

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MEDIADOR EN LA  
PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA  
MEDIANTE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA  
LABORATORIO

LEONARDO COLMENARES VALERO  
DAVID FERNANDO WITTINGHAN PUENTES

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2018

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MEDIADOR EN LA  
PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA  
MEDIANTE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA  
LABORATORIO

LEONARDO COLMENARES VALERO  
DAVID FERNANDO WITTINGHAN PUENTES

Proyecto de investigación para optar el título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director  
ADRIANA PAEZ  
Microbióloga

Codirector  
ANDREA LACHE MUÑOZ  
Ingeniera Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2018

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Bogotá D.C

## DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

**Dr. Jaime Posada Díaz**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos humanos

**Dr. Luis Jaime Posada García-Peña**

Vicerrector Académico y de Posgrados

**Dra. Ana Josefa Herrera Vargas**

Secretario General

**Dr. Juan Carlos Posada García-Peña**

Decano General Facultad de Ingenierías

**Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi**

Director de Investigaciones

**Ing. Armando Fernández**

Director del Departamento de Ingeniería Química

**Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y los docentes no son responsables por las ideas y conceptos emitidos en el presente documento. Estos corresponden únicamente al autor.

## DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por darme la oportunidad de alcanzar este logro tan importante en mi vida, mi primer objetivo cumplido, convertirme en profesional.

A mi mamá por su constante apoyo, su amor incondicional y su entrega incansable, y a mi papá, quien desde el cielo guía mis pasos, por ser un ejemplo de fortaleza única, un gran consejero y un hombre intachable que me sigue inspirando a siempre dejar lo mejor de mí en cada paso que dé. Esos valores que me han inculcado desde que tengo uso de razón son los que actualmente me definen como persona y cada sueño cumplido será dedicado siempre a ustedes.

A mis amigos y aquellas personas han pasado por mi vida a lo largo de estos cinco años, por hacer de la universidad no solo un lugar dedicado para adquirir conocimientos y una formación profesional, sino para formar lazos de amistad y compartir grandes momentos hicieron de esta experiencia mucho más enriquecedora. A David por su compromiso con este trabajo, su apoyo y su amistad las cuales hicieron de este trabajo una anécdota más que recordar.

Por último, a mis demás familiares, amigos de la infancia y docentes que con sus aportes, consejos y enseñanzas me han acompañado en este recorrido para poder alcanzar finalmente este objetivo, aquel en el que puedo decir finalmente soy ingeniero químico.

**Leonardo Colmenares Valero**

## DEDICATORIA

En primera instancia y como aspecto más importante agradezco a Dios, por guiar mi camino universitario, permitirme alcanzar tan anhelado sueño, por darme la sabiduría y la paciencia para llegar hasta aquí, y fortalecerme tanto a nivel personal como profesional.

A mis padres, Fernando y Maribel por su confianza, apoyo incondicional, y amor que me han brindado, por ser la base y el motor de mi vida, gracias por hacerme quien soy, por todos los sacrificios hechos en pro de mi bienestar. A mis hermanos Cristian y Jerónimo, por sacarme una sonrisa cuando más la necesité, por la confianza incondicional y por nunca dejar de creer en mis capacidades. A Juliana, por ser mi compañera de vida, por nunca dejarme desfallecer, por hacerme recobrar la fuerza cuando me sentía más débil, por ser el bastón de mi confianza y determinación, por tanta felicidad, infinitas gracias.

Por último, y no menos importante quiero dedicar ese triunfo a mi amigo, compañero y futuro colega Leonardo, por hacer de esta experiencia algo más que un logro académico, por su aporte, compromiso y dedicación a tan ardua tarea.

**David Fernando Wittinghan**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a Dios por darnos la oportunidad de culminar esta etapa académica llena de grandes experiencias y aprendizajes. A nuestros padres por su apoyo y sacrificio a lo largo de estos años.

Agradecemos a la Microbióloga Adriana Páez por su interés y apoyo constante en la ejecución y desarrollo de este proyecto. A la Ingeniera Andrea Lache por su acompañamiento y asesoría en la elaboración de este documento.

Agradecemos a nuestros amigos y a cada una de las personas que a lo largo de estos 5 años hicieron de nuestra etapa de pregrado una gran experiencia.



## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	25
1. GENERALIDADES TEÓRICAS	26
1.1 CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS (CCM)	26
1.1.1 Indicadores de desempeño de una CCM.	28
1.1.2 Microorganismos electrogénicos	30
1.1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	30
1.1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.1.3 Mediador.	32
1.1.4 Sustrato.	34
1.1.5 Fases del crecimiento microbiano	34
1.1.5.1 Fase de latencia.	35
1.1.5.2 Fase exponencial	35
1.1.5.3 Fase de muerte	37
1.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE ENERGÍA EN MICROORGANISMOS	37
1.2.1 Fermentación.	37
1.2.1.1 Glucólisis	37
1.2.1.2 Respiración.	38
1.2.1.3 Fosforilación oxidativa.	38
1.2.2 Mecanismos de transferencia de electrones	39
1.2.3 Reacciones de óxido reducción.	40
1.2.3.1 Donadores y aceptores de electrones	40
1.2.3.2 Transportadores de electrones.	41
1.2.4 Sistemas transportadores de electrones.	42
1.3 BIOMASA	43
1.3.1 Clasificación de la biomasa (Según humedad)	44
1.3.1.1 Biomasa seca.	44
1.3.1.1 Biomasa Húmeda.	44
1.3.2 Procesos termoquímicos.	44
1.3.3 Procesos bioquímicos.	44
1.4 AGUAS RESIDUALES	45
1.4.1 Clasificación aguas residuales.	45
1.4.1.1 Agua residual doméstica	45
1.4.1.2 Agua residual industrial.	46
1.4.1.3 Agua residual sintética.	46
1.4.2. Tratamiento de aguas residuales.	47
1.4.2.1 Tratamiento preliminar o pretratamiento.	47
1.4.2.2 Tratamiento primario	47
1.4.2.3 Tratamiento secundario.	47

1.4.2.4 Tratamiento terciario	48
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>49</b>
2.1 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVOREZCAN LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA LABORATORIO	49
2.1.1 Selección del mediador.	49
2.1.2 Temperatura.	49
2.1.3 pH.	49
2.1.4 Agua residual sintética.	50
2.1.5 Determinación de la configuración de la CCM.	50
2.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MEDIADOR EN LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN LA CCM	50
2.2.1 Diseño de experimentos.	50
2.2.2 Ejecución de pruebas.	50
2.2.3 Parámetros para la evaluación de la energía eléctrica producida.	51
2.2.4 Estimación del efecto del mediador sobre las cepas.	51
2.3 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS UTILIZADAS EN FUNCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA	51
2.3.1 Cinética de crecimiento.	51
2.3.1.1 Parámetros para la evaluación de crecimiento microbiano.	52
2.3.2 Determinación de parámetros de calidad del agua	52
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>54</b>
3.1 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVOREZCAN LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA LABORATORIO	54
3.1.1 Selección del mediador.	54
3.1.2 Selección de concentraciones para cada mediador.	55
3.1.3 Temperatura.	56
3.1.4 pH.	57
3.1.5 Selección del agua residual sintética a utilizar	58
3.1.6 Determinación de la configuración de la CCM.	61
3.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MEDIADOR EN LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN LA CCM	62
3.2.1 Diseño de experimentos.	62
3.2.2 Ejecución de pruebas.	64
3.2.2.1 Preparación del inóculo.	64
3.2.2.2 Pruebas experimentales <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	65
3.2.2.3 Estimación de parámetros para la evaluación de la energía eléctrica producida y muestra de cálculo.	66
3.2.2.4 Mejores resultados durante las 10 pruebas en la CCM.	68

3.2.2.5 Réplicas de las pruebas con los mejores resultados en términos de producción de electricidad.	70
3.2.2.6 Análisis ANOVA de un solo factor.	77
3.3 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS UTILIZADAS EN FUNCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA	79
3.3.1 Cinética de crecimiento	79
3.3.1.1 Construcción de curvas de crecimiento microbiano.	80
3.3.1.2 Parámetros para la evaluación del crecimiento microbiano.	85
3.3.2 Determinación parámetros de calidad del agua.	88
4. CONCLUSIONES	92
5. RECOMENDACIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXOS	101

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición típica del agua residual doméstica	46
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones seleccionadas de mediador	56
<b>Tabla 3.</b> Medios utilizados como agua residual sintética para cada bacteria en CCM	59
<b>Tabla 4.</b> Composición caldo tripticasa de soya	60
<b>Tabla 5.</b> Datos obtenidos para las pruebas realizadas con <i>Escherichia coli</i> y Azul de metileno	66
<b>Tabla 6.</b> Datos obtenidos para las pruebas realizadas con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Azul de metileno	66
<b>Tabla 7.</b> Parámetros para la evaluación de energía durante las 10 pruebas	67
<b>Tabla 8.</b> Valores promedio entre las pruebas y sus réplicas.	69
<b>Tabla 9.</b> Resultados experimentales de las mejores pruebas para cada cepa	71
<b>Tabla 10.</b> Valores de voltaje promedio y densidad de potencia reportados en la literatura	71
<b>Tabla 11.</b> Resultados del voltaje obtenido en las réplicas de las mejores pruebas	78
<b>Tabla 12.</b> Tabla análisis de varianza ANOVA	78
<b>Tabla 13.</b> Recuento en placa <i>Escherichia coli</i>	81
<b>Tabla 14.</b> Recuento en placa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
<b>Tabla 15.</b> Velocidad de crecimiento máxima y tiempo de duplicación para las dos cepas utilizadas utilizando diferentes sustratos	87
<b>Tabla 16.</b> Resultados pruebas Demanda Química de Oxígeno	89
<b>Tabla 17.</b> Reducción DQO para operación de cada bacteria en CCM	89
<b>Tabla 18.</b> Investigaciones realizadas que evidencian disminución de DQO en CCM	90

## LISTA DE CUADROS

pág.

