8.9; anexo 8) [77,114]. En otras investigaciones también se ha reportado una mayor concentración de bacterioclorofila al aumentar la concentración de sulfuro y la concentración de bacterioclorofila se relaciona con el crecimiento de las bacterias [115].



**Figura 5.28.** Concentración de sulfato y clorofila en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).



**Figura 5.29.** Concentración de clorofila y biomasa (ADN) en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

### 5.6.6 Parámetros cinéticos de las columnas

Al calcular los parámetros cinéticos (Tabla 5.8), se pueden observar las diferencias en ambos tratamientos. En el tratamiento PT5 se registró la mayor cantidad de biomasa y una mayor tasa de crecimiento en la zona inferior; en cambio, en la zona superior se presentó la menor cantidad de biomasa y la menor tasa de crecimiento.

En el tratamiento LT5 la cantidad de biomasa y tasa de crecimiento fueron similares en las zonas superior e inferior de la columna. El rendimiento de producto (voltaje) con respecto a la biomasa, el producto con respecto al sustrato y la tasa específica de formación de producto fueron mayores en el tratamiento PT5 donde se favoreció la generación de voltaje.

**Tabla 5.8.** Parámetros cinéticos en los tratamientos LT5 y PT5.

Parámetro cinético		Fuente de carbono		unidades
		Lactato (LT5)	Papel (PT5)	
<b>Zona superior (cátodo)</b>				
Mayor cantidad de biomasa	$X_{max}$	114.94	39.96	ng/ $\mu$ L
Tasa de crecimiento	$\mu_{max}$	0.1563	0.0985	d <sup>-1</sup>
Rendimiento biomasa sustrato (SO <sub>4</sub> )	$Y_{XSs}$	17.22	10.65	gx/gS
<b>Voltaje (V) como producto</b>				
Rendimiento producto (V) biomasa	$Y_{PvX}$	0.0018	0.0053	$V_{Pv}/g_X$
Rendimiento producto (V) sustrato (SO <sub>4</sub> )	$Y_{PvSs}$	0.0006	0.0863	$V_P/g_S$
Tasa específica de formación producto (V)	$Q_{ps}$	0.0001	0.0085	gx/gS/d
<b>Sulfuro (S<sup>-2</sup>) como producto</b>				
Rendimiento producto (S <sup>-2</sup> ) biomasa	$Y_{PsX}$	0.0008	0.0005	$g_{Ps}/g_X$
Rendimiento producto (S <sup>-2</sup> ) sustrato (SO <sub>4</sub> )	$Y_{PsSs}$	0.0492	0.0066	$g_P/g_S$
Tasa específica de formación producto (S <sup>-2</sup> )	$Q_{ps}$	0.0077	0.0006	gx/gS/d
<b>Zona inferior (ánodo)</b>				
		Lactato (LT5)	Papel (PT5)	
Mayor cantidad de biomasa	$X_{max}$	168.13	263.51	ng/ $\mu$ L
Tasa de crecimiento	$\mu_{max}$	0.1159	0.162	d <sup>-1</sup>
Rendimiento biomasa sustrato (sulfato)	$Y_{XSs}$	39.86	93.49	gx/gS
<b>Voltaje (V) como producto</b>				
Rendimiento producto (V) biomasa	$Y_{PvX}$	0.0003	0.0013	$V_{Pv}/g_X$
Rendimiento producto (V) sustrato (SO <sub>4</sub> )	$Y_{PvSs}$	0.0166	0.1389	$V_P/g_S$
Tasa específica de formación producto (V)	$Q_{ps}$	0.0019	0.0225	gx/gS/d
<b>Sulfuro (S<sup>-2</sup>) como producto</b>				
Rendimiento producto (S <sup>-2</sup> ) biomasa	$Y_{PsX}$	0.0006	0.0012	$g_{Ps}/g_X$
Rendimiento producto (S <sup>-2</sup> ) sustrato (SO <sub>4</sub> )	$Y_{PsSs}$	0.0194	0.0889	$g_P/g_S$
Tasa específica de formación producto (S <sup>-2</sup> )	$Q_{ps}$	0.0022	0.0144	gx/gS/d

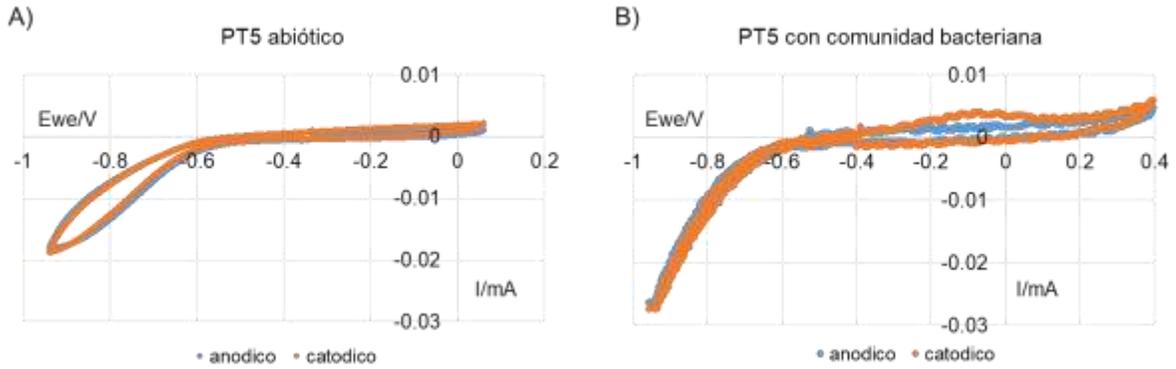
Por otro lado, si consideramos el sulfuro de hidrógeno como producto para la producción de hidrógeno [104], los resultados mostraron que el rendimiento de sulfuro con respecto al sustrato fue mayor en la zona superior del tratamiento LT5. Los valores de los parámetros cinéticos son similares a los reportados en otros sistemas de cultivo [113]. La concentración de sulfuro en la zona inferior puede estar relacionada con la generación de voltaje por su capacidad para donar electrones [43]. En celdas de combustible microbianas una alta concentración de sulfuros en la cámara anódica favorece la generación de electricidad [41].

## 5.7 Análisis electroquímico

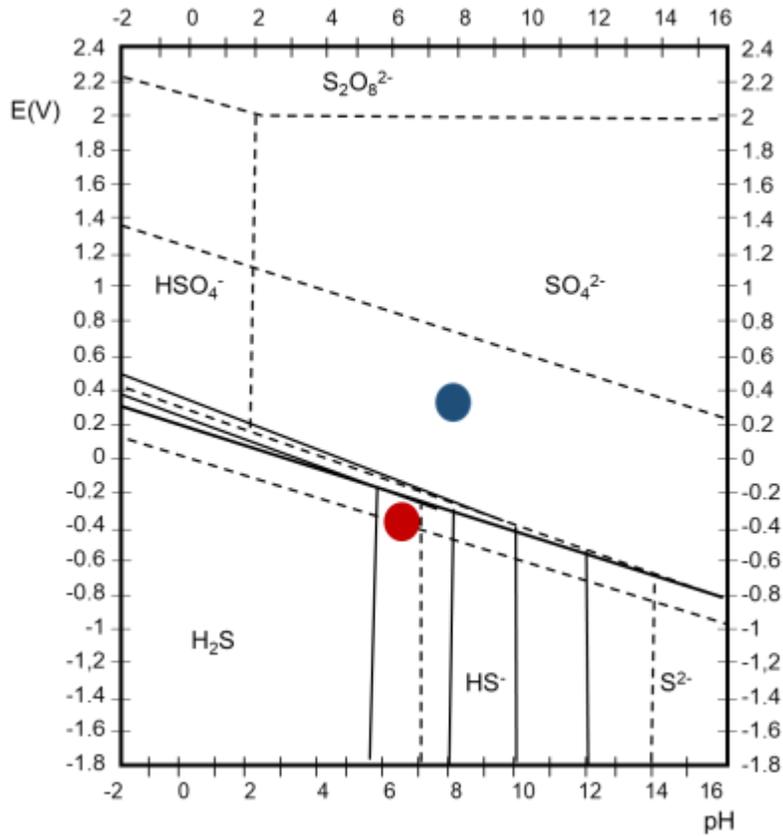
Los resultados del potencial de circuito abierto en la parte superior indicaron valores cercanos a -311 mV al utilizar el electrodo de sulfatos. Al hacer el cálculo respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE) el valor fue de 329 mV. Para la zona inferior, el potencial de circuito abierto fue de -950 mV y al realizar el cálculo respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE), el valor corresponde a -310 mV. Estos valores están asociados con los valores de potencial redox con el electrodo de platino determinado en la cinética (Fig. 5.24, tratamiento PT5). Los valores negativos de potencial redox cercanos a los -220 mV favorecen al sulfato como aceptor de electrones en el metabolismo de las bacterias sulfato-reductoras [34,109].

En las voltamperometrías cíclicas se mide la corriente del sistema al aplicar diferentes potenciales. En la figura 5.30 se muestran las voltamperometrías cíclicas correspondientes a la parte superior de las celdas del tratamiento PT5, condición abiótica y con la comunidad bacteriana. En los potenciales más positivos se observa el pico de oxidación y en los potenciales más negativos el pico de reducción. A través de esta técnica se puede ver el efecto de la oxidación y reducción de las especies químicas presentes en la celda microbiana. Se puede observar que los procesos de óxido-reducción y su reversibilidad adquieren valores de 0.001 mA de corriente a -0.1 V en la celda abiótica, con respecto a la que posee la comunidad bacteriana que alcanzó 0.0045 mA de corriente a -0.1 V. Estos valores pueden estar relacionados con la comunidad fototrófica que genera oxígeno en la zona superior de la columna. La concentración de oxígeno incrementa la reacción en el cátodo cuando ocurre la reducción de oxígeno [13,14].

El diagrama de Pourbaix nos permite predecir las especies químicas predominantes en los sistemas [116]. En la figura 5.31 se muestra este diagrama para el azufre y a partir de los valores de pH y del potencial de circuito abierto obtenido con el potenciostato en la condición donde se favorece la generación de voltaje (PT5). A partir de esta información es posible inferir que en la zona inferior predominan los sulfuros ( $H_2S$ ) y en la zona superior los sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ). Un patrón similar se observó en la figura 5.26.



**Figura 5.30.** Resultados de la voltamperometría cíclica de la zona superior del tratamiento PT5: A) abiótico y B) con comunidad bacteriana. La línea azul corresponde al sentido anódico y la naranja al sentido catódico.



**Figura 5.31.** Diagrama de Pourbaix del azufre. El círculo rojo corresponde al valor de pH y potencial registrados en la zona inferior y el círculo azul corresponde al valor de pH y potencial de la zona superior de la celda microbiana en el tratamiento PT5, esta diferencia favorece la generación de voltaje. Modificado de Pourbaix [116].

## 5.8 Integración final de resultados

La composición del medio de cultivo modificó la cantidad de voltaje generado en los dispositivos. Se observó que la fuente de carbono es importante debido a que se registró un voltaje bajo cuando se utilizó lactato y glucosa. Estas fuentes de carbono pueden donar electrones [5], pero poseen algunas características que generan un voltaje limitado en la columna de Winogradsky. La glucosa puede donar más electrones que el lactato pero su alta solubilidad en agua podría tener como consecuencia la generación de condiciones y potenciales similares en la zona inferior y superior de la columna, lo que limita el voltaje generado.

En los tratamientos con lactato (LT5 y LT6) se registró una comunidad bacteriana anaerobia en la zona inferior y superior de la columna. Al presentarse un ambiente reductor en ambas zonas no se favoreció la diferencia de potencial entre el ánodo y cátodo, y el voltaje generado fue mínimo. Si bien la comunidad bacteriana se analizó sólo en los tratamientos LT5 y LT6, es probable que en los demás tratamientos con lactato (Fig. 5.9) también se desarrollara una comunidad anaerobia a lo largo de toda la columna, esto explicaría los bajos valores de voltaje generados.

Por otra parte, al utilizar celulosa y papel se generó un voltaje constante; pero la cantidad de voltaje generado dependió de la razón másica carbono/sulfato y la concentración de estos compuestos. En general, se obtuvo un voltaje entre 200 y 350 mV al usar una razón másica carbono/sulfato entre 0.14 a 2.29 con una concentración de carbono (celulosa o papel) de 0.22 % peso. También se generó un voltaje entre 200 y 300 mV al utilizar celulosa con una razón másica carbono/sulfato de 0.14 y 0.06 % peso de carbono.

En el tratamiento PT5 (razón másica carbono/sulfato 0.57 con 0.22 % peso de carbono) se encontró una comunidad anaerobia en la zona inferior y una comunidad con bacterias anaerobias, facultativas y aerobias en la zona superior. En la cinética de las columnas se registró un potencial redox positivo y oxígeno en la zona superior. Los resultados indicaron que con un ambiente oxidante en la zona del electrodo superior se favorece la diferencia de potencial respecto al electrodo inferior que presentó un ambiente reductor.

Los resultados del fotoperiodo indicaron que la iluminación constante favorece la generación de voltaje. La luz es necesaria para que los microorganismos fotoautótrofos generen oxígeno y por lo tanto generen un ambiente oxidante en la zona superior que favorece el desempeño del sistema [13].

La composición del medio de cultivo también modificó el gradiente de condiciones a lo largo de la columna de Winogradsky. En la cinética del tratamiento LT5 se obtuvieron condiciones reductoras (potencial redox negativo, condiciones anaerobias y alta concentración de sulfuros) a lo largo de toda la columna. En contraste, la cinética del tratamiento PT5 mostró condiciones reductoras en la zona inferior y oxidantes en la zona superior. El cambio en el

potencial óxido-reducción implicó un cambio en el potencial de los electrodos, lo que permitió la generación de voltaje en el sistema con papel.