**Cuadro 1.** Mediadores más empleados con la *Escherichia coli* y mediadores producidos por la *Pseudomonas aeruginosa* en una celda de combustible microbiana 54

## LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
<b>Gráfico 1.</b> Comportamiento del voltaje e intensidad de corriente a través del tiempo para <i>Escherichia coli</i>	15
<b>Gráfico 2.</b> Comportamiento del voltaje e intensidad de corriente a través del tiempo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
<b>Gráfico 3.</b> Comportamiento del voltaje y pH a través del tiempo para <i>Escherichia coli</i>	75
<b>Gráfico 4.</b> Comportamiento del voltaje y pH a través del tiempo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
<b>Gráfico 5.</b> Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	81
<b>Gráfico 6.</b> Curva de crecimiento <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
<b>Gráfico 7.</b> Curva de crecimiento y voltaje producido durante las 30 horas para <i>Escherichia coli</i>	84
<b>Gráfico 8.</b> Curva de crecimiento y voltaje producido durante las 30 horas para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema de una celda de combustible microbiana y su principio de funcionamiento.	27
<b>Figura 2.</b> Mediadores y sustratos utilizados para distintos microorganismos en celdas de combustible microbianas.	32
<b>Figura 3.</b> Clasificación de los mecanismos de transferencia de electrones desde la bacteria hacia el electrodo	33
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento microbiana	35
<b>Figura 5.</b> División exponencial celular	36
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de transferencia de electrones desde el microorganismo hacia el ánodo a través de mediadores, de forma directa, y a través de nanotubos.	40
<b>Figura 7.</b> Generación de fuerza protón motriz y transferencia de electrones en una celda de combustible microbiana para la bacteria <i>Geobacter sulfurreducens</i>	43
<b>Figura 8.</b> Diseño de experimentos	63
<b>Figura 9.</b> Preparación de patrones de McFarland y su equivalencia en número de bacterias	64
<b>Figura 10.</b> Reacción de oxidación-reducción para el azul de metileno	70
<b>Figura 11.</b> Estructura antigénica <i>Escherichia coli</i>	73
<b>Figura 12.</b> Fermentación anaeróbica en <i>Escherichia coli</i>	76
<b>Figura 13.</b> Método de recuento en placa	80

## LISTA DE IMÁGENES

	pág.
<b>Imagen 1.</b> Celda de combustible microbiana empleada en la experimentación	61
<b>Imagen 2.</b> Montaje de la celda de combustible microbiana al momento de iniciar las pruebas.	65
<b>Imagen 3.</b> Zonas de aceptación y rechazo de la hipótesis planteada	79
<b>Imagen 4.</b> Siembra en superficie hora 0, hora 9, hora 15, hora 24 y hora 30 para la <i>Escherichia coli</i> en las diluciones seleccionadas	80
<b>Imagen 5.</b> Siembra en superficie hora 0, hora 9, hora 15, hora 24 y hora 30 para la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en las diluciones seleccionadas	82



## LISTA DE ECUACIONES

	pág.
<b>Ecuación 1.</b> Intensidad eléctrica	28
<b>Ecuación 2.</b> Potencia	28
<b>Ecuación 3.</b> Densidad de corriente	28
<b>Ecuación 4.</b> Densidad de potencia	29
<b>Ecuación 5.</b> Potencia volumétrica	29
<b>Ecuación 6.</b> Cálculo para la velocidad de crecimiento a través de la pendiente de la recta de log crecimiento vs tiempo	52
<b>Ecuación 7.</b> Tiempo de duplicación o generación	52

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo A.</b> Investigaciones hechas con <i>Escherichia Coli</i> y azul de metileno entre 2000-2017, tomado de la base de datos Scopus	102
<b>Anexo B.</b> Documentos por área para <i>Escherichia coli</i> y azul de metileno, tomado de la base de datos Scopus	103
<b>Anexo C.</b> Investigaciones hechas con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y azul de metileno entre 2000-2017, tomado de la base de datos Scopus	104
<b>Anexo D.</b> Documentos por área para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y azul de metileno, tomado de la base de datos Scopus	105
<b>Anexo E.</b> Costo del medio sintético utilizado como agua residual	106
<b>Anexo F.</b> Diagrama de montaje de CCM y preparación del inóculo	107
<b>Anexo G.</b> Sobre de anaerobiosis utilizado durante la experimentación	108
<b>Anexo H.</b> Resultados pruebas experimentales <i>Escherichia coli</i> y azul de metileno	109
<b>Anexo I.</b> Resultados pruebas experimentales <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y azul de metileno	112
<b>Anexo J.</b> Procedimiento diluciones seriadas y recuento en placa	115
<b>Anexo K.</b> Resultados análisis de DQO obtenidos	116

## LISTA DE SIMBOLOS

ATP	Adenosin Trifosfato
CCM	Celdas de combustible microbianas
DQO	Demanda química de oxígeno
FAD	Flavin adenin dinucleótido
g	Gramos
M	Molaridad
MB	Azul de metileno
mL	Mililitros
mV	Milivoltios
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
$\mu$ A	Microamperios
UFC	Unidades formadoras de colonia

## GLOSARIO

**AGUA RESIDUAL SINTÉTICA:** agua elaborada a nivel de laboratorio que posee características de un agua residual industrial y cumple con los requerimientos nutricionales de los microorganismos.

**ANAEROBIOSIS:** capacidad de organismos de realizar su metabolismo en ausencia de oxígeno. Si es anaerobiosis estricta significa que el oxígeno impide el proceso.

**ATP:** comúnmente conocida como la moneda energética del metabolismo. También llamado Adenosin trifosfato.

**ÁNODO:** electrodo donde se lleva a cabo la oxidación, es positivo si absorbe energía y negativo cuando la suministra.

**BACTERIA:** microorganismo unicelular procariota, es decir está constituido por una sola célula carente de núcleo.

**BACTERIAS ELECTROGÉNICAS:** microorganismos capaces de transferir los electrones al ánodo en ausencia de mediadores artificiales.

**CÁTODO:** electrodo donde se lleva a cabo la reducción, en un dispositivo que consume el cátodo es negativo, y un dispositivo que proporciona energía al cátodo es positivo.

**CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS:** celda bioelectroquímica capaz de producir energía eléctrica a partir de la degradación de materia orgánica por parte de microorganismos. Formada normalmente por una cámara anódica y una catódica, separadas por un puente o membrana de intercambio protónico. Una vez oxidada la materia orgánica, los electrones libres fluyen desde el ánodo hacia el cátodo a través de una resistencia, mientras que los protones lo hacen a través de la membrana.

**CORRIENTE ELÉCTRICA:** flujo de electrones por unidad de tiempo que recorre un material. También llamada Intensidad eléctrica.

**DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO):** parámetro que indica la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente en una muestra de agua.

**FOSFORILACIÓN OXIDATIVA:** proceso de producción de ATP a través de la fuerza motriz de protones generada por el transporte de electrones.

**FUERZA MOTRIZ DE PROTONES:** momento energético de una membrana debido a la liberación de protones a través de la acción de una cadena transportadora de electrones.

**MEDIADOR:** compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde el microorganismo hacia el electrodo, re oxidándose y quedando disponible nuevamente para ser reducido.

**MEDIO DE CULTIVO:** mezcla de nutrientes (en estado sólido o acuoso) en concentraciones adecuadas que es utilizada por los microorganismos para crecer.

**REACCIÓN DE ÓXIDO REDUCCIÓN:** reacción que implica la transferencia de electrones por medio de la oxidación de un compuesto.

**RESPIRACIÓN ANAERÓBICA:** proceso en el que se hace uso de un aceptor terminal de electrones diferente del  $O_2$  en una oxidación con transporte de electrones y que posteriormente crea una fuerza protón motriz.

## RESUMEN

El agotamiento de las fuentes tradicionales de energía ha motivado a las naciones del mundo a encontrar una respuesta a esta inquietud en las energías alternativas y Colombia no es una excepción a esta tendencia.<sup>1</sup> Dentro de este escenario, las celdas de combustible microbianas son una de las alternativas que se están estudiando actualmente, puesto que representan una tecnología que estaría en capacidad de producir energía eléctrica y a su vez reducir la carga orgánica presente en el sustrato empleado, el cual podría ser agua residual.

Este proyecto de investigación se enfoca en evaluar el efecto de la concentración de mediador en la producción de energía eléctrica en una celda de combustible microbiana; esta sustancia, facilita el metabolismo de las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ayudando a transferir los electrones desde el interior del microorganismo hacia el circuito de la CCM, favoreciendo la eventual producción de electricidad. Dicha celda operó a una temperatura promedio de 37°C, un pH inicial de 7, empleando agua residual sintética y eligiendo el azul de metileno como mediador utilizando las concentraciones de 0,0001 M y 0,0003 M durante la experimentación.

De acuerdo a la experimentación realizada se observó que un aumento en la concentración de mediador no garantiza un incremento en la producción de energía eléctrica debido a que puede favorecer a una cepa más que a otra. Para la *Escherichia coli* la concentración de mediador que favoreció la producción de energía eléctrica fue 0,0003 M, mientras que para la *Pseudomonas aeruginosa* fue de 0,0001 M.

Ante los mejores resultados de las pruebas se evaluó la relación existente entre el crecimiento de las cepas en función del voltaje producido y se obtuvo una reducción de carga orgánica en términos de la demanda química de oxígeno en comparación del agua residual sintética en ausencia de mediador. Los resultados del proyecto permiten establecer un criterio de operación importante en la producción de energía eléctrica en celdas de combustible microbianas a escala laboratorio empleando *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; con el propósito de posteriormente realizar proyectos en el grupo de investigación en energías alternativas utilizando agua residual de un sector industrial determinado.

**Palabras clave:** Celda de combustible microbiana, mediador, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, DQO, Azul de metileno, crecimiento microbiano, transferencia de electrones.

---

<sup>1</sup> Centro Virtual de Noticias Ministerio de Educación Nacional. Colombia una potencia en energías alternativas. [Electronic(1)]. Colombia. [Consultado el 29 de noviembre2017]. Disponible en: <http://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/article-117028.html>

## INTRODUCCIÓN

En el escenario actual de globalización donde el sector industrial está en constante crecimiento, las normativas y regulaciones ambientales son cada vez más rigurosas para exigir el correcto tratamiento de los efluentes y la posterior disposición<sup>2</sup>. Según el Banco de desarrollo de América latina, actualmente más del 70% de las aguas residuales que se generan en la región son devueltas al medio natural (ríos, mares o tierras) sin ningún tratamiento.<sup>3</sup>

Considerando lo anterior las pilas de combustible microbianas pueden llegar a contribuir a la solución de la problemática, puesto que son celdas que cumplen con la función de transformar energía química generada por microorganismos en electricidad, utilizando el agua residual como fuente nutricional para el funcionamiento adecuado de la misma. Con esta tecnología se pueden obtener dos beneficios, una fase del tratamiento de aguas con alta carga orgánica, y la obtención de un pequeño voltaje durante el proceso.<sup>4</sup>

Para el correcto funcionamiento de estas celdas se requieren ciertas condiciones como lo son tipos de materiales para el montaje, un diseño adecuado de las cámaras, microorganismos que estén bajo las condiciones adecuadas para su crecimiento (temperatura, pH, requerimientos nutricionales), además de ser capaces de donar electrones.<sup>5</sup> Una vez aseguradas estas condiciones, a veces se facilita la obtención de electricidad empleando sustancias denominadas mediadores.

La presencia y concentración de mediador son factores asociados a la tasa de producción de energía eléctrica, dado que este facilita la transferencia de electrones desde el microorganismo hacia el electrodo, es por eso que encontrar las concentraciones óptimas de mediador para cada cepa representa uno de los parámetros clave en el desarrollo y optimización tanto de producción de energía, como de mejoramiento del agua utilizada en términos de reducción de DQO.

---

<sup>2</sup> MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Minambiente presenta nueva Norma de Vertimientos que permitirá mejorar la calidad agua del país [ En línea ] Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article?id=1700:minambiente-presenta-nueva-norma-de-vertimientos-que-permitira-mejorar-la-calidad-agua-del-pais>, 31 de agosto del 2017

<sup>3</sup> BANCO DE DESARROLLO DE AMERICA LATINA. ¿Por qué es tan importante el tratamiento de aguas residuales? [En línea] Disponible en: <https://www.caf.com/es/conocimiento/blog/blog/2016/por-que-es-tan-importante-el-tratamiento-de-aguas-residuales>, 13 de marzo del 2017

<sup>4</sup> LOPEZ Israel, Implementación de una estrategia de control para la puesta en marcha de una celda de combustible microbiana, México D.F.2013, Maestría en ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>5</sup> LOGAN, Bruce E., et al. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. En: Environmental Science and Technology. Julio, 2006. vol. 40, no. 17, p. 5181-5192

En el presente proyecto se estudia el efecto de un mediador en la producción de voltaje y reducción de DQO en un agua residual sintética empleando las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esto con el fin de obtener un rango de concentraciones que permita la mayor producción de energía posible junto con la disminución de contaminantes en el agua, medidos a través del parámetro de DQO.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del mediador sobre las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en la producción de energía eléctrica mediante el uso de celdas de combustible microbianas a escala laboratorio.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones del funcionamiento de la pila que favorezcan la producción de energía mediante la variación de la concentración del mediador y en comparación con resultados previos.
- Comprobar la influencia del mediador en la producción de energía eléctrica en las celdas de combustible microbianas.
- Evaluar la cinética de crecimiento en función de la producción de energía, a las cepas seleccionadas.

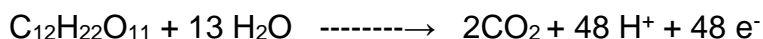
## 1. GENERALIDADES TEÓRICAS

### 1.1 CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS (CCM)

Las celdas de combustible microbianas (CCM) son dispositivos que utilizan bacterias para oxidar la materia orgánica a través de sus procesos metabólicos, aprovechándola para generar energía.<sup>6</sup>

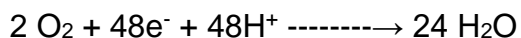
Las bacterias crecen catalizando reacciones químicas, aprovechando y almacenando energía en forma de adenosin trifosfato (ATP). En algunas bacterias, los sustratos reducidos son oxidados y los electrones son transferidos a las enzimas respiratorias por NADH, la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Estos electrones fluyen por una cadena respiratoria -una serie de enzimas que funcionan para mover protones a través de una membrana interna- creando un gradiente de protones.<sup>7</sup>

Las celdas de combustible microbianas constan habitualmente de dos secciones; la cámara anódica donde es inoculado el sustrato, el microorganismo y el mediador (en caso de ser necesario), debe encontrarse en condiciones de anaerobiosis debido a que el oxígeno inhibe al microorganismo y en consecuencia la generación de energía. La siguiente reacción esquematiza el transporte de electrones en el ánodo:<sup>8</sup>



Los electrones producidos por las bacterias se transfieren al ánodo y fluyen al cátodo a través de un metal conductor que conecta las cámaras, los protones migran a través de la membrana de intercambio catiónico.<sup>9</sup>

Por su parte, en la cámara catódica no es estrictamente necesario limitar la presencia de oxígeno, la reacción que ilustra el transporte de electrones en el cátodo es:<sup>10</sup>



---

<sup>6</sup> HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J., et al. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. En: Fuel Processing Technology. October 2015. vol. 138, no. Supplement C, p. 284-297

<sup>7</sup> LOGAN, Bruce E. y REGAN, John M. Microbial Fuel Cells- Challenges and Applications. En: Environmental Science & Technology. Septiembre, 2016. vol. 40, no. 17, p. 5172-5180

<sup>8</sup> SHARMA Suresh, BULCHANDANI B.D., Energy generation by microorganisms using carbohydrate substrates in a microbial fuel cell, International Journal of Business and Engineering Research, 2014

<sup>9</sup> LOGAN, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, Op. cit. P. 5186

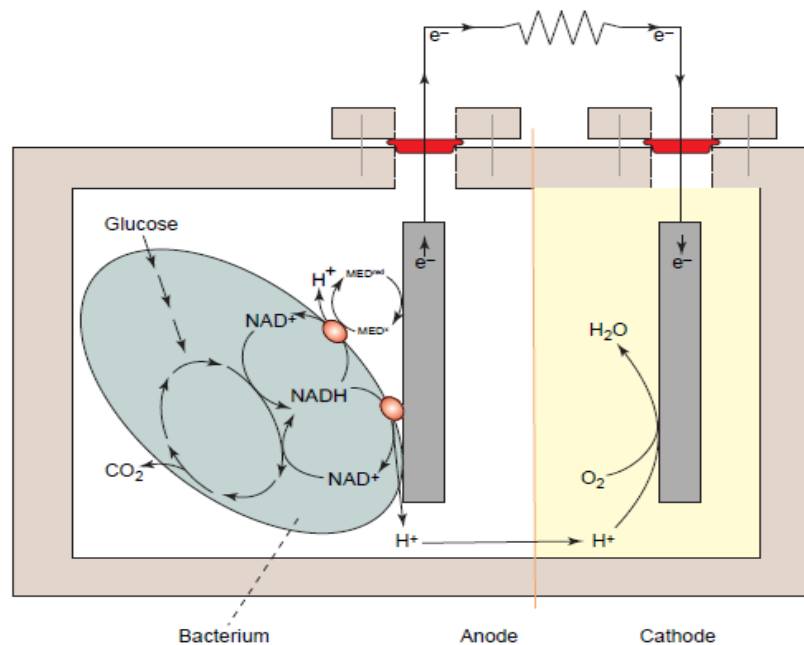
<sup>10</sup> LOGAN, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, Op. cit. P. 5186

Adicionalmente, las dos cámaras deben estar comunicadas por una membrana que permita el intercambio de protones, este puente esta habitualmente construido en materiales como Nafion, Ultrex o incluso agar-agar.<sup>11</sup>

Los electrones que ahora se encuentran en el cátodo se combinan con el oxígeno presente en la cámara catódica, y con los protones que llegan hasta este compartimiento a través de la membrana selectiva de protones, generando una corriente eléctrica.<sup>12</sup>

Un esquema del funcionamiento de una celda de combustible microbiana se muestra en la figura 1, donde el sustrato es metabolizado por las bacterias y los electrones resultantes son transferidos al ánodo. Este proceso ocurre a través de la membrana o de un mediador redox.

**Figura 1.** Esquema de una celda de combustible microbiana y su principio de funcionamiento.



Fuente: RABAEY Korneel, VERSTRAETE Willy, Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. En: Trends in Biotechnology. Vol.23. No. 6. Junio, 2005 p. 292-298

<sup>11</sup> LOGAN, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, Op. cit. P. 5187

<sup>12</sup> ALZATE, Liliana, et al. <br />Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. En: Interciencia. Julio, 2008. vol. 33, no. 7, p. 503-509

**1.1.1 Indicadores de desempeño de una CCM.** El rendimiento de una celda de combustible microbiana se especifica generalmente a partir de las mediciones de voltaje que se realizan en la resistencia externa, conectada entre el ánodo y el cátodo, y los respectivos cálculos que se derivan de ellas. Entre estos parámetros se encuentran la intensidad, densidad de corriente ( $j$ ), densidad de potencia, la potencia ( $P$ ) y la potencia volumétrica.

- Corriente eléctrica: Es el flujo de electrones por unidad de tiempo que recorre un conductor.

**Ecuación 1.** Intensidad eléctrica

$$I = \frac{V}{R_{Ext}}$$

Dónde:

I es la intensidad en Amperios (A)

V es el voltaje en voltios (v)

R. ext. Es la resistencia externa en ohm ( $\Omega$ )

- Potencia: Indica la cantidad de energía entregada o generada por la CCM en un tiempo específico.

**Ecuación 2.** Potencia

$$P = V * I$$

Donde la Potencia (P) está en watts (W)

- Densidad de corriente: Cantidad de carga o corriente eléctrica que pasa a través del electrodo.

**Ecuación 3.** Densidad de corriente

$$j = \frac{I}{a}$$

$j$  = Densidad de corriente en Amperios/m<sup>2</sup> (A/m<sup>2</sup>)

$a$  = Área del electrodo en metros cuadrados (m<sup>2</sup>)

- Densidad de potencia: Cantidad de energía eléctrica generada por unidad de área del electrodo.

**Ecuación 4.** Densidad de potencia

$$DP = \frac{P}{A}$$

Donde DP es la densidad de potencia en watts/m<sup>2</sup> (W/m<sup>2</sup>)

- Potencia volumétrica: Expresa la producción de energía eléctrica respecto al volumen total de la celda de combustible microbiana.

**Ecuación 5.** Potencia volumétrica

$$P_v = \frac{P}{V}$$

Donde.

P<sub>v</sub> es la potencia volumétrica en watts/m<sup>3</sup> (W/m<sup>3</sup>)  
V es el volumen total de las celdas en m<sup>3</sup>.