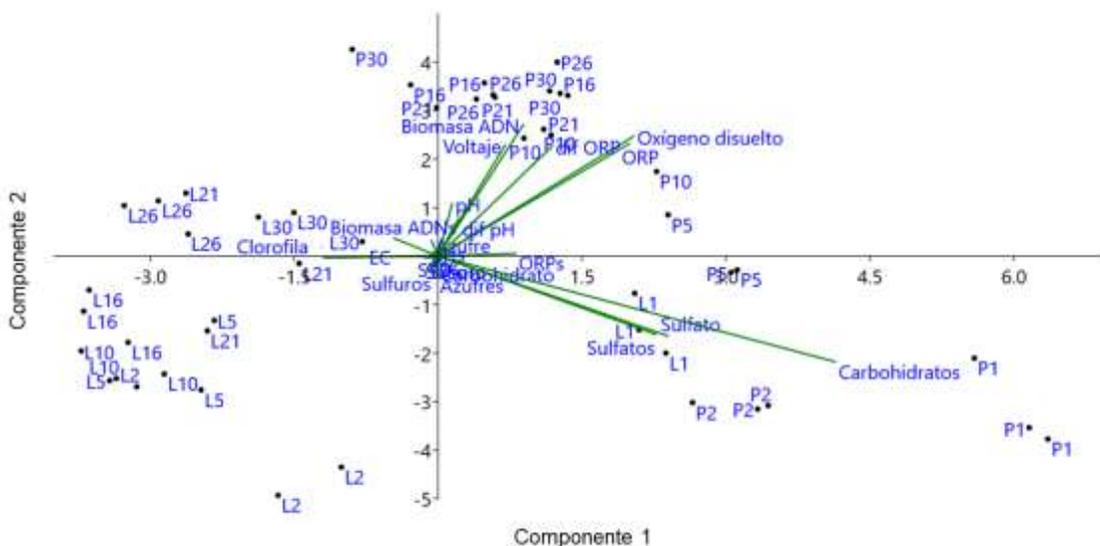
Los valores de oxígeno y potencial redox de la cinética microbiana del tratamiento PT5 podrían explicar las variaciones de voltaje que se registraron en la fase II y IV al utilizar el papel como fuente de carbono. Casi en todos los tratamientos, se observó un pequeño pico de voltaje y posteriormente una caída de voltaje antes del segundo día (Fig. 5.6 y Fig. 5.11). Esto podría estar relacionado con la disminución en la concentración de oxígeno disuelto en la zona superior en el día 2 (Fig. 5.24). Después, se registró un pico de voltaje alto entre los días 3 y 5 (Fig. 5.6 y Fig. 5.11). Esto coincide con el incremento en la concentración de oxígeno disuelto en la zona superior que se registró el día 5 de la cinética y con el valor más negativo de potencial redox ( $-231.6 \pm 2.1$  mV) de la zona inferior (Fig. 5.24). Posteriormente, se registró un voltaje casi constante relacionado con la diferencia de potencial redox entre las zonas superior e inferior. Entre el día 22 y 25 el potencial redox de la zona inferior presentó valores menos negativos ( $-99 \pm 17$  mV), que podría estar relacionado con una menor generación de voltaje.

Las correlaciones del voltaje con las variables de la cinética microbiana del sistema en el tratamiento PT5 indicaron algunas correlaciones significativas negativas con el sulfato y carbohidratos (Tabla 5.9). Estas correlaciones negativas podrían estar relacionadas con el consumo de los sustratos proporcionados como consecuencia del metabolismo de las bacterias. Se encontró una correlación positiva de 0.74 entre voltaje y la diferencia de potencial redox obtenido de los valores de la zona superior e inferior. También se encontró una correlación positiva de 0.74 entre voltaje y la diferencia de pH obtenido de los valores de la zona superior e inferior. La diferencia de potencial redox se puede relacionar con el potencial de celda que se obtiene con la diferencia del potencial del cátodo menos el potencial del ánodo [1]. Además, el potencial redox y el pH están relacionadas con el gradiente de condiciones que favorecen la diferencia de potencial entre la zona superior aerobia y la zona inferior anaerobia y por lo tanto favorecen la generación de voltaje.

**Tabla 5.9.** Correlación entre variables de la cinética y la generación de voltaje en PT5.

	Variable	Correlación con voltaje
Zona superior	Sulfato	-0.70
	Carbohidratos	-0.79
Zona inferior	Potencial redox	-0.61
	Sulfato	-0.88
	Carbohidratos	-0.63
Diferencia (superior – inferior)	Potencial redox	0.74
	pH	0.74

El análisis de componentes principales explica con el componente 1, el 36 % de la varianza de los datos de las celdas de la cinética y con el componente 2, el 33 % (Fig. 5.32). Las variables de mayor importancia fueron: la concentración de carbohidratos, la concentración de sulfatos, el potencial redox (ORP), el oxígeno disuelto, la diferencia de potencial redox, el voltaje y la biomasa. La concentración de sulfato disminuye en los primeros días por la actividad metabólica de las bacterias sulfato-reductoras, con esto también se presenta un cambio en el potencial redox que en las celdas de papel favorece la generación de voltaje después del día 5. En la figura se observa un grupo en el cuadrante inferior izquierdo que corresponde a las celdas de menor voltaje (tratamiento con lactato). En la zona superior centro-derecha se presenta otro grupo que corresponde a las celdas de mayor voltaje (tratamiento con papel). Este análisis corroboró que la diferencia de potencial redox entre zona inferior y superior representa una condición importante en la generación de voltaje, así como la presencia de oxígeno disuelto, la biomasa y el potencial redox (ORP) de la zona superior.



**Figura 5.32.** Análisis de componentes principales de las celdas de la cinética microbiana. Celdas microbianas con lactato (L) y papel (P); el número corresponde al día de la cinética.

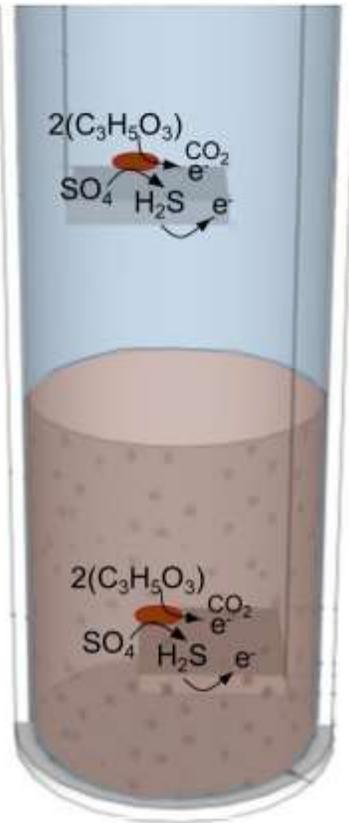
Estos resultados contribuyen al conocimiento de cómo afectan los nutrientes a las comunidades bacterianas y la generación de voltaje en la columna de Winogradsky y puede ser empleado en las celdas de combustible microbianas de sedimento. El enriquecimiento que genera un potencial redox más negativo en la zona inferior y un potencial redox positivo en la zona superior corresponde a una mayor generación de voltaje.

En la figura 5.33 se muestra un esquema que representa los procesos microbiológicos y bioelectroquímicos más importantes que contribuyen a la generación de voltaje en las celdas microbianas de sedimento empleadas en el presente estudio con diferentes enriquecimientos. En el tratamiento LT5 (Fig. 5.33 A), la degradación del lactato es realizada por bacterias sulfato-reductoras en un ambiente con potencial redox negativo; y sería factible que se presentara una transferencia de carga al electrodo. Además, estas bacterias generan sulfuro que podría transferir la carga de forma indirecta al electrodo. Estos procesos biológicos generan un potencial negativo en el electrodo. Sin embargo, lo anterior ocurre en la zona inferior y superior de la columna, lo que implica que ambos electrodos (ánodo y cátodo) poseen un potencial similar y al medir la diferencia de potencial se obtiene un valor bajo (25 mV).

En contraste, en el tratamiento PT5 (Fig. 5.33 B), la celulosa (insoluble en agua) precipita con el sedimento. Esto genera condiciones distintas en la zona inferior y superior de la columna. En la zona inferior ocurre la hidrólisis de la celulosa, la fermentación y la sulfato-reducción y sería factible que existiera una transferencia de carga al ánodo a partir de diferentes compuestos orgánicos. Además, el sulfuro generado por las bacterias sulfato-reductoras también podría transferir la carga al ánodo. Por otra parte, los fotoautótrofos oxigénicos generan condiciones aerobias en la zona superior. El oxígeno puede actuar como aceptor final de los electrones que podrían viajar en el circuito eléctrico. El potencial del electrodo de la zona inferior (ánodo) es negativo, mientras que el potencial del electrodo superior (cátodo) es positivo y al medir la diferencia de potencial se obtiene un voltaje alto (250 mV).

En la presente investigación se evaluó la generación de voltaje en columnas Winogradsky con diferentes enriquecimientos. Si bien en este sistema bioelectroquímico no se midió la generación de corriente, se consideró que al determinar las condiciones de enriquecimiento de nutrientes de carbono y sulfato que producen una mayor diferencia de potencial, se proporciona información sobre las condiciones que se pueden utilizar para incrementar la generación de corriente en este sistema. Esto se debe a que, de acuerdo con la ley de Ohm ( $V = IR$ ) [117], un incremento en el voltaje implica un aumento en la corriente.

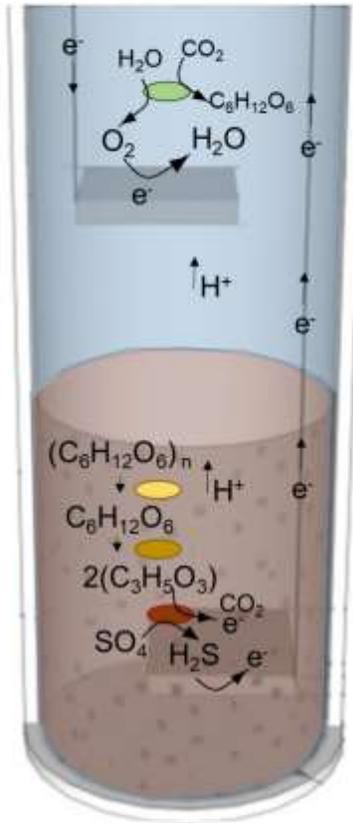
A) Lactato  
Tratamiento LT5



$$E_{emf} = E_{cátodo}^{\circ} - E_{ánodo}^{\circ}$$

$$25 \text{ mV} = -150 \text{ mV} - (-175 \text{ mV})$$

B) Papel  
Tratamiento PT5



$$E_{emf} = E_{cátodo}^{\circ} - E_{ánodo}^{\circ}$$

$$250 \text{ mV} = 100 \text{ mV} - (-150 \text{ mV})$$

**Figura 5.33.** Esquema de los posibles procesos microbiológicos y bioelectroquímicos en la celda microbiana de sedimento. A) tratamiento con lactato y B) tratamiento con papel.

## 6. CONCLUSIONES

Al operar la columna de Winogradsky como un sistema bioelectroquímico, es decir, adicionando un circuito eléctrico con sus electrodos y enriqueciendo el sedimento con nutrientes, se puede modificar la comunidad bacteriana y a su vez cambiar el gradiente de potencial redox dentro de la columna para incrementar la generación de voltaje. La fuente de carbono cambió la composición y estructura de la comunidad bacteriana; así mismo ésta modificó la concentración de oxígeno, potencial redox, pH y compuestos químicos dentro de la celda microbiana, lo que a su vez influyó en el potencial en los electrodos y por lo tanto en la generación de voltaje. Una fuente de carbono compleja como el papel facilitó el desarrollo de diferentes microorganismos a lo largo de la columna, con una comunidad anaerobia en la zona inferior y una comunidad aerobia en la zona superior. Se encontró que la concentración de la fuente de carbono y la razón másica carbono/sulfato son relevantes. La producción de voltaje se favoreció cuando se utilizó celulosa como fuente de carbono y una razón másica carbono/sulfato entre 0.14 y 0.57 en concentración de carbono de 0.06 y 0.22 % peso. La misma razón másica obtenida con otras concentraciones de carbono y sulfato generó menos voltaje. También fue posible utilizar una razón másica carbono/sulfato de 2.29, pero la concentración de carbono añadida no debe ser mayor a 0.22 % peso. La generación de voltaje en las columnas de Winogradsky se mantuvo durante más de 35 días, lo que implica una buena alternativa a considerar para la generación de electricidad.

Las condiciones propuestas por el modelo de superficie de respuesta mostraron que una razón másica carbono/sulfato de 0.34 generó un voltaje más estable (con un máximo de 400 mV) al utilizar celulosa, y que con una razón másica carbono/sulfato de 0.18 se obtuvo un máximo de 600 mV al usar el papel.

En este estudio se demostró que la proporción de celulosa y sulfato puede modificar la estructura de la comunidad microbiana. La comunidad bacteriana más diversa se detectó al utilizar papel como fuente de carbono con una razón másica carbono/sulfato de 0.57. En esta condición la comunidad inferior presentó grupos de bacterias anaerobias como: *Clostridium* (orden Clostridiales), *Mangroviflexus* (Bacteroidales), *Chlorobaculum* (Chlorobiales); y bacterias sulfato-reductoras como: *Desulfomicrobium* (Desulfovibrionales) y *Pelobacter* (Desulfuromonadales). Mientras que en la zona superior se encontraron bacterias anaerobias como *Proteiniclasticum* (Clostridiales), facultativas como *Novosphingobium* (Sphingomonadales), *Draconibacterium* (Bacteroidales) y aerobias como *Kordiimonas* (Kordiimonadales) *Loktanella*, *Luteolibacter* y diatomeas (*Pleurosigmataceae*, *Gyrosigma*). En esta condición se generó mayor cantidad de voltaje por la comunidad anaerobia en la zona inferior y una comunidad mixta en la zona superior.