Hasta el momento la producción de energía eléctrica en las CCM a escala laboratorio ha sido mucho menor que el desempeño ideal, debido a que son varios los factores que afectan directamente este fenómeno, entre ellos: la arquitectura, el tipo de membrana de intercambio protónico, el material de los electrodos, el sustrato y los microorganismos.<sup>13</sup> Otro indicador importante que se obtiene de esta clase de celdas está relacionado con el tratamiento de aguas, evaluando el rendimiento general en términos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO).<sup>14</sup>

La remoción de DQO es definida como la relación entre la DQO eliminada y la DQO influyente, midiendo la fracción de la conversión del combustible disponible usado; ya sea en corriente eléctrica, biomasa (a través del rendimiento de crecimiento) o mediante reacciones competitivas con aceptores de electrones alternativos (por ejemplo, oxígeno, nitrato y sulfato).<sup>15</sup>

---

<sup>13</sup> DU,Zhuwei; LI,Haoran y GU,Tingyue. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. En: Biotechnology Advances. Octubre 2007. vol. 25, no. 5, p. 464-482

<sup>14</sup> SCOTT,Keith y HAO YU,Eileen. Microbial Electrochemical and Fuel Cells Fundamentals and Applications. Boston: Woodhead Publishing, 2016. p. 410

<sup>15</sup> Ibíd.

**1.1.2 Microorganismos electrogénicos.** El comportamiento de los microorganismos en las CCM es variable y se puede ver evidenciado especialmente en el uso de comunidades microbianas mixtas presentes en la mayoría de corrientes de desperdicios. Diversos factores influyen en el desempeño de la celda al momento de realizar el tratamiento de la carga orgánica presente (DQO Y DBO) tales como el tipo de microorganismos a emplear y cómo van poblando el ánodo.

Es así como el uso especies mixtas puede resultar en una eliminación más rápida del sustrato, es decir de la carga orgánica presente en el medio, pero sin generación de energía en el proceso.<sup>16</sup>

Algunos microorganismos son capaces de transferir electrones procedentes de alguna ruta metabólica (usualmente fosforilación oxidativa) desde el cátodo hasta el ánodo, en presencia o ausencia de mediadores de óxido reducción, estos son considerados microorganismos electrogénicos. En particular, las bacterias electrogénicas se dividen en dos grandes grupos: las primeras son las bacterias que producen sus propios mediadores de óxido reducción, que son secretadas por los microorganismos para mejorar la transferencia de electrones entre sí mismo y el electrodo, un ejemplo de estas son las *Pseudomonas aeruginosa* que producen sustancias como piocianina<sup>17</sup>.

Por su parte, algunas bacterias como la *Escherichia coli* no son capaces de producir una sustancia química que actué como mediador e interactúe con la superficie del cátodo, por lo que requieren de esta sustancia de manera externa.

**1.1.2.1 Escherichia coli.** Es una bacteria unicelular, con morfología de bacilo que reacciona negativamente a la coloración de Gram (gram negativa), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos, estructuras largas y delgadas que rodean su cuerpo provocando que se mueva a favor de las manecillas del reloj, no forma esporas, es capaz de fermentar glucosa y lactosa, es una bacteria electrogénica utilizada comúnmente en las CCM. Crece en pH cercanos a la neutralidad y es catalogado como microorganismo mesófilo debido a que su temperatura de crecimiento está entre 8°C y 48°C, siendo 38°C la óptima.<sup>18</sup> La pared celular posee un espacio periplásmico, una capa gelatinosa entre las membranas interna y externa<sup>19</sup>.

---

<sup>16</sup> Ibíd.

<sup>17</sup> ESTEVE-NÚÑEZ, Abraham. Bacterias productoras de electricidad. [Print(0)]. Junio 2008. [Consultado el Marzo 20,2017]. Disponible en: <https://www.semimicrobiologia.org/pdf/actualidad/45/Geobacter.pdf>

<sup>18</sup> MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. Brock Biología De Los Microorganismos. 10 ed. España: Prentice Hall, 1998. p. 1011

<sup>19</sup> ROMERO, Raul. Microbiología Y Parasitología Humana. 3a. ed. Panamericana, 2007. p. 1000

La *Escherichia coli* es una de las bacterias más utilizadas como organismo modelo en celdas de combustibles microbianas con fines de investigación debido a su capacidad de sobrevivir bajo una amplia gama de condiciones ambientales gracias a la adopción de diferentes modos metabólicos, su fácil crecimiento y adaptabilidad a diversos sustratos, su afinidad por distintos mediadores y alta disponibilidad.<sup>20</sup> Adicionalmente, la membrana celular externa contiene proteínas que no son conductoras, el único contacto con el exterior son unas pequeñas moléculas llamadas porinas, que permiten el intercambio de electrones. Cuando una porina está en contacto con el electrodo, ocurre una transferencia de electrones casi directa.<sup>21</sup>

**1.1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*.** Es un microorganismo con morfología de bacilo gram negativa, considerado un microorganismo aerobio, muy versátil metabólicamente pues puede utilizar cerca de 80 sustancias como fuente de carbono. Es un microorganismo que crece en condiciones de neutralidad debido a que no crece en pH inferiores a 4,5; también se catalogan como microorganismos mesófilos debido a que su temperatura de crecimiento está comprendida entre 20°C – 42°C; siendo la temperatura óptima 37°C.<sup>22</sup>

Pueden segregar pigmentos como la piocianina, piourubina, oxicloraafina que actúan como intermediarios para la transferencia de electrones<sup>23</sup>, por lo que no requieren sustancias exógenas para mejorar dicha transferencia.

La *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias electroquímicamente activas más adaptables que cuentan con la ventaja de tener una capacidad de utilizar un amplio espectro de sustratos para la generación de electricidad en las CCM.<sup>24</sup> Además presentan una variabilidad enzimática alta y un metabolismo adaptable a diversas condiciones, favoreciendo el uso de las mismas en estudios con CCM en ausencia de mediador.<sup>25</sup>

---

<sup>20</sup> NANDY, Arpita; KUMAR, Vikash y KUNDU, Patit P. Effect of electric impulse for improved energy generation in mediatorless dual chamber microbial fuel cell through electroevolution of *Escherichia coli*. En: Biosensors and Bioelectronics. 15 May 2016. vol. 79, p. 796-801

<sup>21</sup> XI, Ming-yue y SUN, Yan-ping. Preliminary Study on *E. coli* Microbial Fuel Cell and On-electrode Taming of the Biocatalyst. En: The Chinese Journal of Process Engineering. Diciembre 2008. vol. 8, no. 6, p. 1179-1184

<sup>22</sup> RUIZ MARTÍNEZ, Lidia. "Pseudomonas Aeruginosa": Aportación Al Conocimiento De Su Estructura Y Al De Los Mecanismos Que Contribuyen a Su Resistencia a Los Antimicrobianos. Barcelona, España: Universidad de Barcelona, 2007. p. 1-180

<sup>23</sup> Ibid.

<sup>24</sup> RABAEY, Korneel. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. 2005

<sup>25</sup> PHAM, Hai, et al. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Grampositive bacterium to achieve extracellular electron transfer. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Octubre 2007. vol. 77, p. 1119-1129

**1.1.3 Mediador.** La cadena de transporte de electrones involucra la pared celular de un microorganismo, donde existen proteínas responsables de la generación de energía. En algunos microorganismos los grupos electro activos responsables de la actividad redox de las enzimas están profundamente enterrados dentro de sus grupos protésicos, lo que generalmente conduce a una mala comunicación eléctrica entre las células y la superficie del electrodo. En estos casos, las células pueden adherirse a la superficie del ánodo usando especies redox de bajo peso molecular, llamadas mediadores.<sup>26</sup>

Esta sustancia (ajena o producida en algunos casos por los microorganismos involucrados) facilita y promueve el transporte de electrones desde el interior de la bacteria hacia la superficie del cátodo, por lo que el potencial energético se incrementa en las celdas de combustible microbianas que utilizan mediadores. Cabe resaltar que estas sustancias son cuestionadas debido a su toxicidad y costo.

Los mediadores deben cumplir con ciertos requisitos tales como poseer una cinética rápida (deben oxidarse y reducirse rápidamente en el ánodo y en el interior del organismo); atravesar fácilmente la membrana celular; ser químicamente estables; no interferir con otras vías metabólicas (es decir que esta sustancia a las concentraciones de operación no resulte tóxica para el microorganismo); y ser solubles en la solución en la que está inmerso el electrodo.<sup>27</sup> En la figura 2, se presentan algunos microorganismos frente a los mediadores que se pueden utilizar

**Figura 2.** Mediadores y sustratos utilizados para distintos microorganismos en celdas de combustible microbianas.

Mediators	Substrate	Microorganism
Neutral Red, Thionine	Glucose	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
Fe (III) EDTA	Glucose	<i>Erwinia dissolven</i>
Methylene blue	Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HNQ, resazurin, Thionine	Glucose	<i>Gluconobacter oxydans</i>
Methylene blue, Neutral Red, Thionine	Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Neutral Red	Lactate, pyruvate, acetate	<i>Shewanella putrefaciens</i>
Neutral Red, 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone, Methylene blue	Glucose, acetate	<i>Escherichia coli</i>
Thioninee	Glucose, Sucrose	<i>Proteus vulgaris</i>
Methylene blue, Neutral Red	Hydrolyzed Lactose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Humic acid	Xylose	<i>Domestic waste water</i>
Anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)	Lactate	<i>Shewanella oneidensis</i>
Ferric chelate complex	Glucose	<i>Streptococcus lactis</i>

Fuente: NAJAFPOUR Ghasem, EUN Sang, Investigation of different mediators in microbial fuel cell with cyclic voltammeter. Pakistan Journal of Biotechnology. Vol 10. (2013) p. 37-51

<sup>26</sup> SCOTT Keith, op. cit.

<sup>27</sup> BUTTI, Sai Kishore, et al. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. January 2016. vol. 53, p. 462-476



Estas sustancias se pueden clasificar generalmente en dos grupos: Los mediadores exógenos, que son sustancias ajenas al microorganismo, es decir que no son sintetizados por el mismo y los mediadores endógenos los cuales son sustancias generadas por algunas bacterias facilitando el transporte de electrones hacia un electrodo. En el caso de los mediadores endógenos, la *Pseudomonas aeruginosa* secreta sustancias clasificación como lo son la piocianina y pioveridina.<sup>28</sup> En la figura 3 se presenta dicha clasificación.

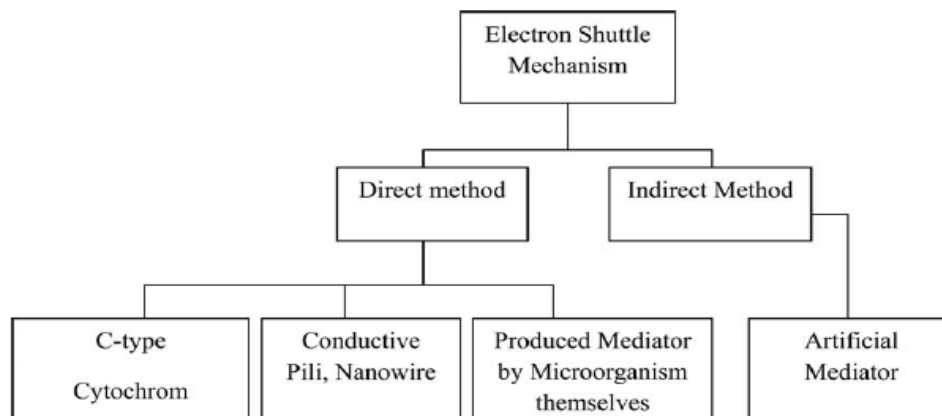
Los mediadores pueden acoplarse a los microorganismos de tres maneras:

(I) A través del desplazamiento del mediador de difusión entre la suspensión microbiana y la superficie del ánodo.<sup>29</sup>

(II) Desplazamiento del mediador de difusión entre el ánodo y las células microbianas unidas covalentemente al electrodo. Las células microbianas pueden estar unidas covalentemente a la superficie del electrodo que tiene - grupos COOH, a través de grupos amino de la membrana microbiana dando origen a un enlace tipo amida. A través de la adición de reactivos orgánicos como carbodiimida y cloruro de acetilo se puede facilitar la unión de los microorganismos a la superficie del ánodo.<sup>30</sup>

(III) Un mediador adsorbido sobre las células microbianas que proporciona el transporte de electrones desde las células hasta el ánodo.<sup>31</sup>

**Figura 3.** Clasificación de los mecanismos de transferencia de electrones desde la bacteria hacia el electrodo



Fuente: REZA, Mohammad, et al. Competition between *E. coli* and *Shewanella* sp. for electricity generation in air cathode MFC in presence of methylene blue as artificial mediator. En: *Environmental Progress & Sustainable Energy*. Marzo, 2015. vol. 34, no. 4, p. 1097-1105

<sup>28</sup> *Ibíd.*

<sup>29</sup> SCOTT Op. cit.

<sup>30</sup> SCOTT Op. cit.

<sup>31</sup> SCOTT Op. cit.

**1.1.4 Sustrato.** Constituye el combustible a partir del cual se genera la energía en la CCM. Se han probado amplias variedades de sustratos como glucosa, acetato, butirato, cisteína, proteínas y lignocelulosa. Las diferencias en la producción de energía y las bacterias presentes en el ánodo sugieren que la composición del sustrato influye en el enriquecimiento bacteriano en el ánodo y, a su vez, en la densidad y eficiencia de la corriente, de allí su importancia en el desempeño de la celda.<sup>32</sup>

Para garantizar el crecimiento de las bacterias dentro de la celda, se deben suministrar a la célula los macronutrientes y micronutrientes necesarios. El sustrato a utilizar tiene que garantizar en primera instancia el carbono debido a que el 50% del peso seco de una bacteria corresponde al mismo. Las bacterias pueden asimilar gran cantidad de sustancias como fuente de carbono, tales como aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, entre otros compuestos orgánicos, lo que facilita la construcción del medio de cultivo a utilizar.<sup>33</sup>

Otro de los macronutrientes más importantes es el nitrógeno, el cual permite formar proteínas, ácidos nucleicos, además de constituir cerca del 12% del peso total de la bacteria. Las bacterias son capaces de asimilar el nitrógeno tanto de fuentes inorgánicas (Amoniaco, nitratos, entre otros) como de fuentes orgánicas. Los demás constituyentes importantes de los sustratos a utilizar son potasio (K) importante para síntesis de proteínas, magnesio (Mg) como estabilizador de ribosomas, calcio (Ca) estabiliza la pared celular microbiana, entre otros.<sup>34</sup>

Por último, los micronutrientes requeridos para el crecimiento de las bacterias son generalmente metales, que tienen funciones estructurales en varias enzimas, tales como cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), manganeso (Mn), níquel (Ni), hierro (Fe), etc.<sup>35</sup>

**1.1.5 Fases del crecimiento microbiano.** Se entiende por crecimiento el incremento de materia viva, y por lo general, el incremento en el número de células y de la masa celular, mas no en un incremento de su tamaño. En una población bacteriana no todas las células son viables, se consideran células vivas a aquellas que son capaces de formar colonias sobre medios con agar, o de formar suspensiones en caldos líquidos. Si el medio suministra todos los nutrientes que requiere el microorganismo para su correcto crecimiento, el aumento del número de bacterias se puede medir en función del tiempo para obtener una curva de crecimiento, donde se expresan los logaritmos del número de células viables frente

---

<sup>32</sup> SCOTT Op. cit.

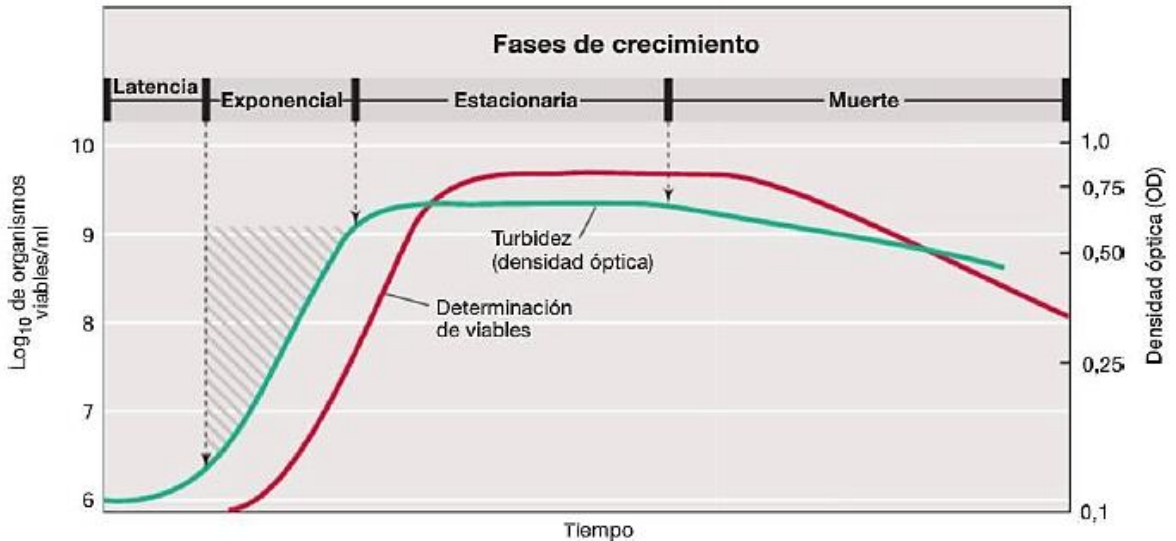
<sup>33</sup> MADIGAN Op. Cit. p. 104

<sup>34</sup> MADIGAN Op. Cit. p. 104-105

<sup>35</sup> MADIGAN, Op. Cit. p. 105

al tiempo. Una curva de crecimiento típica tiene un aspecto sigmoidal y permite diferenciar varias clases de crecimiento que se presentan comúnmente. La velocidad de aumento de número de células es inicialmente lenta, pero incrementa cada vez más con el tiempo, lo que representa un aumento considerable en las últimas fases de crecimiento. El crecimiento de un cultivo bacteriano se presenta en la figura 4.

**Figura 4.** Curva de crecimiento microbiana



Fuente: MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. Brock Biología De Los Microorganismos. 12 ed. España: Pearson, 2009. p. 164.

**1.1.5.1 Fase de latencia.** La fase de latencia abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de lo apropiado que sea el medio de cultivo. Si el inóculo procede de un cultivo previo viejo (fase estacionaria de crecimiento) la célula tiene que adaptarse primero a las nuevas condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas.<sup>36</sup>

**1.1.5.2 Fase exponencial.** La fase de crecimiento exponencial (logarítmico; fase exponencial o fase log) se caracteriza por un crecimiento máximo de los microorganismos, Durante el crecimiento exponencial, la tasa de aumento de las células es proporcional al número de células presentes.<sup>37</sup> El tiempo de generación durante la fase logarítmica es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio<sup>38</sup>. Es una consecuencia del hecho de que cada célula se

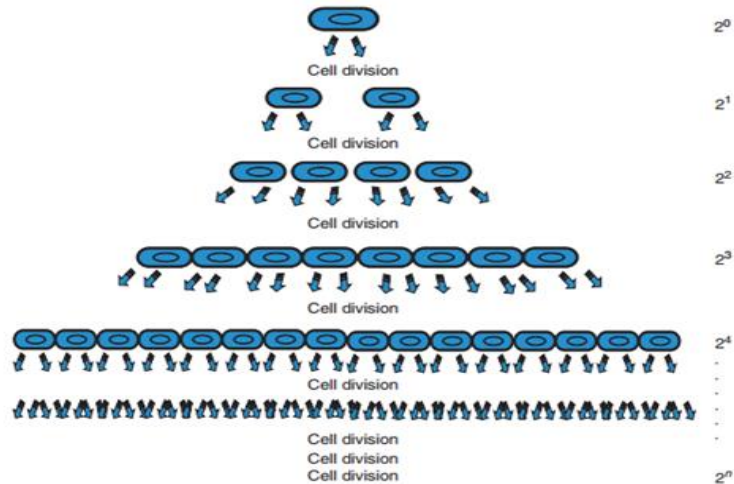
<sup>36</sup> SCHLEGEL Op. cit. P. 213

<sup>37</sup> MAIER Op. Cit.

<sup>38</sup> SCHLEGEL Op. cit. P. 213-214

divide para formar dos, y así sucesivamente (Figura 5), estas células están en el estado fisiológico más sano y por esto, son las células más utilizadas para estudios enzimáticos y estructurales. Por lo general los microorganismos procariotas crecen más rápido que los eucariotas, y los eucariotas de pequeño tamaño lo hacen más rápido que los de gran tamaño.<sup>39</sup>

**Figura 5.** División exponencial celular



Fuente: University of Guelph, Food Science Department. Microbial Growth. Ontario, Canada.