La razón másica carbono/sulfato modifica la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de la columna y esto a su vez modifica el gradiente de oxígeno y potencial redox que se obtuvo gracias a las mediciones realizadas con el electrodo de referencia. El ambiente reductor en la zona inferior y el ambiente oxidante en la zona superior cambian el potencial

de los electrodos lo que se mide como un mayor voltaje. Además de la proporción de nutrientes, se requiere luz para favorecer la generación de oxígeno por microorganismos fotoautótrofos en la zona superior.

La concentración de sulfato en el medio de enriquecimiento favoreció el desarrollo de bacterias sulfato-reductoras asociadas a una condición anaerobia en la zona inferior. Además, una fuente de carbono de lenta degradación como la celulosa, permite el desarrollo de una comunidad aerobia en la zona superior. Todo esto favorece la generación de voltaje, ya que la presencia de un potencial redox negativo en la zona inferior y un potencial redox positivo en la zona superior genera una mayor diferencia de potencial entre ambas zonas y como consecuencia la generación de voltaje.

La producción de voltaje se logró en pequeñas columnas Winogradsky con una altura de 12 cm y una distancia de 6 cm entre ánodo y cátodo. La superficie de los electrodos empleados fue de 4 cm<sup>2</sup>. Los resultados generados en este trabajo se pueden utilizar para establecer las condiciones de operación de una CCMS con adición continua de nutrientes para lograr una generación de electricidad constante.

## **Perspectivas**

La medición de corriente eléctrica quedó fuera del alcance de este proyecto, sin embargo, se contempla la realización de nuevas celdas microbianas de sedimento con las condiciones donde se obtuvo un mayor potencial eléctrico, para poder estudiar, analizar, evaluar y buscar las condiciones para incrementar la densidad de corriente. Incluir la evaluación de la corriente permitiría plantear una posible continuidad de este trabajo con la finalidad de evaluar la generación de corriente. Se podrían plantear las preguntas: ¿Cuál será el área óptima de los electrodos para incrementar la corriente generada? ¿Qué material de electrodos reduce la resistencia y permite incrementar la generación de corriente? ¿Qué comunidad bacteriana favorece la transferencia de electrones al ánodo y por lo tanto la generación de corriente eléctrica?

Además de los nutrientes añadidos a la columna de Winogradsky se puede cambiar la distancia entre los electrodos para contestar las preguntas: ¿Cómo se modifica la generación de voltaje y la corriente al cambiar la distancia entre los electrodos? ¿Cuál será la relación diámetro-altura óptima?

En esta investigación se identificó la comunidad bacteriana en diferentes zonas de las columnas de Winogradsky y con diferentes nutrientes. Sin embargo, un estudio para saber qué genes se están expresando en la comunidad bacteriana podría aportar información para relacionarla con la generación de voltaje y de corriente eléctrica.

## 7. REFERENCIAS

- [1] Logan BE. *Microbial Fuel Cells*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470258590>.
- [2] Trapero JR, Horcajada L, Linares JJ, Lobato J. Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization. *Appl Energy* 2017;185:698–707. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.109>.
- [3] Du Z, Li H, Gu T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv* 2007;25:464–82. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.004>.
- [4] Dahiya A. *Bioenergy: Biomass to Biofuels*. San Diego: Elsevier Inc.; 2015.
- [5] Pant D, Van Bogaert G, Diels L, Vanbroekhoven K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour Technol* 2010;101:1533–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>.
- [6] Tender LM, Reimers CE, Stecher HA, Holmes DE, Bond DR, Lowy DA, et al. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat Biotechnol* 2002;20:821–5.
- [7] Gómora-Hernández JC, Serment-Guerrero JH, Carreño-de-León MC, Flores-Alamo N. Voltage production in a plant-microbial fuel cell using *Agapanthus africanus*. *Rev Mex Ing Química* 2020;19:227–37.
- [8] Zhu D, Wang D-B, Song T-S, Guo T, Wei P, Ouyang P, et al. Enhancement of cellulose degradation in freshwater sediments by a sediment microbial fuel cell. *Biotechnol Lett* 2016;38:271–7. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1985-z>.
- [9] Bhande R, Noori MT, Ghangrekar MM. Performance improvement of sediment microbial fuel cell by enriching the sediment with cellulose: Kinetics of cellulose degradation. *Environ Technol Innov* 2019;13:189–96. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.11.003>.
- [10] Zhao Q, Li R, Ji M, Ren ZJ. Organic content influences sediment microbial fuel cell performance and community structure. *Bioresour Technol* 2016;220:549–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.005>.
- [11] Sajana TK, Ghangrekar MM, Mitra A. Effect of presence of cellulose in the freshwater sediment on the performance of sediment microbial fuel cell. *Bioresour Technol* 2014;155:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.094>.
- [12] Ewing T, Ha PT, Beyenal H. Evaluation of long-term performance of sediment microbial fuel cells and the role of natural resources. *Appl Energy* 2017;192:490–7. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.08.177>.
- [13] Commault AS, Lear G, Novis P, Weld RJ. Photosynthetic biocathode enhances the power output of a sediment-type microbial fuel cell. *New Zeal J Bot* 2014;52:48–59. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.870217>.
- [14] Wang D-B, Song T-S, Guo T, Zeng Q, Xie J. Electricity generation from sediment microbial fuel cells with algae-assisted cathodes. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:13224–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.141>.
- [15] Najafgholi Z, Rahimnejad M. Improvement of sediment microbial fuel cell performance by application of sun light and biocathode. *Korean J Chem Eng* 2016;33:154–8. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0123-x>.
- [16] Ribot-Llobet E, Montpart N, Ruiz-Franco Y, Rago L, Lafuente J, Baeza JA, et al. Obtaining microbial communities with exoelectrogenic activity from anaerobic sludge using a simplified procedure. *J Chem Technol Biotechnol* 2014;89:1727–32. <https://doi.org/10.1002/jctb.4252>.
- [17] Jung SP, Yoon M, Lee S, Oh S, Kang H, Yang J. Power Generation and Anode Bacterial

- Community Compositions of Sediment Fuel Cells Differing in Anode Materials and Carbon Sources. *Int J Electrochem Sci* 2014;9:315–26.
- [18] Rogan B, Lemke M, Levandowsky M, Gorrell T. Exploring the Sulfur Nutrient Cycle Using the Winogradsky Column. *Am Biol Teach* 2005;67:348–56. [https://doi.org/10.1662/0002-7685\(2005\)067\[0348:ETSNCU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1662/0002-7685(2005)067[0348:ETSNCU]2.0.CO;2).
- [19] Rundell EA, Banta LM, Ward DV, Watts CD, Birren B, Esteban DJ. 16S rRNA Gene Survey of Microbial Communities in Winogradsky Columns. *PLoS One* 2014;9:e104134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104134>.
- [20] Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu R. A pyrosequencing-based analysis of microbial diversity governed by ecological conditions in the Winogradsky column. *World J Microbiol Biotechnol* 2015;31:1115–26. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1861-y>.
- [21] Babcsányi I, Meite F, Imfeld G. Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 2017;93:1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix089>.
- [22] Bacchetti-DeGregoris T, Barroeta B, Esteve-Nuñez A. La columna bioelectrogénica: Una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria. *Rev Eureka* 2015;12:529–35.
- [23] Xu X, Zhao Q, Wu M, Ding J, Zhang W. Biodegradation of organic matter and anodic microbial communities analysis in sediment microbial fuel cells with/without Fe(III) oxide addition. *Bioresour Technol* 2017;225:402–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.126>.
- [24] Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:441–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>.
- [25] Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, Kuenen JG, Muyzer G. Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;78:1045–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8>.
- [26] An J, Kim B, Nam J, Ng HY, Chang IS. Comparison in performance of sediment microbial fuel cells according to depth of embedded anode. *Bioresour Technol* 2013;127:138–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.095>.
- [27] Rozendal RA, Hamelers HVM, Rabaey K, Keller J, Buisman CJN. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol* 2008;26:450–9. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.008>.
- [28] Xia C, Zhang D, Pedrycz W, Zhu Y, Guo Y. Models for Microbial Fuel Cells: A critical review. *J Power Sources* 2018;373:119–31. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.11.001>.
- [29] Santoro C, Arbizzani C, Erable B, Ieropoulos I. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J Power Sources* 2017;356:225–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- [30] Liang F-Y, Deng H, Zhao F. Sulfur Pollutants Treatment Using Microbial Fuel Cells from Perspectives of Electrochemistry and Microbiology. *Chinese J Anal Chem* 2013;41:1133–9. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60669-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60669-6).
- [31] Schröder U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys Chem Chem Phys* 2007;9:2619–29. <https://doi.org/10.1039/b703627m>.
- [32] Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong M, Besenbacher F, Meyer RL, et al. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature* 2012;491:218–21. <https://doi.org/10.1038/nature11586>.
- [33] Risgaard-Petersen N, Kristiansen M, Frederiksen RB, Dittmer AL, Bjerg JT, Trojan D, et al. Cable bacteria in freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:6003–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-15>.

- [34] Singh KP. Interpretation of electrodic potentials associated with complex biogeochemical processes in contaminated aquatic environments. *J Appl Geophys* 2020;172:103912. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2019.103912>.
- [35] Revelo DM, Hurtado NH, Ruiz JO. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Inf Tecnológica* 2013;24:17–28. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>.
- [36] Reimers CE, Girguis P, Stecher HA, Tender LM, Ryckelynck N, Whaling P. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 2006;4:123–36. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00071.x>.
- [37] Borole AP, Reguera G, Ringeisen B, Wang Z-W, Feng Y, Kim BH. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ Sci* 2011;4:4813. <https://doi.org/10.1039/c1ee02511b>.
- [38] Donovan C, Dewan A, Heo D, Lewandowski Z, Beyenal H. Sediment microbial fuel cell powering a submersible ultrasonic receiver: New approach to remote monitoring. *J Power Sources* 2013;233:79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.12.112>.
- [39] Al-Shehri AN, Ghanem KM, Al-Garni SM. Statistical Optimization of Medium Components to Enhance Bioelectricity Generation in Microbial Fuel Cell. *Arab J Sci Eng* 2013;38:21–7. <https://doi.org/10.1007/s13369-012-0397-9>.
- [40] Alshehria ANZ, Ghanem KM, Al-Garni SM. Application of a five level central composite design to optimize operating conditions for electricity generation in a microbial fuel cell. *J Taibah Univ Sci* 2016;10:797–804. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.01.004>.
- [41] Bratkova S, Alexieva Z, Angelov A, Nikolova K, Genova P, Ivanov R, et al. Efficiency of microbial fuel cells based on the sulfate reduction by lactate and glucose. *Int J Environ Sci Technol* 2019;16:6145–56. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02223-8>.
- [42] Xin X, Chen BY, Hong J. Unraveling interactive characteristics of microbial community associated with bioelectric energy production in sludge fermentation fluid-fed microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2019;289:121652. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121652>.
- [43] González-Paz JR, Ordaz A, Jan-Roblero J, Fernández-Linares LC, Guerrero-Barajas C. Sulfate reduction in a sludge gradually acclimated to acetate as the sole electron donor and its potential application as inoculum in a microbial fuel cell. *Rev Mex Ing Química* 2020;19:1053–69.
- [44] Lovley DR. Bug juice: Harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1442>.
- [45] Corrales LC, Antolinez Romero DM, Bohórquez Macías JA, Corredor Vargas AM. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova* 2015;13:55–81. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>.
- [46] Zhao Q, Yu H, Zhang W, Kabutey FT, Jiang J, Zhang Y, et al. Microbial fuel cell with high content solid wastes as substrates: a review. *Front Environ Sci Eng* 2017;11:13. <https://doi.org/10.1007/s11783-017-0918-6>.
- [47] Esteban DJ, Hysa B, Bartow-McKenney C. Temporal and spatial distribution of the microbial community of Winogradsky columns. *PLoS One* 2015;10:1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134588>.
- [48] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock. *Biología de los microorganismos*. 12th ed. México: Pearson Educación; 2009.
- [49] Logan BE, Rabaey K. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science* (80- ) 2012;337:686–90.
- [50] Moreno C. *Metodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza: CYTED, ORCYT-UNESCO, SEA; 2001.

- [51] Holland KT, Knapp JS, Shoesmith JG. *Anaerobic Bacteria*. vol. 21. London: Blackie & Son Ltd; 1987.
- [52] Torres-Alvarado M del R, Fernández F, Barriga-Sosa I de los A, Ramírez-Vives F. Dinámica de las bacterias anaeróbicas en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en el sedimento de los ecosistemas Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola. *Hidrobiológica* 2006;16:183–96.
- [53] Holmer M, Storkholm P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review. *Freshw Biol* 2001;46:431–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00687.x>.
- [54] Pérez-Rojas A, Márquez-García A. *Sedimentología*. México: UAM-I; 2017.
- [55] Lewis DW, McConchie D. *Analytical Sedimentology*. London: Chapman & Hall; 1994.
- [56] Shepard FP. Nomenclature Based on Sand-Silt-Clay Ratios. *J Sediment Petrol* 1954;24:151–8.
- [57] Liu D, Wong PTS, Dutka BJ. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. *Water Res* 1973;7:741–6. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90090-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90090-0).
- [58] Kolmert Å, Wikström P, Hallberg KB. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods* 2000;41:179–84. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00154-8).
- [59] Lee D-J, Liu X, Weng H-L. Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm. *Bioresour Technol* 2014;156:14–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.129>.
- [60] Tojeiro G. *Taller de Arduino: Un enfoque práctico para principiantes*. Ciudad de México: Alfaomega; 2015.
- [61] Corona Ramírez LG, Abarca Jiménez GS, Mares Carreño J. *Sensores y actuadores: Aplicaciones con Arduino*. 1st ed. Ciudad de México: Grupo Editorial Patria; 2014.
- [62] Biermann CJ. *Handbook of pulping and papermaking*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1996.
- [63] Hamaguchi M, Kautto J, Vakkilainen E. Effects of hemicellulose extraction on the kraft pulp mill operation and energy use: Review and case study with lignin removal. *Chem Eng Res Des* 2013;91:1284–91. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.02.006>.
- [64] Gutiérrez-Pulido H, de la Vara-Salazar R. *Análisis y diseño de experimentos*. vol. 46. 3rd ed. México: McGraw-Hill; 2008. <https://doi.org/10.3906/sag-1507-147>.
- [65] Hassan SHA, Kim YS, Oh SE. Power generation from cellulose using mixed and pure cultures of cellulose-degrading bacteria in a microbial fuel cell. *Enzyme Microb Technol* 2012;51:269–73. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.07.008>.
- [66] Gao C, Wang A, Zhao Y-G. Contribution of sulfate-reducing bacteria to the electricity generation in microbial fuel cells. *Adv Mater Res* 2014;1008–1009:285–9. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1008-1009.285>.
- [67] McCartney DM, Oleszkiewicz JA. Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. *Water Environ Res* 1993;65:655–64.
- [68] Cornejo-Romero A, Serrato-Díaz A, Rendón-Aguilar B, Rocha-Munive MG. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. México: SEMARNAT, INECC, UAM-I; 2014.
- [69] Illumina. *MiniSeq System Guide*. San Diego: Illumina; 2016.
- [70] Hammer O. *PAST Paleontological Statistics version 4.06. Reference manual*. Oslo: Natural History Museum, University of Oslo; 2021.

- [71] Secretaría de Economía. Proyecto de Norma Mexicana Proy-NMX-AA-084-SCFI-2008 Análisis de agua. Determinación de sulfuros prueba (Cancela al Proy-NMX-AA-084-SCFI-2005). México: Diario Oficial de la Federación; 2008.
- [72] Cord-Ruwisch R. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 1985;4:33–6.
- [73] Stal LJ, van Gemerden H, Krumbein WE. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J Microbiol Methods* 1984;2:295–306. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(84)90048-4).
- [74] Aoshima H, Kimura a., Shibutani a., Okada C, Matsumiya Y, Kubo M. Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;71:875–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0245-x>.
- [75] Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 2006;89:27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.
- [76] Namsaraev ZB. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Microbiology* 2009;78:794–7. <https://doi.org/10.1134/S0026261709060174>.
- [77] Caraco N, Puccoon AH. The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll a in natural waters. *Limnol Oceanogr* 1986;31:889–93. <https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.4.0889>.
- [78] Zoski CG. Handbook of electrochemistry. Amsterdam: Elsevier; 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51958-0.X5000-9>.
- [79] Calva-Benítez LG, Torres-Alvarado MR. Textura de sedimentos y carbono orgánico en el sistema costero lagunar Alvarado, Veracruz. *Contactos* 2011;81:11–6.
- [80] Dauwe B, Middelburg JJ. Amino acids and hexosamines as indicators of organic matter degradation state in North Sea sediments. *Limnol Oceanogr* 1998;43:782–98. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.5.0782>.
- [81] Sakellari A, Plavšić M, Karavoltos S, Dassenakis M, Scoullou M. Assessment of copper, cadmium and zinc remobilization in Mediterranean marine coastal sediments. *Estuar Coast Shelf Sci* 2011;91:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.09.008>.
- [82] Song TS, Jiang HL. Effects of sediment pretreatment on the performance of sediment microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2011;102:10465–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.129>.
- [83] Manohar AK, Mansfeld F. The internal resistance of a microbial fuel cell and its dependence on cell design and operating conditions. *Electrochim Acta* 2009;54:1664–70. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.06.047>.
- [84] Catal T, Li K, Bermek H, Liu H. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *J Power Sources* 2008;175:196–200. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.09.083>.
- [85] Rosenbaum M, He Z, Angenent LT. Light energy to bioelectricity: Photosynthetic microbial fuel cells. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:259–64. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.010>.
- [86] He Z, Kan J, Mansfeld F, Angenent LT, Nealson KH. Self-sustained phototrophic microbial fuel cells based on the synergistic cooperation between photosynthetic microorganisms and heterotrophic bacteria. *Environ Sci Technol* 2009;43:1648–54. <https://doi.org/10.1021/es803084a>.
- [87] Pinto RP, Srinivasan B, Manuel MF, Tartakovsky B. A two-population bio-electrochemical model of a microbial fuel cell. *Bioresour Technol* 2010;101:5256–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.122>.

- [88] Weng H-L, Lee D-J. Performance of sulfate reducing bacteria-microbial fuel cells: reproducibility. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2015;56:148–53. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.04.028>.
- [89] Liu L, Chou T-Y, Lee C-Y, Lee D-J, Su A, Lai J-Y. Performance of freshwater sediment microbial fuel cells: Consistency. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:4504–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.139>.
- [90] Song T-S, Yan Z-S, Zhao Z-W, Jiang H-L. Construction and operation of freshwater sediment microbial fuel cell for electricity generation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011;34:621–7. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0511-x>.
- [91] Rezaei F, Xing D, Wagner R, Regan JM, Richard TL, Logan BE. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3673–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-08>.
- [92] Abia ALK, Alisoltani A, Keshri J, Ubomba-Jaswa E. Metagenomic analysis of the bacterial communities and their functional profiles in water and sediments of the Apies River, South Africa, as a function of land use. *Sci Total Environ* 2018;616–617:326–34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.322>.
- [93] Riah-Anglet W, Trinsoutrot-Gattin I, Norini MP, Gauthier A, Latour X, Laval K. Initial state of soil microbial communities determines their stress response. *J Environ Chem Eng* 2018;6:5470–80. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.019>.
- [94] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2nd ed. New York: Springer; 2005.
- [95] De Vos P, Garrity GM, Dorothy J, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3 The Firmicutes*. 2nd ed. New York: Springer; 2009.
- [96] Gutiérrez-Pulido H, de la Vara-Salazar R. *Análisis y diseño de experimentos*. 2nd ed. México: McGraw-Hill; 2008.
- [97] DeLong EF, Stephen L, Stackebrandt E, Fabiano T. *The Prokaryotes, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. 4th ed. Springer; 2014.
- [98] Holmes DE, Bond DR, Neil RAO, Reimers CE, Tender LR, Lovley DR. *Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments* 2004;48:178–90. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>.
- [99] Moreno C. *La Biodiversidad en un mundo cambiante: Fundamentos teóricos y metodológicos para su estudio*. Pachuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2019.
- [100] Lovley DR. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:564–71. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.005>.
- [101] Jardim WF. Measurement and interpretation of redox potential values in environmental matrices. *Quim Nova* 2014;37:1233–5. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140207>.
- [102] Oliva-González S, Almeida C, Quintar S, González P, Mallea MA. El uso del potencial redox en muestras ambientales. *Anu Latinoam Química* 2008;23:122–5.
- [103] Pagaling E, Strathdee F, Spears BM, Cates ME, Allen RJ, Free A. Community history affects the predictability of microbial ecosystem development. *ISME J* 2014;8:19–30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.150>.
- [104] González-Muñoz ME. Bacterias reductoras de sulfato de sedimentos costeros como una alternativa para la generación de energía renovable. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 2015. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>.
- [105] Bilgin A, Jaffé PR. Precipitation of Copper (II) in a Two-Stage Continuous Treatment System Using Sulfate Reducing Bacteria. *Waste and Biomass Valorization* 2019;10:2907–14. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0329-3>.

- [106] Sharifian R, Wagterveld RM, Digdaya IA, Xiang C, Vermaas DA. Electrochemical carbon dioxide capture to close the carbon cycle. *Energy Environ Sci* 2021;14:781–814. <https://doi.org/10.1039/d0ee03382k>.
- [107] Wasmund K, Mußmann M, Loy A. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. *Environ Microbiol Rep* 2017;9:323–44. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12538>.
- [108] Willow MA, Cohen RRH. pH, Dissolved Oxygen, and Adsorption Effects on Metal Removal in Anaerobic Bioreactors. *J Environ Qual* 2003;32:1212. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1212>.
- [109] Kurtz JC, Devereux R, Barkay T, Jonas RB. Evaluation of sediment slurry microcosms for modeling microbial communities in estuarine sediments. *Environ Toxicol Chem* 1998;17:1274–81. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1998\)017<1274:EOSSMF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<1274:EOSSMF>2.3.CO;2).
- [110] Chuang SH, Pai TY, Horng RY. Biotreatment of sulfate-rich wastewater in an anaerobic/micro-aerobic bioreactor system. *Environ Technol* 2005;26:993–1002. <https://doi.org/10.1080/09593332608618487>.
- [111] Baeg J-O. A novel nanoscale semiconductor photocatalyst for solar hydrogen production. *Sol Hydrog Nanotechnol III* 2008;7044:70440O. <https://doi.org/10.1117/12.793487>.
- [112] Ren Z, Steinberg LM, Regan JM. Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. *Water Sci Technol* 2008;58:617–22. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.431>.
- [113] Cooney MJ, Roschi E, Marison IW, Comninellis C. Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme Microb Technol* 1996;18:358–65.
- [114] Overmann J, Cypionka H, Pfennig N. An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnol Oceanogr* 1992;37:150–5. <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.1.0150>.
- [115] van Gemerden H. Growth measurements of *Chromatium* cultures. *Arch Mikrobiol* 1968;64:103–10. <https://doi.org/10.1007/BF00406968>.
- [116] Pourbaix M. *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*. Huston, Texas: National Association of Corrosion Engineers; 1974.
- [117] Yamasaki R, Maeda T, Wood TK. Electron carriers increase electricity production in methane microbial fuel cells that reverse methanogenesis. *Biotechnol Biofuels* 2018;11:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1208-7>.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1. Programación de tarjetas Arduino

#### A) Sketch para medir el voltaje en las celdas microbianas.

```
//SDcard temperatura-humedad y 4 sensores de voltaje con promedio
/*
SD card attached to SPI bus as follow
  CS - pin 10
  MOSI - pin 11
  SCK - pin 13
  MISO - pin 12

  S0 - A0
  S1 - A1
  S2 - A2
  S3 - A3

*/
#include <DHT11.h>
#include <SPI.h>
#include <SD.h>
const int chipSelect = 10;
int tiempo = 0;
int c = 0;
int n = 0;
int pin=2;
int err;
float temp;
float hum;
int sensorValue = 0; // variable to store the value coming from the sensor

int analogInput0 = A0;
int analogInput1 = A1;
int analogInput2 = A2;
int analogInput3 = A3;

float vout0 = 0.0;
float vin0 = 0.0;
float v0 = 0.0;
float vs0 = 0.0;
float vout1 = 0.0;
float vin1 = 0.0;
float v1 = 0.0;
float vs1 = 0.0;
float vout2 = 0.0;
float vin2 = 0.0;
float v2 = 0.0;
float vs2 = 0.0;
```

```

float vout3 = 0.0;
float vin3 = 0.0;
float v3 = 0.0;
float vs3 = 0.0;

float R1 = 30000.0; //
float R2 = 7500.0; //
int value0 = 0;
int value1 = 0;
int value2 = 0;
int value3 = 0;

DHT11 dht11(pin);

void setup()
{
  Serial.begin(9600);
  Serial.println("Voltaje, luz, temperatura y humedad");
  Serial.println("iniciando sd card");
  pinMode(chipSelect,OUTPUT);
  if (!SD.begin(chipSelect))
  {
    Serial.print("fallo lectura de sd card");
  }
  Serial.println("sd card inicializada");
}

void loop()
{
  for(c=0; c<7200; c++)
  {
    tiempo ++;
    sdcard();
    delay(60000);

    // luz, temperatura-humedad

    if((err = dht11.read(hum, temp)) == 0) // Si devuelve 0 es que ha leído
bien
    {
      Serial.print(sensorValue); //prints the values coming from the
sensor on the screen
      Serial.print(" Temperatura: ");
      Serial.print(temp);
      Serial.print(" Humedad: ");
      Serial.print(hum);
      Serial.println();
    }
    else
    {
      Serial.println();
      Serial.print("Error Num :");
      Serial.print(err);
      Serial.println();
    }
  }

  // voltaje

  vs0 = 0;