La fase estacionaria se instaura cuando las células ya no crecen. Es dependiente de la concentración de sustrato; como consecuencia, al disminuir la concentración de sustrato aparece una disminución de la tasa de crecimiento antes de su total consumo. La transición de la fase exponencial a la estacionaria tiene lugar por tanto paulatinamente. Además de la disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de O<sub>2</sub> baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer disminuir la tasa de crecimiento e introducir la fase estacionaria. En la fase estacionaria pueden utilizarse aun materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. Los procesos aislados dependen del factor que limite el crecimiento. Sólo las células muy sensibles mueren rápidamente. Siempre que pueda obtenerse energía necesaria por respiración de materiales de reserva o proteínas, las bacterias permanecen más tiempo vivas.<sup>40</sup>

<sup>39</sup> MADIGAN Op. cit. P. 144-145

<sup>40</sup> SCHLEGEL Op. cit. P. 213-214

**1.1.5.3 Fase de muerte.** Ocurre cuando el proceso de incubación continua a pesar de que la población haya alcanzado la fase estacionaria; las células deben permanecer vivas y metabólicamente activas, pero otras deben morir, cuando estas mueren se dice que hay fase de muerte, esta fase es también exponencial, pero siendo más lenta que el crecimiento exponencial.<sup>41</sup>

## 1.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE ENERGÍA EN MICROORGANISMOS

La producción de energía a nivel celular se lleva a cabo mediante la degradación de sustratos químicos (energía química) a través de los procesos de degradación del catabolismo junto con las reacciones de óxido-reducción. En este proceso el sustrato, que representa la fuente de energía, se oxida cuando dona electrones a otra molécula que los acepta y entonces es reducida. La transferencia de electrones esta mediada por moléculas transportadoras como NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>. La energía liberada por la reacción de óxido-reducción es transferida a los compuestos que contienen fosfato, formándose enlaces fosfato de alta energía, siendo la más común de estas el ATP; por último, la energía contenida dentro de este compuesto se libera por hidrolisis en condiciones controladas. La liberación de esta energía química y las actividades enzimáticas catalizan de manera específica cada reacción bioquímica dentro de la célula y regulan casi todas las reacciones celulares.<sup>42</sup>

Existen dos mecanismos energéticos que usan compuestos químicos como donadores de electrones obteniendo como resultado la síntesis de ATP: la fermentación y la respiración. Estos mecanismos se diferencian desde el punto de reacciones redox y el modo por el cual se sintetiza ATP.<sup>43</sup>

**1.2.1 Fermentación.** Una fermentación es una reacción tipo redox equilibrada en la que algunos átomos del donador de electrones se reducen mientras que otros a su vez se oxidan, produciéndose la energía por fosforilación a nivel de sustrato.<sup>44</sup> En el apartado 1.2.1.3 se presenta con más detalle el proceso de fosforilación oxidativa.

**1.2.1.1 Glucólisis.** En esta ruta bioquímica se produce energía por un proceso de fosforilación nivel de sustrato, produciéndose ATP debido a la transferencia de un grupo fosforilo desde un sustrato, glucosa en este caso, con un potencial elevado de transferencia de grupo fosforilo. La glucólisis consiste en un conjunto de reacciones que tienen lugar en todas las células, de la cual se cree que es de las rutas bioquímicas primarias. En este proceso cada molécula de glucosa se divide y convierte en dos unidades de tres carbonos (piruvato). Durante este proceso se oxidan varios átomos de carbono. La pequeña cantidad de energía que se captura

---

<sup>41</sup> MADIGAN Op. cit. P. 144-145

<sup>42</sup> FORBES, Betty A; SAHM, Daniel F; TREVINO, Ernesto A. Diagnóstico Microbiológico. España: Editorial medica Panamericana, 2007.

<sup>43</sup> MADIGAN Op. cit. p 368-370.

<sup>44</sup> *Ibíd.*, p 120-125

durante las reacciones glucolíticas (alrededor del 5 % de la total disponible) se almacena temporalmente en dos moléculas de ATP y dos de NADH. El destino posterior del piruvato depende del organismo que se considere y de sus circunstancias metabólicas<sup>45</sup>. En los organismos anaerobios (aquellos que no utilizan oxígeno para generar energía), el piruvato puede convertirse en productos de desecho. Entre los ejemplos se encuentran el etanol, el ácido láctico, el ácido acético y moléculas semejantes. Utilizando oxígeno como aceptor electrónico terminal, los organismos aerobios, como los animales y los vegetales, oxidan totalmente el piruvato para formar CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en un mecanismo complejo por pasos, conocido como respiración aerobia.<sup>46</sup>

**1.2.1.2 Respiración.** La respiración es un proceso en el que un compuesto es oxidado con oxígeno molecular o un sustituto del mismo, que funciona como aceptor terminal de electrones y que termina produciendo ATP. En estos mecanismos las reacciones redox ocurren con un aceptor de electrones (O<sub>2</sub> u otros) que hace las veces de aceptor final. Cuando el O<sub>2</sub> es el aceptor final y oxida a un compuesto se denomina respiración aeróbica mientras que la anaeróbica se realiza cuando el aceptor final es otra molécula diferente al oxígeno molecular.<sup>47</sup>

**1.2.1.3 Fosforilación oxidativa.** La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o del FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub> a través de una serie de transportadores de electrones. En los organismos aeróbicos, esta es la principal fuente de ATP. La fosforilación oxidativa genera 26 de las 30 moléculas de ATP que se forman cuando la glucosa se oxida completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sup>48</sup>.

El NADH y FADH<sub>2</sub> que son producidos en la ruta de la glicolisis principalmente, son moléculas ricas en energía y que cuentan con un par de electrones que se encargan de reducir el oxígeno molecular a agua, en este proceso se libera una gran cantidad de energía que se puede utilizar para producir ATP o para alguna otra ruta metabólica. La fosforilación oxidativa demuestra la importancia de los gradientes de protones y su importancia en los sistemas energéticos para distintos sistemas biológicos.<sup>49</sup>

---

<sup>45</sup> MCKEE, Trudy y MCKEE, James. Bioquímica. Las Bases Moleculares De La Vida. 5 ed. McGraw-Hill, 2014. p. 769

<sup>46</sup> *Ibíd.* P 256

<sup>47</sup> Madigan Op. cit. P 120

<sup>48</sup> BERG, Jeremy; TYMOCZKO, John y STRYER, Lubert. Bioquímica. 6a. ed. Barcelona, España.: Reverté, 2007. p. 1026

<sup>49</sup> BERG Op. cit.

**1.2.2 Mecanismos de transferencia de electrones.** El flujo de electrones es inherente al metabolismo de los microorganismos, debido a que ellos transfieren electrones a partir de un donador, potencial más bajo, a un aceptor (potencial más alto). Si dicho aceptor es externo, el metabolismo se conoce como respiración, pero si es interno es denominado fermentación.<sup>50</sup> Los microorganismos procuran maximizar su ganancia energética seleccionando al aceptor de electrones con el mayor potencial disponible.

De vez en cuando los aceptores solubles se agotan dentro del medio, pudiendo cambiar a fermentación o usar aceptores insolubles. En las CCM, los ánodos hacen las veces de aceptores insolubles.<sup>51</sup>

Aquellos microorganismos que transfieran sus electrones con facilidad y adicionalmente sean electroquímicamente activas, intervienen a través de dos mecanismos: de forma directa produciendo su mediador o indirecta por la adición de un mediador externo.

En la transferencia de forma directa participan los enlaces de las membranas celulares o algunas enzimas complejas asociadas a la membrana. En ciertas bacterias, los pilis pueden llegar a formar nano-cables sobre la superficie del electrodo<sup>52</sup>.

La transferencia mediada por electrones se facilita cuando se agregan sustancias artificiales tipo mediadores, como tintes y metal orgánicos, o por la capacidad del biocatalizador de secretar estas sustancias.<sup>53</sup> Estas sustancias son oxidadas o reducidas en la célula para posteriormente ser difundidos hacia un aceptor insoluble o donador de electrones (electrodo).

---

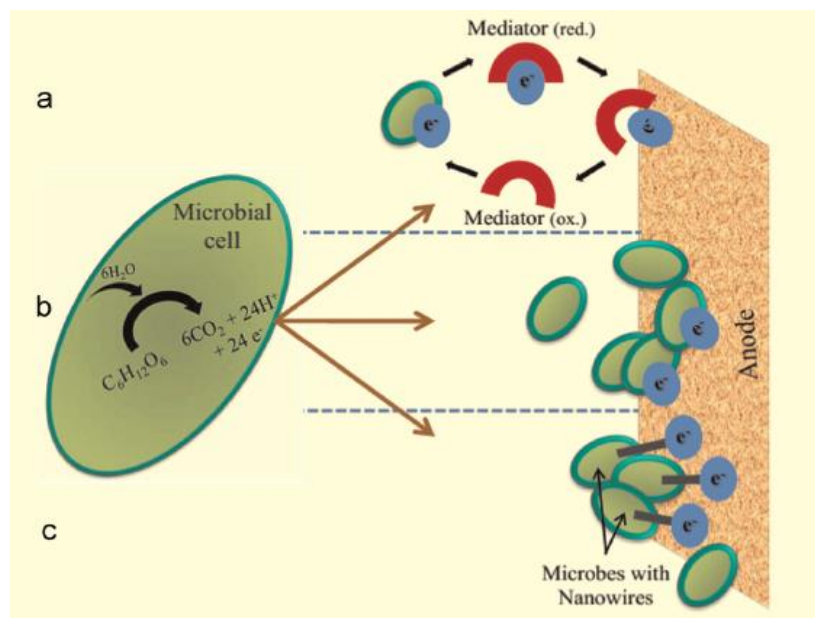
<sup>50</sup> LOPEZ Iván, Implementación de una estrategia de control para la puesta en marcha de una celda de combustible microbiana, 2013.

<sup>51</sup> PANDIT, Soumya, et al. Performance of electron acceptors in catholyte of a two-chambered microbial fuel cell using anion exchange membrane. En: Bioresource Technology. February 2011. vol. 102, no. 3, p. 2736-2744

<sup>52</sup> Ibíd.

<sup>53</sup> BUTTI Op. Cit

**Figura 6.** Mecanismos de transferencia de electrones desde el microorganismo hacia el ánodo a través de mediadores, de forma directa, y a través de nanotubos.



Fuente: BUTTI, Sai Kishore, et al. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. January 2016. vol. 53, p. 462-476.

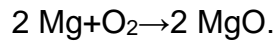
**1.2.3 Reacciones de óxido reducción.** El uso de la energía química en los organismos implica reacciones de óxido reducción (redox). Desde el punto netamente químico, una oxidación ocurre con la pérdida de uno o varios electrones de una sustancia, mientras que la reducción es la ganancia del o los electrones por parte de la sustancia. La química de las células involucra, sumado a lo anterior, la transferencia de átomos completos de hidrógeno, perdiendo su electrón y convirtiéndose en un protón o mejor conocido como hidrogenión.<sup>54</sup>

**1.2.3.1 Donadores y aceptores de electrones.** Los organismos heterótrofos pueden obtener energía gracias a las reacciones de óxido reducción, en las cuales los electrones son transferidos desde cierto compuesto por un denominado donador o agente reductor hacia un aceptor o agente oxidante.