```

```

vs1 = 0;
vs2 = 0;
vs3 = 0;

for(n=0; n<30; n++)
{
// voltaje
// read the value at analog input

value0 = analogRead(analogInput0);
vout0 = (value0 * 5.0) / 1024.0; // see text
vin0 = vout0 / (R2/(R1+R2));
vs0 = vs0 + vin0;

value1 = analogRead(analogInput1);
vout1 = (value1 * 5.0) / 1024.0; // see text
vin1 = vout1 / (R2/(R1+R2));
vs1 = vs1 + vin1;

value2 = analogRead(analogInput2);
vout2 = (value2 * 5.0) / 1024.0; // see text
vin2 = vout2 / (R2/(R1+R2));
vs2 = vs2 + vin2;

value3 = analogRead(analogInput3);
vout3 = (value3 * 5.0) / 1024.0; // see text
vin3 = vout3 / (R2/(R1+R2));
vs3 = vs3 + vin3;
}

v0 = vs0/30;
Serial.print("Volt0: ");
Serial.println(v0,4);

v1 = vs1/30;
Serial.print("Volt1: ");
Serial.println(v1,4);

v2 = vs2/30;
Serial.print("Volt2: ");
Serial.println(v2,4);

v3 = vs3/30;
Serial.print("Volt3: ");
Serial.println(v3,4);
}
}
void sdcard()
{
String dataString ="";
dataString += String("tiempo");
dataString += ",";
dataString += String(tiempo);
dataString += ",";
dataString += String("temperatura");
dataString += ",";
dataString += String(temp);
dataString += ",";
dataString += String("humedad");
}

```

```

dataString += ",";
dataString += String(hum);
dataString += ",";
dataString += String("volt0");
dataString += ",";
dataString += String(vin0,4);
dataString += ",";
dataString += String("volt1");
dataString += ",";
dataString += String(vin1,4);
dataString += ",";
dataString += String("volt2");
dataString += ",";
dataString += String(vin2,4);
dataString += ",";
dataString += String("volt3");
dataString += ",";
dataString += String(vin3,4);

File daFile = SD.open("datalog.txt", FILE_WRITE);
if (daFile)
{
  daFile.print(",");
  daFile.println(dataString);
  daFile.close();
  Serial.println(dataString);
}
else
{
  Serial.println("error al abrir datalog.txt");
}
}

```

**B) Sketch para medir el voltaje e iluminancia en las celdas microbianas.**

```
//SDcard Luz, y 3 sensores de voltaje
/*
SD card attached to SPI bus as follow
CS - pin 10
MOSI - pin 11
SCK - pin 13
MISO - pin 12

S1 - A1
S2 - A2
S3 - A3

*/
#include <SPI.h>
#include <SD.h>
const int chipSelect = 10;
int tiempo = 0;
int c = 0;
int err;
int sensorPin = A0; // select the input pin for ldr
int sensorValue = 0; // variable to store the value coming from the sensor

int analogInput1 = A1;
int analogInput2 = A2;
int analogInput3 = A3;

float vout1 = 0.0;
float vin1 = 0.0;
float v1 = 0.0;
float vs1 = 0.0;
float vout2 = 0.0;
float vin2 = 0.0;
float v2 = 0.0;
float vs2 = 0.0;
float vout3 = 0.0;
float vin3 = 0.0;
float v3 = 0.0;
float vs3 = 0.0;

float R1 = 30000.0; //
float R2 = 7500.0; //
int value1 = 0;
int value2 = 0;
int value3 = 0;

void setup()
{
  Serial.begin(9600);
  Serial.println("Voltaje y luz");
  Serial.println("iniciando sd card");
  pinMode(chipSelect,OUTPUT);
  if (!SD.begin(chipSelect))
  {
    Serial.print("fallo lectura de sd card");
  }
  Serial.println("sd card inicializada");
}
```

```

void loop()
{
  for(c=0; c<7200; c++)
  {
    tiempo ++;
    sdcard();
    delay(60000);

    // luz
    Serial.print("Oscuridad: ");
    sensorValue = analogRead(sensorPin); // read the value from the sensor
    Serial.println(sensorValue); //prints the values coming from the sensor on
the screen

    vs1 = 0;
    vs2 = 0;
    vs3 = 0;

    for(n=0; n<30; n++)
    {
      // voltaje
      // read the value at analog input

      value1 = analogRead(analogInput1);
      vout1 = (value1 * 5.0) / 1024.0; // see text
      vin1 = vout1 / (R2/(R1+R2));
      vs1 = vs1 + vin1;

      value2 = analogRead(analogInput2);
      vout2 = (value2 * 5.0) / 1024.0; // see text
      vin2 = vout2 / (R2/(R1+R2));
      vs2 = vs2 + vin2;

      value3 = analogRead(analogInput3);
      vout3 = (value3 * 5.0) / 1024.0; // see text
      vin3 = vout3 / (R2/(R1+R2));
      vs3 = vs3 + vin3;
    }

    v1 = vs1/30;
    Serial.print("Volt1: ");
    Serial.println(v1,4);

    v2 = vs2/30;
    Serial.print("Volt2: ");
    Serial.println(v2,4);

    v3 = vs3/30;
    Serial.print("Volt3: ");
    Serial.println(v3,4);

  }
}

void sdcard()
{
  String dataString = "";

```

```

dataString += String("tiempo");
dataString += ",";
dataString += String(tiempo);
dataString += ",";
dataString += String("oscuridad");
dataString += ",";
dataString += String(sensorValue);
dataString += ",";
dataString += String("volt1");
dataString += ",";
dataString += String(v1,4);
dataString += ",";
dataString += String("volt2");
dataString += ",";
dataString += String(v2,4);
dataString += ",";
dataString += String("volt3");
dataString += ",";
dataString += String(v3,4);

File daFile = SD.open("datalog.txt", FILE_WRITE);
if (daFile)
{
  daFile.print(",");
  daFile.println(dataString);
  daFile.close();
  Serial.println(dataString);
}
else
{
  Serial.println("error al abrir datalog.txt");
}
}

```

## 8.2 Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN para muestras de sedimento y agua

Se utilizó el kit Jena Bioscience para la extracción de ADN de bacterias con modificaciones al protocolo:

1. Se utilizaron puntas estériles despuntadas de 1,000  $\mu\text{L}$  para tomar las muestras. De la zona superior (agua y sedimento depositado sobre el electrodo) se tomaron 600  $\mu\text{L}$  y se colocaron en un microtubo eppendorf. De la zona inferior y mezcla (lodo) se tomaron 250  $\mu\text{L}$  y se colocaron en un microtubo eppendorf.
2. El microtubo con muestra de la zona superior se centrifugó a 15,000 g por 1 min y se descartó el sobrenadante con la micropipeta.
3. Se agregó el amortiguador de resuspensión celular, 300  $\mu\text{L}$  al microtubo de la muestra de la zona superior y 250  $\mu\text{L}$  a los microtubos de la muestra de la zona inferior y mezcla. Se deshizo el pellet en los microtubos centrifugados para resuspender las células.
4. Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de lisozima en cada microtubo y se mezcló invirtiendo 2 o 3 veces. Se incubó en un thermoblock a 37°C durante 40 min.
5. Se centrifugó a 15,000 g por 1 min y se descartó el sobrenadante.
6. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de la solución de lisis celular (Cell Lysis Solution), se resuspendió el precipitado y se agitó en vórtex durante 45 s.
7. Se centrifugó a 10,000 g por 1 min y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo con 1.5  $\mu\text{L}$  de ARNasa. Los microtubos se incubaron en un thermoblock a 37°C durante 25 min.
8. Los microtubos se enfriaron en hielo durante 90 s, posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución para precipitar proteínas (Protein Precipitation) y se agitaron en vórtex 25 s y se enfriaron durante 5 min.
9. Se centrifugó a 15,000 g por 6 min y se transfirió el sobrenadante (300  $\mu\text{L}$ ) a un microtubo nuevo con 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Se mezcló invirtiendo los microtubos 40 veces.
10. Se centrifugó a 15,000 g por 3 min, se descartó el sobrenadante decantando cuidadosamente y se secó con papel.
11. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lavado con etanol (Washing buffer) y se mezcló invirtiendo los microtubos 25 veces.
12. Se centrifugó a 15,000 g por 3 min, se descartó el sobrenadante decantando cuidadosamente y se secó con papel.
13. Se secaron los microtubos y se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de la solución de hidratación a ADN y se incubó en el thermoblock a 40°C durante 25 min.
14. Los microtubos con el ADN se refrigeraron y posteriormente se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

### 8.3 Anexo 3. Equipo de secuenciación Miniseq de Illumina.



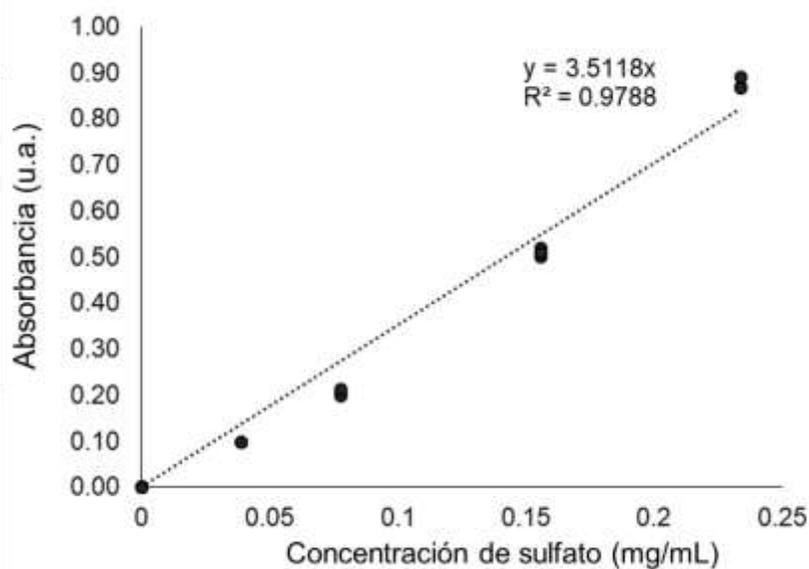
**Figura 8.1.** Equipo MiniSeq de Illumina para la secuenciación de las muestras.

#### 8.4 Anexo 4. Curva patrón para sulfato [58].

Para determinar la curva patrón de sulfatos se preparó por triplicado una solución con una concentración de 0.01 g/mL (10 mg/mL) de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) que corresponde a una concentración de 3.897 mg/mL de sulfato. Se realizaron una serie de diluciones (Tabla 8.1) y se midió la absorbancia a 420 nm para obtener la curva patrón (Fig. 8.2).

**Tabla 8.1.** Soluciones de sulfato con concentración conocida para obtener la curva patrón.

Volumen de solución de sulfatos ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de agua ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de sulfato (mg/mL)
1000	0	0.3897
800	200	0.3118
600	400	0.2338
400	600	0.1559
200	800	0.0779
100	900	0.0390
0	1000	0



**Figura 8.2.** Curva patrón para sulfato. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 420 nm.

## 8.5 Anexo 5. Curva patrón para sulfuro [72].

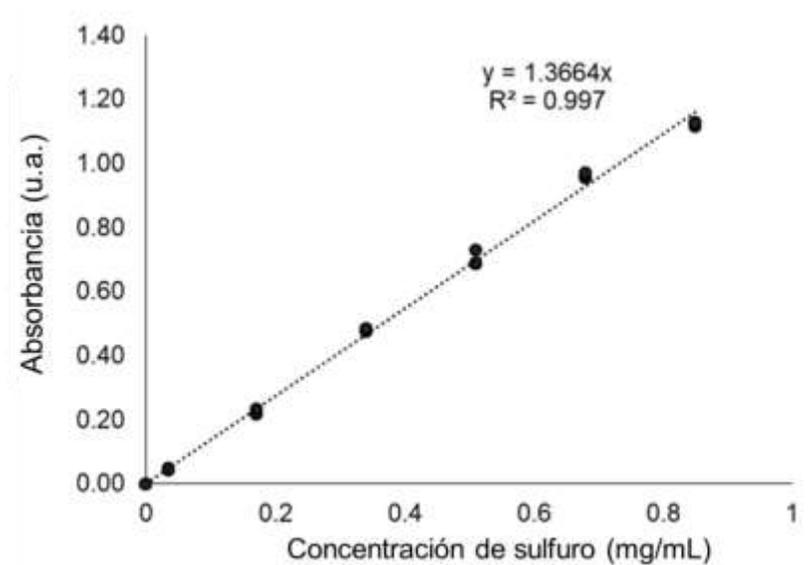
Se preparó la solución de sulfuro por triplicado y las diluciones con el siguiente procedimiento:

1. En un tubo de ensayo se colocaron 10 mL una solución al 0.5 N de NaOH y se hirvió para desplazar el oxígeno del agua.
2. Se agregaron 0.245 g de sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) en el tubo, esto representa una concentración de sulfuro de 3.39 mg/mL.
3. Este tubo se agitó y se realizaron diluciones para determinar la concentración de sulfuros.
4. Las diluciones a partir de la solución de sulfuro se realizaron en tubos eppendorf con una solución de hidróxido de sodio como se indica en la siguiente tabla 8.2.