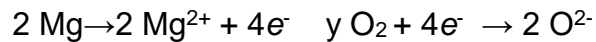
<sup>54</sup> MADIGAN Op. cit. P 125



Como ejemplo se tiene la formación de óxido de magnesio (MgO) representada en la siguiente reacción:



El óxido de magnesio es un compuesto iónico formado por iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{O}^{2-}$ . Según la reacción dos átomos de Mg transfieren 4 electrones a dos átomos de oxígeno.



En este caso, el magnesio es el agente reductor, el que dona electrones al oxígeno para que se reduzca, mientras que el oxígeno es el agente oxidante pues acepta los electrones cedidos por el magnesio y hace que este se oxide.<sup>55</sup>

**1.2.3.2 Transportadores de electrones.** La principal fuente de energía son las reacciones de oxidación-reducción que implican la transferencia de electrones de un átomo a otro o de una molécula a otra. Los portadores de electrones son los encargados de mover los electrones de un compuesto a otro. El donante de electrones inicial se llama donador de electrones primario, mientras que el aceptor final de electrones se denomina aceptor terminal de electrones.<sup>56</sup>

La diferencia en los potenciales de reducción presentes entre el donador primario y el aceptor terminal determina el cambio neto de energía de la reacción completa.<sup>57</sup>

Los portadores o transportadores de electrones se pueden dividir en dos clases: los que se difunden a través del citoplasma de la célula y los que están unidos a las enzimas en la membrana citoplasmática. Dentro de aquellos que se difunden libremente están incluidas las coenzimas nicotinamida-adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$ ). Estas coenzimas son transportadores de átomos de nitrógeno y transfieren dos átomos de hidrógeno al próximo transportador de la cadena. A nivel celular cumplen diferentes funciones, por un lado la coenzima  $\text{NAD}^+$  está involucrada en las reacciones generadoras de energía (catabólicas) y  $\text{NADP}^+$  está implicado en reacciones biosintéticas (anabólicas).<sup>58 59</sup> Las coenzimas cumplen con la función de posibilitar que moléculas químicamente muy diferentes interactúen, uno como donador primario y otro como aceptor final.<sup>60</sup>

---

<sup>55</sup> CHANG, Raymond. Química. 10ma. ed. Mc Graw Hill, 2010. p. 1085

<sup>56</sup> MACKENZIE L., Davis. Water and Wastewater Engineering: Design Principles and Practice. New York, Chicago, San Francisco, Athens, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto: McGraw Hill, 2010. p. 1301

<sup>57</sup> MADIGAN, op. cit. P 120-123

<sup>58</sup> MACKENZIE L., op. cit.

<sup>59</sup> MADIGAN, op. cit. P 120-123

<sup>60</sup> *Ibid.* P 121

**1.2.4 Sistemas transportadores de electrones.** Los sistemas de transporte de electrones están relacionadas con las membranas celulares desempeñando dos funciones: la primera es aceptar electrones de un donador para luego transferirlos a un aceptor y la segunda es conservar una parte de la energía liberada durante el transporte de los electrones para sintetizar ATP.<sup>61</sup>

La cadena de transporte de electrones (Figura 7) da inicio a partir de la generación de moléculas provenientes de rutas análogas al ciclo de Krebs las cuales están en su forma reducida como son el NADH (NAD<sup>+</sup> en forma oxidada), NADPH (NADP<sup>+</sup> en su forma oxidada) y flavínadenín dinucleótido (FADH<sub>2</sub>, FAD en su forma oxidada). Estas moléculas en su estado reducido son los donadores primarios de electrones en la cadena de transporte a través de una serie de transportadores de electrones ubicados entre el citoplasma y periplasma celular.

Dichos transportadores incluyen flavoproteínas, proteínas hierro-azufre, quinonas y citocromos.<sup>62</sup> Luego, el electrón abandona el centro de reacción y pasa a otra quinona, libre en la bicapa lipídica, la cual al reducirse forma quinol, conocido por ser un buen agente reductor. El electrón pasa hacia el periplasma intercediendo el citocromo C en el proceso. El citocromo C tiene como función transportar los electrones hacia el ánodo y servir de enlace entre el citocromo BC y el centro de la reacción.<sup>63</sup>

El proceso mencionado anteriormente provoca un bombeo de protones (átomos de hidrógeno H<sup>+</sup>) fuera de la membrana, generando un potencial electroquímico de protones, los cuales serán usados por las ATP-sintasas para la producción de ATP. Por lo general se establece que tres protones son necesarios para producir una molécula de ATP, sin embargo, algunas investigaciones sugieren la cantidad de protones varía entre tres y cinco.<sup>64</sup> Los átomos de hidrógeno removidos de los transportadores de electrones como el NADH son separados de los electrones, arrastrados y transferidos al siguiente aceptor de electrones.

Los átomos de hidrógeno son liberados fuera de la célula, hacia el periplasma. Esta liberación crea una fuerza móvil de protones a través de la membrana celular, en la cual se liberan aproximadamente diez protones por cada par de electrones derivado de un NADH.<sup>65</sup>

---

<sup>61</sup> MADIGAN, op. cit. P 119

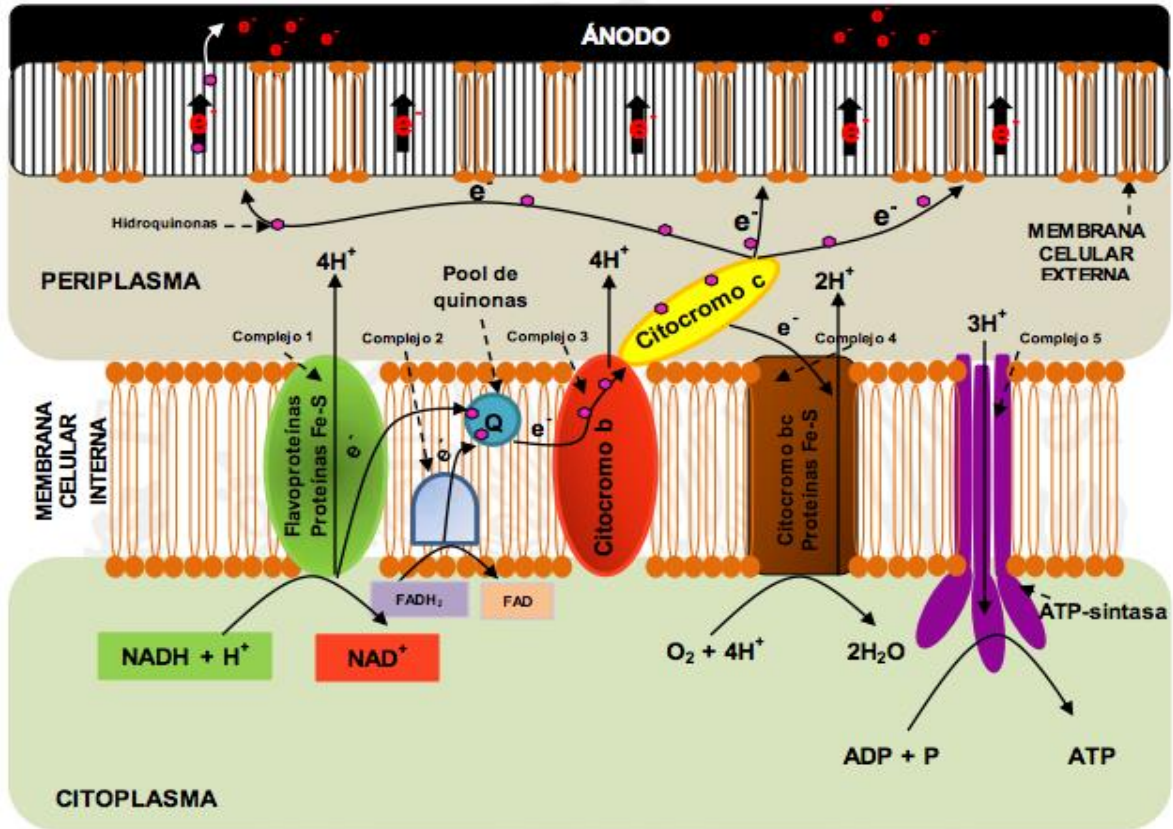
<sup>62</sup> Orihuela, María del Socorro Salazar. Generación de energía eléctrica a partir del tratamiento de aguas residuales por medio de bioceldas [en línea]. Informe final. México. Instituto mexicano de tecnología del agua, 2013. Consultado el 15 de abril de 2017. Disponible en internet: <http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1377/1/TC-1314.1.pdf>

<sup>63</sup> Ibid.

<sup>64</sup> Ibid.

<sup>65</sup> Ibid.

**Figura 7.** Generación de fuerza protón motriz y transferencia de electrones en una celda de combustible microbiana para la bacteria *Geobacter sulfurreducens*



Fuente: ORIHUELA, María del Socorro. Generación de energía eléctrica a partir del tratamiento de aguas residuales por medio de bioceldas [en línea]. Informe final. México. Instituto mexicano de tecnología del agua, 2013.

### 1.3 BIOMASA

Se conoce como toda sustancia orgánica que tiene su origen en los compuestos formados en la fotosíntesis, o indirectamente producidos utilizando la energía del sol, donde se comprenden productos de origen vegetal, animal o microbiano. Incluye también la materia orgánica presente en aguas residuales e incluso la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.<sup>66</sup>

Su composición está basada en diferentes bioelementos esenciales dentro de los cuales se encuentran los denominados macro elementos. Constituyen el 96% de la biomasa seca e incluyen compuestos como son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, siendo los más abundantes el carbono y el oxígeno (43-48%).<sup>67</sup>

<sup>66</sup> FERNÁNDEZ, Jesús, et al. Tecnologías Para El Uso Y Transformación De Biomasa Energética. España: Ediciones Mundi-Prensa, 2015. p. 456-3

<sup>67</sup> FERNANDEZ. Op. cit.,

### 1.3.1 Clasificación de la biomasa (Según humedad)

**1.3.1.1 Biomasa seca.** Puede obtenerse de forma natural con una humedad menor al 60%, como la madera, paja entre otros. Es utilizada energéticamente mediante procesos termoquímicos o fisicoquímicos que se encargan de generar directamente energía térmica en forma de calor, o algún intermediario como combustible sólido, líquido o gaseoso.<sup>68</sup>

**1.3.1.1 Biomasa Húmeda.** Se denomina así cuando el porcentaje de humedad supera el 60%, como por ejemplo en los restantes vegetales, residuos animales, etc. Su tratamiento es mediante procesos químicos, o en algunos casos particulares, por procesos físicos, obteniéndose combustibles líquidos y gaseosos.<sup>69</sup>

**1.3.2 Procesos termoquímicos.** Estos procesos transforman la biomasa en un producto de más alto valor, con una densidad y un valor calorífico mayor, los cuales hacen más conveniente su utilización y transporte.