**Tabla 8.2.** Soluciones de sulfuro con concentración conocida para obtener la curva patrón.

Volumen de solución de sulfuro ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de solución de NaOH 1N ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de agua ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de sulfuro (mg/mL)
500	500	0	1.699
250	500	250	0.849
200	500	300	0.679
150	500	350	0.510
100	500	400	0.340
50	500	450	0.170
10	500	490	0.034
0	500	500	0

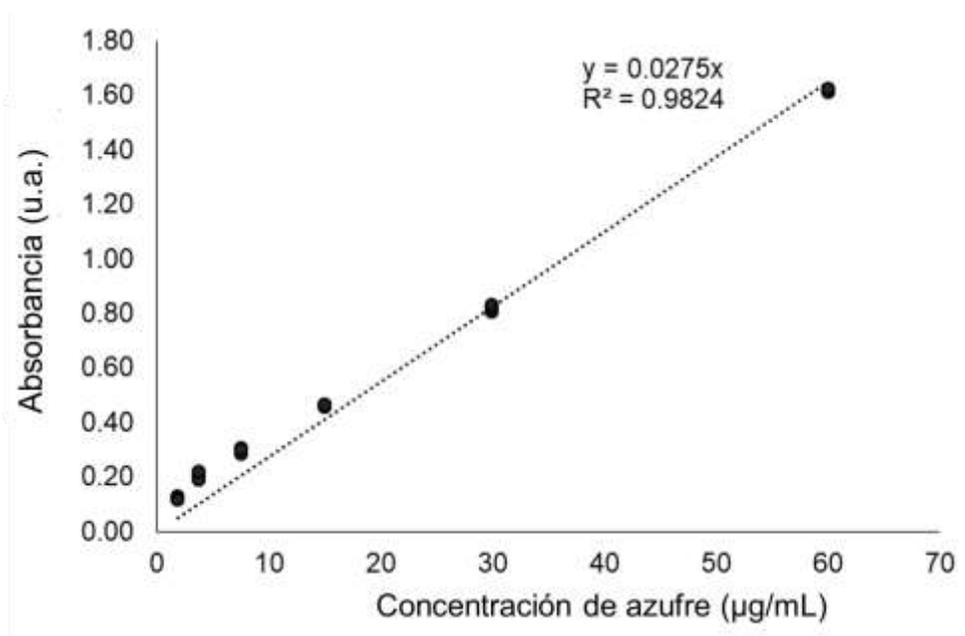
5. Se realizó el procedimiento de la técnica y se determinó la absorbancia a 480 nm para obtener la curva patrón (Fig. 8.3).



**Figura 8.3.** Curva patrón para sulfuro. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 480 nm.

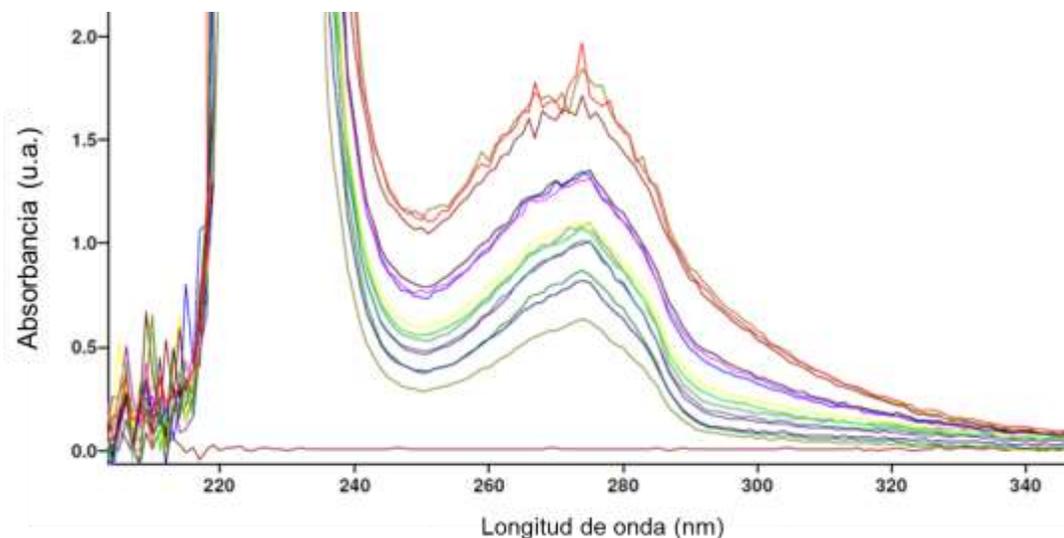
## 8.6 Anexo 6. Curva patrón para azufre [73].

Para realizar esta técnica no se contaba con las concentraciones adecuadas para hacer la curva patrón y fue necesario hacer diluciones seriadas para probar diferentes concentraciones. Se pesaron 0.001 g de azufre elemental y se colocaron en un tubo eppendorf con 1 mL de hexano, esto corresponde a una concentración de 1 mg/mL. Después se realizó una dilución para obtener una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$ . De esta solución se hicieron diluciones seriadas (en cada paso se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se colocaron en 500  $\mu\text{L}$  de hexano) para obtener las concentraciones de 30, 15, 7.5, 3.75 y 1.88  $\mu\text{g/mL}$ . De cada concentración se realizó la lectura de absorbancia a 274 nm para obtener la curva patrón (Fig. 8.4).



**Figura 8.4.** Curva patrón para azufre elemental. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 274 nm.

La medición de azufre se realizó a los 274 nm porque en esta longitud de onda se observa un pico correspondiente a las muestras del elemento en el barrido de absorbancia (Fig. 8.5).



**Figura 8.5.** Barrido de absorbancia de 200 a 350 nm de las diluciones de azufre solubilizadas en hexano.

La muestra es estable para realizar la lectura en el espectrofotómetro pero es necesario considerar que el hexano se evapora y es recomendable que no pase mucho tiempo antes de hacer la lectura.

Se utilizó una solución de sulfatos para determinar la especificidad de la determinación de azufre. Aunque existe cierta interferencia del sulfato en la prueba, la cantidad de azufre detectada es mínima. La tabla 8.3 muestra la cantidad de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), la concentración de sulfato, la concentración de azufre y la cantidad de azufre detectada en la prueba.

**Tabla 8.3.** Diluciones de sulfato, concentración de sulfato y azufre.

Dilución	Solución g/mL	Concentración de sulfatos (g/mL)	Concentración de azufre ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	Concentración de azufre ( $\mu\text{g/mL}$ )
	0.01	0.0038975	1298.31	0.151	5.4909
100 en 900 ul	0.001	0.0003898	129.83	0.108	3.9273
100 en 900 ul	0.0001	0.0000389	12.98	0.051	1.8545

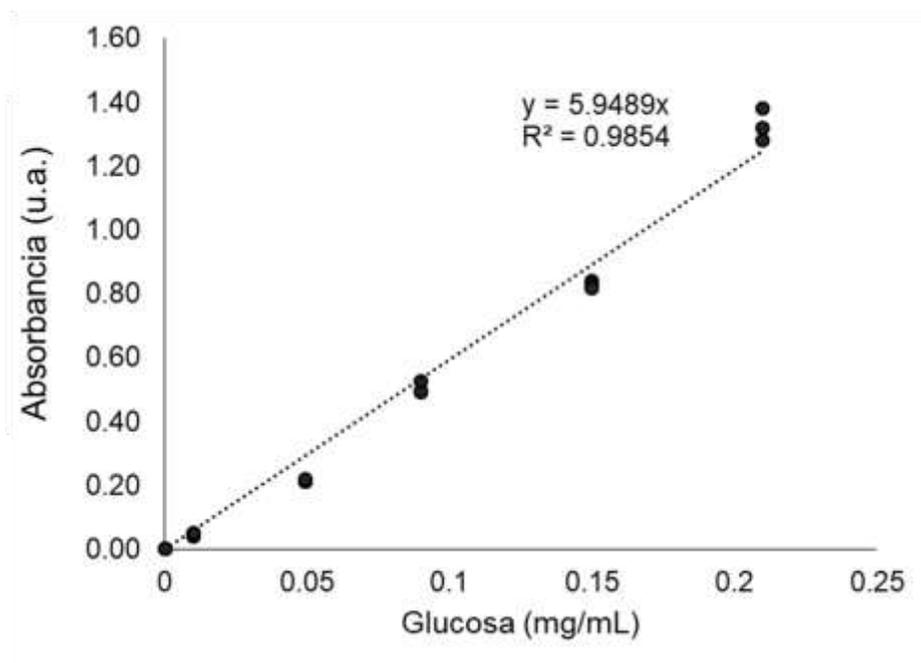
Es decir, por cada 1298  $\mu\text{g}$  de azufre en forma de sulfato sólo se detectaron 5.5  $\mu\text{g}$  de azufre.

## 8.7 Anexo 7. Curva patrón para carbohidratos [57].

Para determinar la curva patrón de carbohidratos con glucosa se preparó por triplicado una solución con una concentración de 0.3 mg/mL de glucosa. Se realizaron diluciones (Tabla 8.4) y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 nm para obtener la curva patrón (Fig. 8.6).

**Tabla 8.4.** Diluciones de glucosa con concentración conocida para obtener la curva patrón de carbohidratos.

Solución de glucosa ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de glucosa (mg/mL)
700	300	0.21
500	500	0.15
300	700	0.09
165	835	0.05
35	965	0.01
0	1000	0

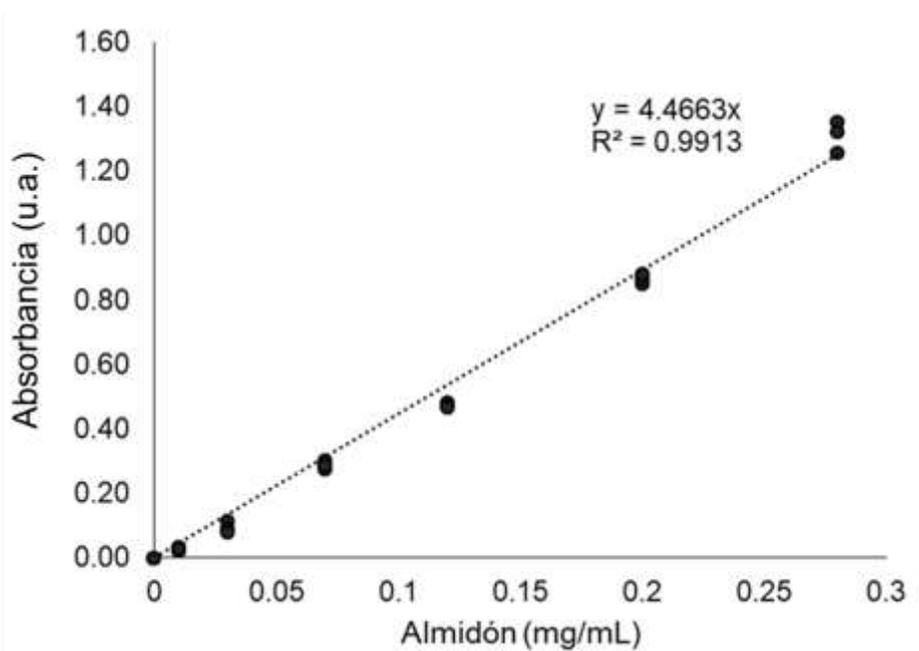


**Figura 8.6.** Curva patrón para carbohidratos (glucosa). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm.

Para obtener la curva patrón de carbohidratos con almidón se preparó por triplicado una solución con una concentración de 0.4 mg/mL de glucosa (para solubilizar el almidón, en este caso fue necesario calentar el agua). Las diluciones para obtener la curva patrón se muestran en la tabla 8.5. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 nm para obtener la curva patrón (Fig. 8.7).

**Tabla 8.5.** Diluciones de almidón con concentración conocida para obtener la curva patrón de carbohidratos.

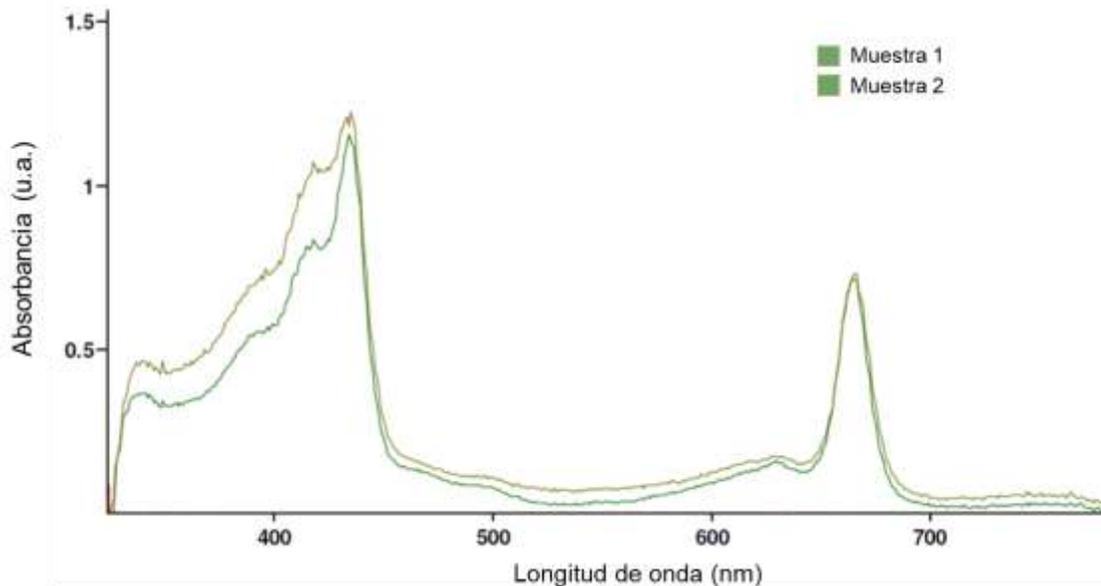
Solución de almidón (µL)	Agua (µL)	Concentración de glucosa (mg/mL)
700	300	0.28
500	500	0.20
300	700	0.12
175	825	0.07
75	925	0.03
25	975	0.01
0	1000	0



**Figura 8.7.** Curva patrón para carbohidratos (almidón). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 485 nm.

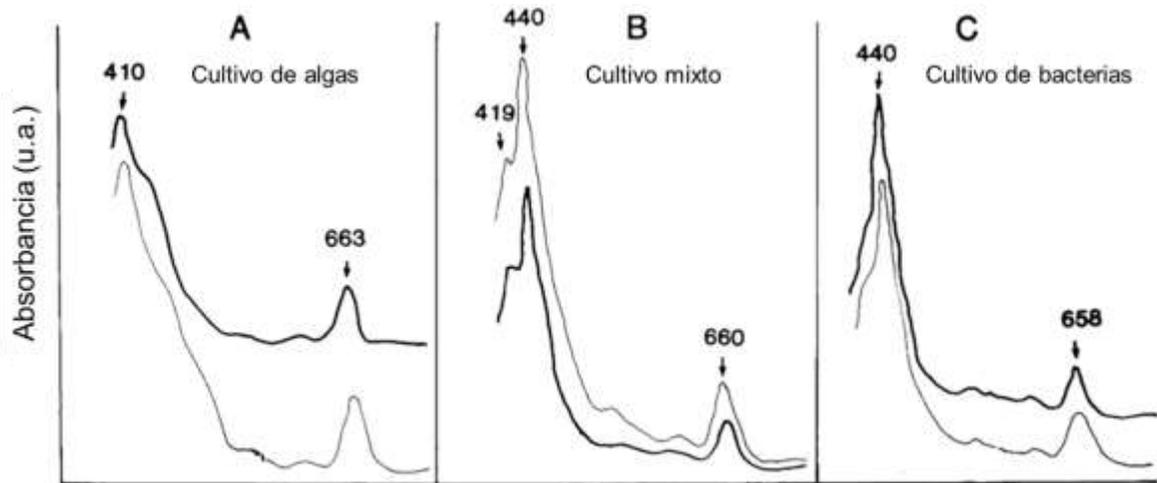
## 8.8 Anexo 8. Barrido de la absorbancia de clorofila [75–77].

Las muestras para la determinación de clorofila se solubilizaron en acetona y se realizó el barrido de absorbancia desde los 300 hasta los 800 nm (Fig. 8.8). Los picos más grandes se observaron en las longitudes de onda de 435 nm y 660 nm, también se observó un pequeño pico a los 630 nm.



**Figura 8.8.** Barrido de absorbancia de 300 a 800 nm de dos muestras de clorofila solubilizada en acetona.

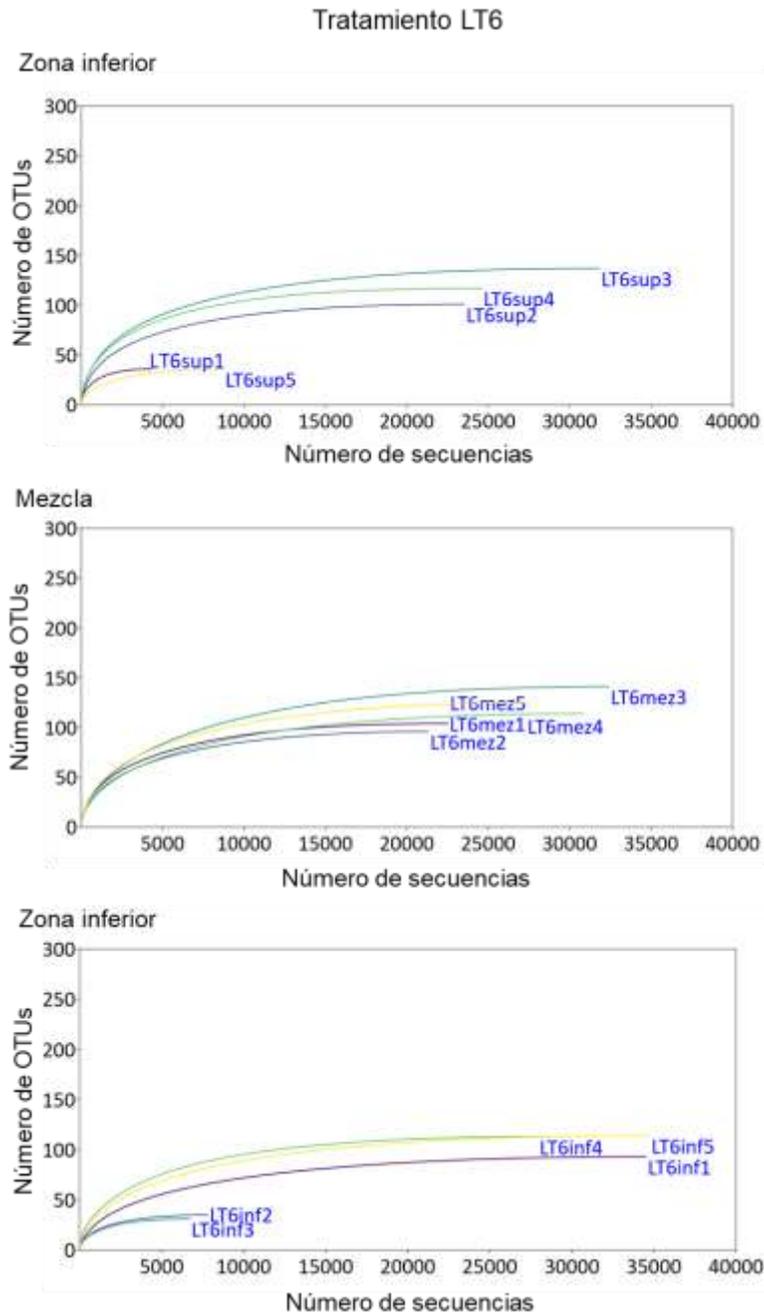
Este barrido de absorbancia es similar a la reportada por otros autores que estudiaron a las bacterias verdes del azufre en muestras ambientales y realizaron la extracción con acetona [77,114]. Es importante mencionar que las clorofilas de las bacterias verdes del azufre tienen un pico de absorbancia en 658 nm y este es muy cercano al pico de absorbancia de la clorofila a presente en organismos fotoautótrofos oxigénicos que es de 663 o 664 nm (Fig. 8.9) [75,77].



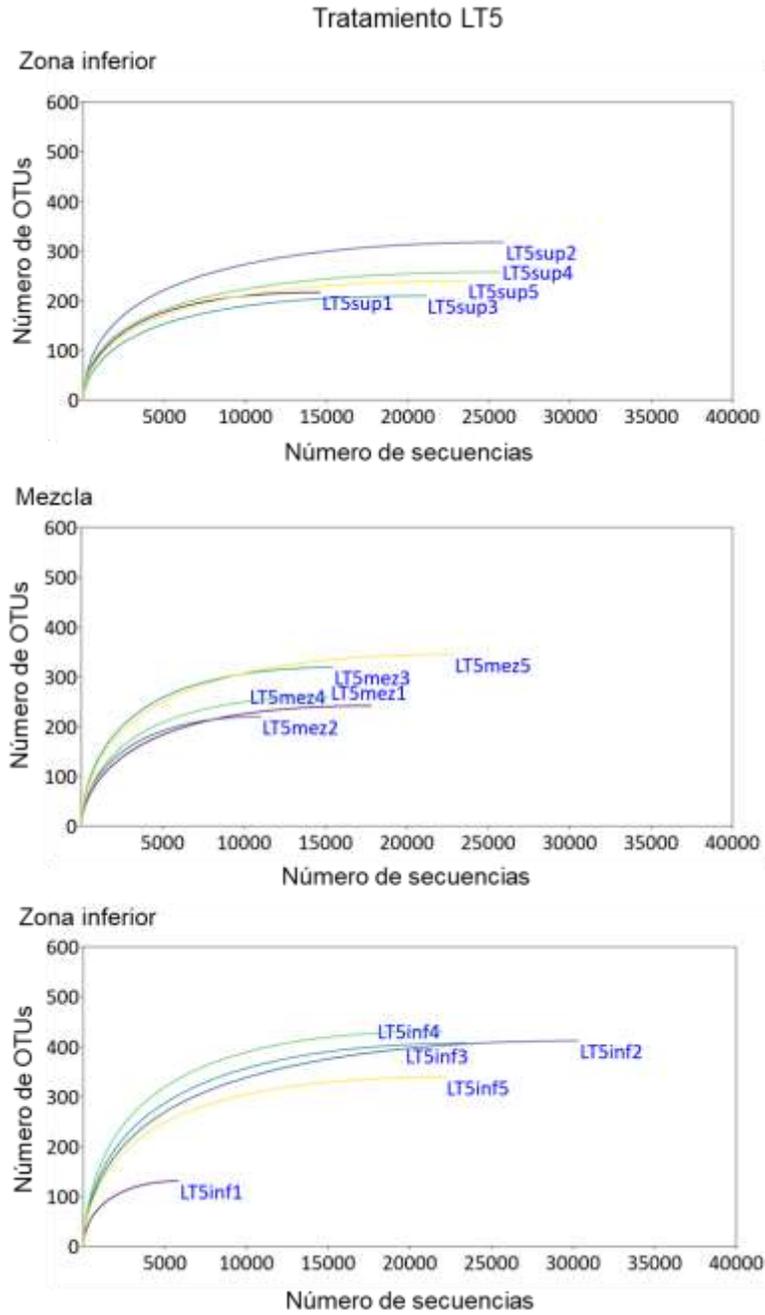
**Figura 8.9.** Barrido de absorbancia de A) cultivo de algas, B) cultivo mixto y C) cultivo de bacterias. Modificado de Coraco & Puccoon [77].

## 8.9 Anexo 9. Curvas de rarefacción de las columnas de Winogradsky.

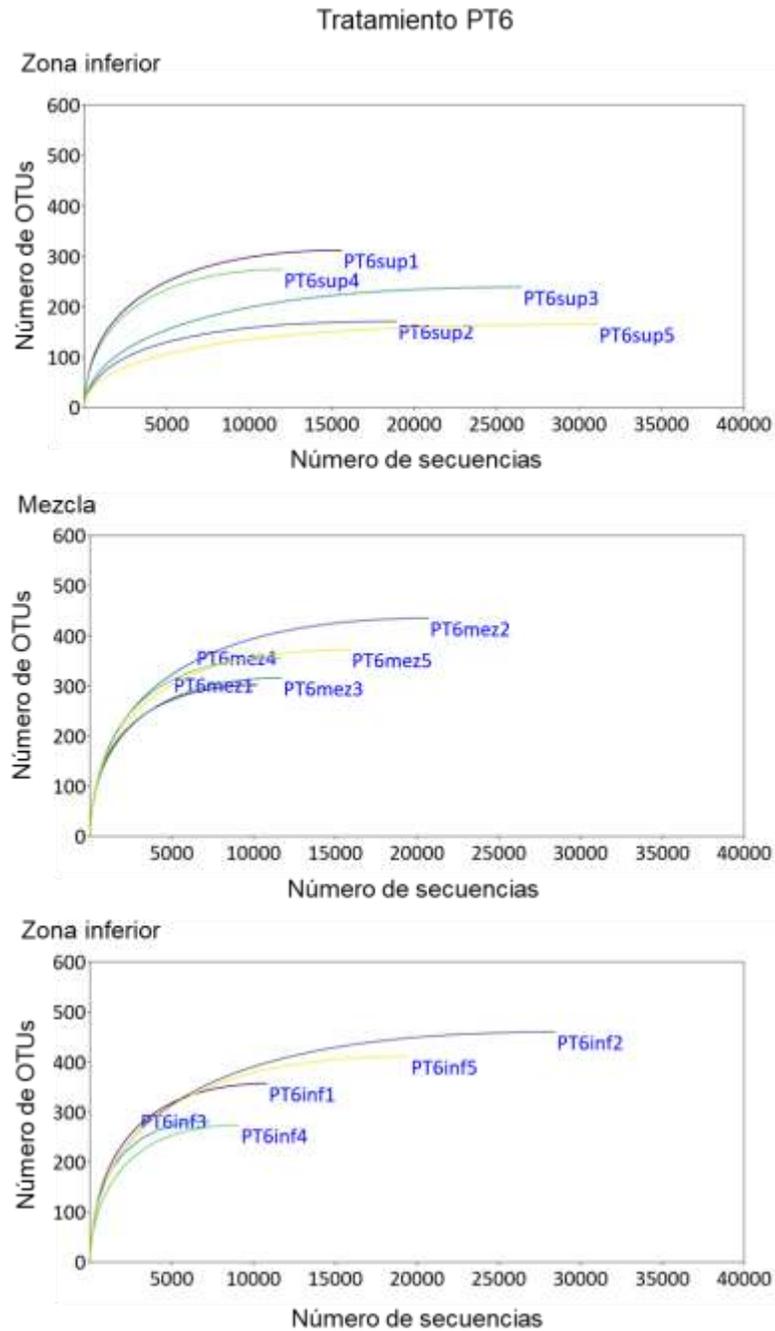
Curvas de rarefacción de las muestras de las columnas de Winogradsky correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6 (Fig. 8.10), LT5 (Fig. 8.11), PT6 (Fig. 8.12) y PT5 (Fig. 8.13). Estas curvas nos indican que se alcanzó un número adecuado de lecturas para cada muestra cuando se alcanza la asíntota.



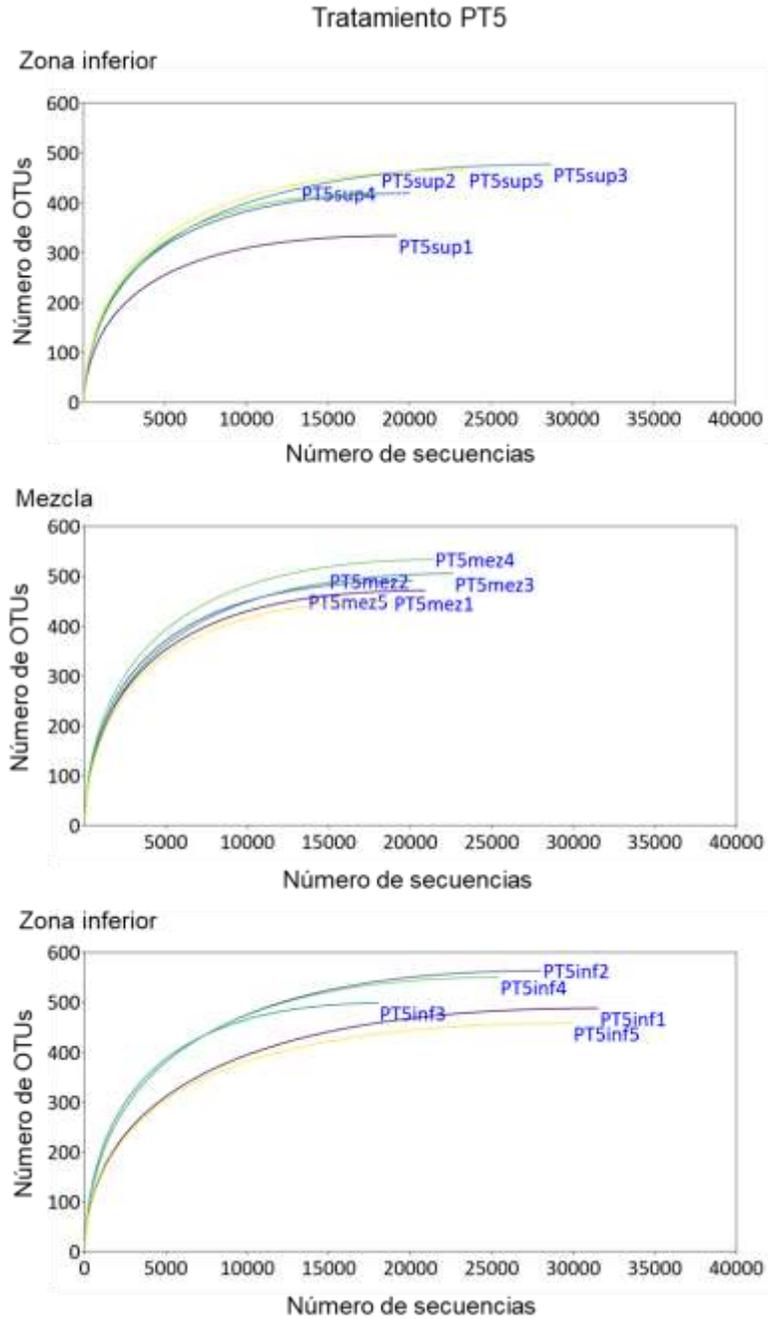
**Figura 8.10.** Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6.



**Figura 8.11.** Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT5.



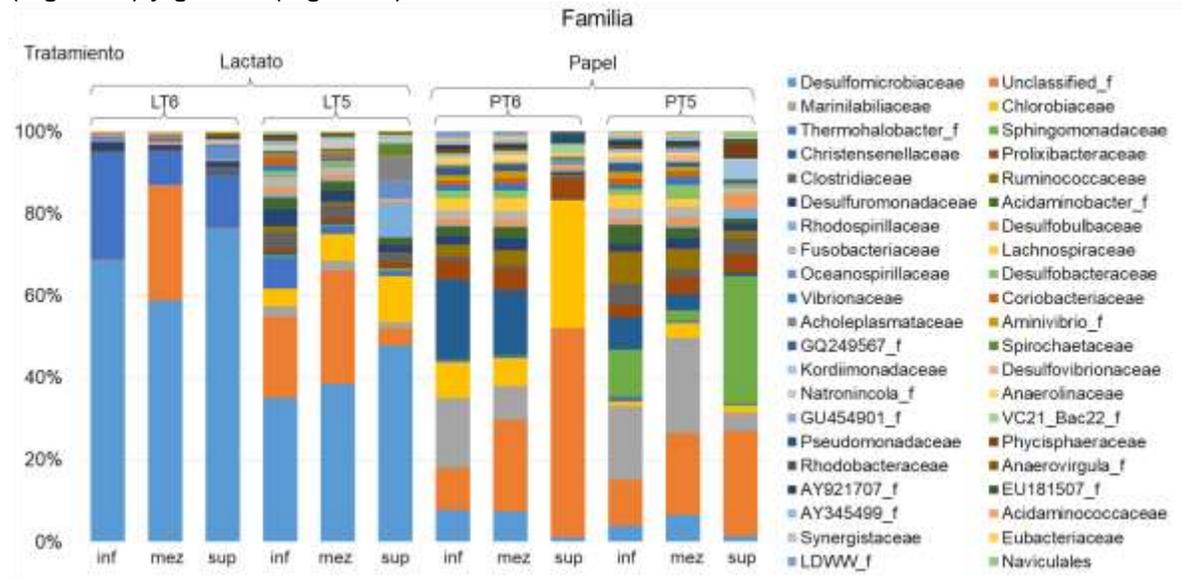
**Figura 8.12.** Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos PT6.



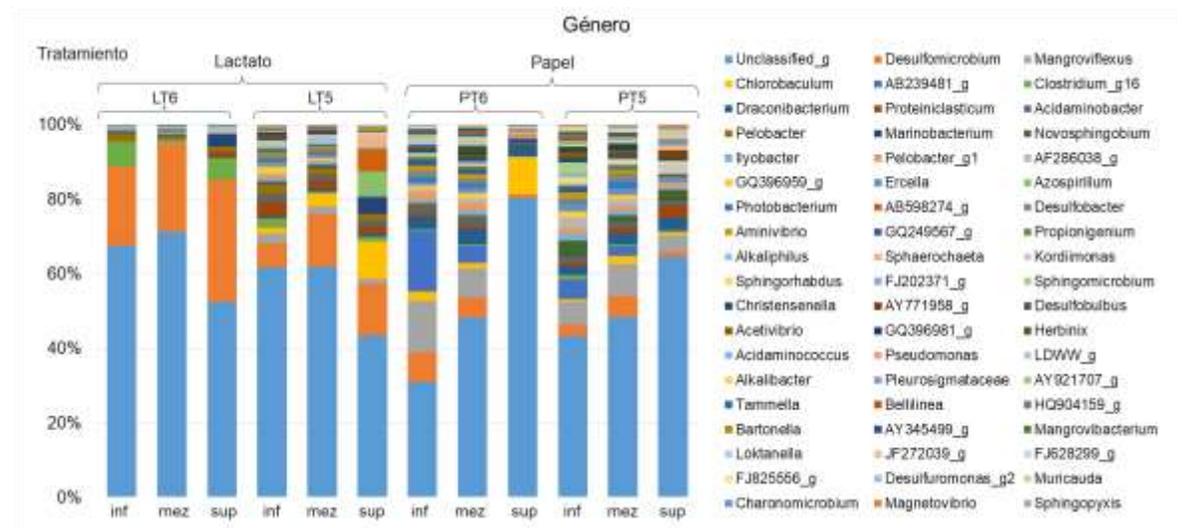
**Figura 8.13.** Curvas de rarefacción de secuencias de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos PT5.

## 8.10 Anexo 10. Composición de la comunidad microbiana en las columnas de Winogradsky.

Composición de la comunidad microbiana en la columna de sedimento correspondiente a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 a nivel de familia (Fig. 8.14) y género (Fig. 8.15).



**Figura 8.14.** Composición de la comunidad bacteriana a nivel de familia en las columnas de Winogradsky correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

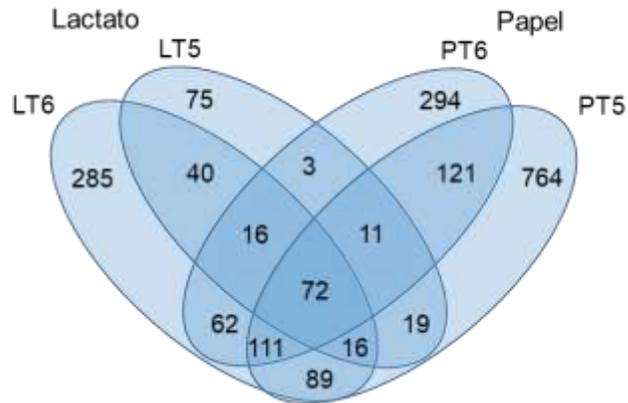


**Figura 8.15.** Composición de la comunidad bacteriana a nivel de género en las columnas de Winogradsky correspondientes a la zona inferior, superior y mezcla de los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5.

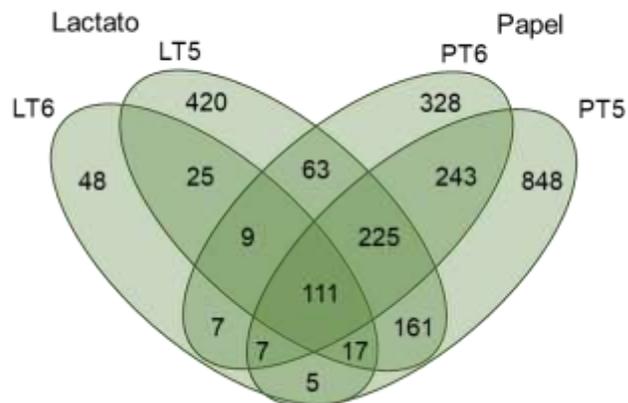
### 8.11 Anexo 11. Diagramas de Venn.

Diagramas de Venn de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) presentes en la zona superior e inferior con los distintos tratamientos (Fig. 8.16).

A) Zona superior



B) Zona inferior



**Figura 8.16.** Diagramas de Venn con los OTUs presentes en: A) zona superior y B) zona superior en los tratamientos LT6, LT5, PT6 y PT5 de las columnas de Winogradsky.

## 8.12 Anexo 12. Parámetros fisicoquímicos de la cinética microbiana.

Algunos parámetros fisicoquímicos como la temperatura (Fig. 8.17), los sólidos totales disueltos y la conductividad eléctrica (Fig. 8.18) mostraron pocas variaciones a lo largo de la cinética.

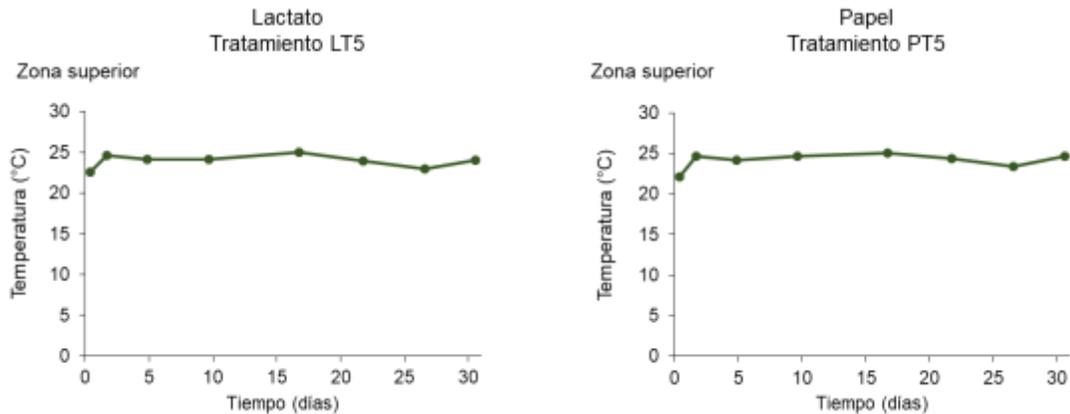


Figura 8.17. Valores de temperatura en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).

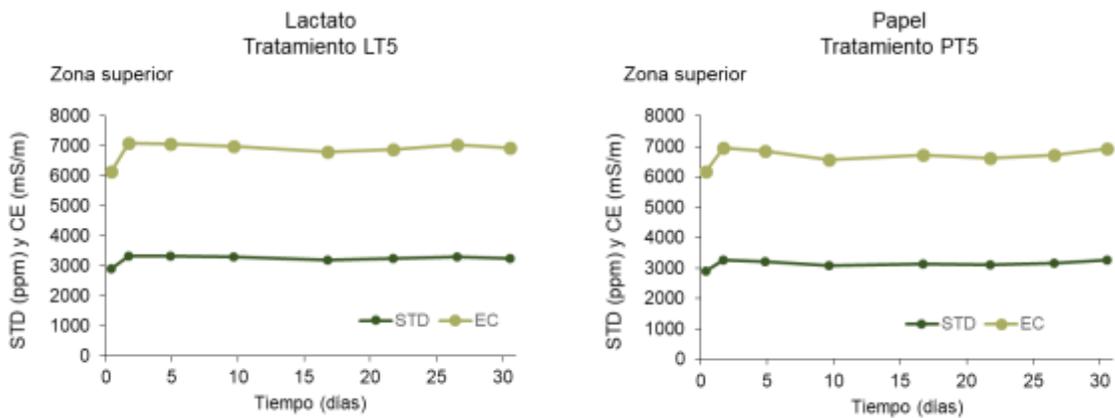


Figura 8.18. Valores de sólidos totales disueltos (STD) y de conductividad eléctrica (EC) en la zona superior de la columna con lactato (LT5) y papel (PT5).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00011

Matrícula: 2161801656

Uso de una columna de Winogradsky para la generación de potencial eléctrico a través de comunidades microbianas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 4 del mes de noviembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HUGO JOAQUIN AVILA PAREDES  
DR. MIGUEL ANGEL DEL RIO PORTILLA  
DR. VICTOR SANCHEZ VAZQUEZ  
DRA. MARIA GUADALUPE SALINAS JUAREZ  
DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ



CARLOS LEOPOLDO FERNANDEZ RENDON  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE)  
DE: CARLOS LEOPOLDO FERNANDEZ RENDON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Roman Linares Romero  
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. HUGO JOAQUIN AVILA PAREDES

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL DEL RIO PORTILLA

VOCAL

DR. VICTOR SANCHEZ VAZQUEZ

VOCAL

DRA. MARIA GUADALUPE SALINAS JUAREZ

SECRETARIA

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