- **Combustión:** Transformación de la biomasa en gases en presencia de oxígeno en concentraciones estequiométricas o en exceso que genera unos gases a alta temperatura aprovechados para la producción de energía eléctrica y/o térmica.<sup>70</sup>
- **Gasificación:** Transformación de la biomasa en gases, usando un agente reactivo, que puede ser oxígeno en concentraciones por debajo de la estequiométrica, vapor de agua, hidrógeno o mezcla de oxígeno y vapor de agua.<sup>71</sup>
- **Pirólisis:** Descomposición térmica de la biomasa en atmósfera inerte obteniendo productos líquidos, sólidos o gaseosos usualmente empleados como combustibles.<sup>72</sup>

**1.3.3 Procesos bioquímicos.** Estos procesos utilizan las características bioquímicas de la biomasa y la acción metabólica de microorganismos para producir combustibles gaseosos y líquidos. Son más apropiados para la conversión de biomasa húmeda que los procesos termoquímicos.<sup>73</sup>

---

<sup>68</sup> SECRETARIA DE ENERGÍA, Op. cit.

<sup>69</sup> *Ibid.*

<sup>70</sup> NOGUÉS, Fernando; GARCIA-GALINDO, Daniel y REZEAU, Adeline. *Energía De La Biomasa (Volumen I)*. 1a. ed. Zaragoza, España: Prensas de la Universidad de Zaragoza, 2010. p. 557

<sup>71</sup> *Ibid.*, p. 305

<sup>72</sup> *Ibid.*, p. 305

<sup>73</sup> Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. *Manuales sobre energía renovable: Biomasa*. [Electronic(1)]. San José, Costa Rica. Disponible en:

- **Digestión anaerobia:** Obtención de biogás, un combustible rico en metano, producido en un digestor (reactor biológico). Los sustratos se convierten en el digestor en metano por microorganismos específicos.<sup>74</sup>
- **Fermentación:** Proceso donde los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de sustancias orgánicas en ausencia (anaeróbica) o presencia de oxígeno (aeróbica). En la fermentación anaeróbica se produce generalmente biomasa, dióxido de carbono y agua, mientras en la fermentación aeróbica se puede obtener etanol, ácido acético, butanol o acetona.<sup>75</sup>

2.000 millones de personas alrededor del mundo no cuentan con un saneamiento adecuado en sus lugares de residencia, allí un sistema de tratamiento de residuos basado en CCM se presenta como una oportunidad para desarrollar esta tecnología, debido a que el sustrato es "libre" en el agua residual y eventualmente debe ser tratada.<sup>76</sup> Es por ello que el uso de una CCM tiene una relación tan estrecha entre el sustrato empleado, proveniente de la biomasa, y el agua residual que se vaya a emplear.

## 1.4 AGUAS RESIDUALES

Se consideran aguas residuales a aquellas aguas que se desechan después de haber sido modificadas por diversos usos en actividades domésticas o industriales. Las aguas residuales resultan de la combinación de líquidos y residuos sólidos transportados por el agua, que provienen de residencias, oficinas, o incluso de residuos de los procesos productivos de alguna industria.

Comúnmente contienen sustancias orgánicas e inorgánicas potencialmente peligrosas así como una carga microbiológica alta.<sup>77</sup>

### 1.4.1 Clasificación aguas residuales.

**1.4.1.1 Agua residual doméstica.** Son aquellas aguas utilizadas con fines higiénicos (sanitarios, cocinas, lavanderías, etc.) Consisten en residuos humanos que llegan a las redes de alcantarillado por medio de las descargas de las instalaciones hidráulicas de la edificación y también en residuos originados en

---

[http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/5EA2E564AF6F41D405257CC1005B2354/\\$FILE/Manuales\\_sobre\\_energ%C3%ADa\\_renovableBIOMASA.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/5EA2E564AF6F41D405257CC1005B2354/$FILE/Manuales_sobre_energ%C3%ADa_renovableBIOMASA.pdf)

<sup>74</sup> VAN SWAAIJ,Wim; KERSTEN,Sascha y PALZ,Wolfgang. Biomass Power for the World. Pan Stanford Publishing, 2015. p. 762

<sup>75</sup> HERNANDEZ,Alicia; ALFARO,Ileana y ARRIETA,Ronald. Microbiología Industrial. Universidad Estatal a Distancia, 2003. p. 266

<sup>76</sup> SCOTT, Op. cit.,

<sup>77</sup> VÁSQUEZ,Geinny. Panorama Del Tratamiento De Aguas Residuales Con Tecnología Anaerobia En La Costa Atlántica Colombiana. Bogotá, Colombia.: Universidad Nacional de Colombia, 2014. p. 174

establecimientos comerciales, públicos y similares, la composición típica del agua residual doméstica se muestra en la Tabla 1. <sup>78</sup> Es un sustrato químicamente complejo, es decir, al cual no se le conoce una composición definida, además, contiene gran variedad de vitaminas, minerales, proteínas y carbohidratos posibilitando el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos. <sup>79</sup>

**Tabla 1.** Composición típica del agua residual doméstica

Componente	Unidad	Concentración		
		Fuerte	Media	Débil
Sólidos totales	mg/l	1200	720	350
Sólidos disueltos totales	mg/l	850	500	250
Sólidos disueltos fijos	mg/l	525	300	145
Sólidos disueltos volátiles	mg/l	325	200	105
Sólidos suspendidos	mg/l	350	220	100
Sólidos suspendidos fijos	mg/l	75	55	20
Sólidos suspendidos volátiles	mg/l	275	165	80
Sólidos sedimentables	mg/l	20	10	5
Demanda bioquímica de oxígeno	mg/l	400	220	110
Carbono orgánico total, COT	mg/l	290	160	80
Demanda química de oxígeno DQO	mg/l	1000	500	250
Nitrógeno total	mg/l	85	40	20
<b>Componente</b>	<b>Unidad</b>	<b>Fuerte</b>	<b>Media</b>	<b>Débil</b>
Nitrógeno orgánico	mg/l	35	15	8
Nitrógeno amoniacal	mg/l	50	25	12
Nitritos	mg/l	0	0	0
Nitratos	mg/l	0	0	0
Fósforo total	mg/l	15	8	4

FUENTE: METCALF y EDDY. Ingeniería De Aguas Residuales. 3 ed. Madrid: McGraw-Hill, 1996. p. 862

**1.4.1.2 Agua residual industrial.** Son residuos líquidos generados en los procesos industriales y de fabricación; pueden contener aceites, detergentes, antibióticos, ácidos y grasas y otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. Su composición es muy variable, dependiendo de las diferentes actividades industriales.

**1.4.1.3 Agua residual sintética.** El estudio de aguas residuales a escala laboratorio es difícil debido a las variaciones significativas de sus características según su procedencia, a la presencia de microorganismos patógenos o algún tipo de contaminante; es entonces donde se hace uso de agua residual sintética, un medio compuesto por sustancias orgánicas e inorgánicas basados en aguas residuales. <sup>80</sup> Es comúnmente empleada en estudios a pequeña escala debido a que en ocasiones se dificulta trabajar con aguas residuales domésticas o industriales por

<sup>78</sup> Ibíd.

<sup>79</sup> METCALF y EDDY. Ingeniería De Aguas Residuales. 3 ed. Madrid: McGraw-Hill, 1996. p. 862

<sup>80</sup> TORRES, Patricia; FORESTI, Eugenio y VAZOLLER, Rosana. Composición y uso de agua residual doméstica en reactores a escala de laboratorio. [Print(0)]. [Consultado el Septiembre 52017]. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=50288&indexSearch=ID>

las razones mencionadas al inicio de este apartado. Presenta una preparación sencilla, con compuestos de fácil adquisición, que se comportará bioquímicamente de forma análoga al agua residual, de forma que pueda ser usada en investigaciones a nivel de laboratorio y en reactores prototipo.<sup>81</sup>

En diferentes estudios se ha investigado el desempeño de las CCM con aguas residuales sintéticas con el fin de entender la viabilidad del principio de funcionamiento, los mecanismos para mejorar la producción de energía eléctrica y las eficiencias de eliminación de carga orgánica<sup>82</sup>. Además, tiene la ventaja de controlar las composiciones y concentraciones del medio, evitando así, los problemas que viene consigo el uso del agua residual real.<sup>83</sup>

**1.4.2. Tratamiento de aguas residuales.** El tratamiento de las aguas residuales es el conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos por medio de los cuales una determinada agua residual reduce su carga orgánica e inorgánica y se mitiga el impacto de este efluente en los lugares donde se hace la posterior deposición. Consiste en cuatro etapas generales listadas a continuación.

**1.4.2.1 Tratamiento preliminar o pretratamiento.** Se realizan operaciones de cribado y filtrado a gran escala. Se eliminan sólidos suspendidos de gran tamaño presentes en la corriente a tratar. No se considera una fase como tal del tratamiento, pero mejora la eficiencia de remoción de las fases posteriores.<sup>84</sup>

**1.4.2.2 Tratamiento primario.** El principal objetivo es remover aquellos contaminantes que pueden sedimentarse, caso de los sólidos sedimentables y algunos suspendidos o aquellos que pueden flotar como las grasas. Se realizan procesos como la sedimentación primaria donde se remueve cerca del 60% de los sólidos sedimentables, este es un proceso en el que se eliminan proporciones significativas de lodo que ingresan junto con el agua a tratar.<sup>85</sup> Se considera un tratamiento muy básico debido a que aún se encuentra presente materia orgánica que no ha sido eliminada después de esta fase.<sup>86</sup>

**1.4.2.3 Tratamiento secundario.** Está encaminado a la reducción y eliminación de los sólidos en suspensión y los compuestos orgánicos biodegradables. Se reduce la carga orgánica presente en el agua residual, hasta niveles aceptables, se realiza

---

<sup>81</sup> GUDE, Veera Ganeswar. Wastewater Treatment in Microbial Fuel Cells – an Overview. [Electronic(1)]: 2016. p. 287-3070959-6526

<sup>82</sup> Ibid.,

<sup>83</sup> TORRES, Op. cit.

<sup>84</sup> DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL ESTADO DE NUEVA YORK. Manual De Tratamiento De Aguas Negras. 3 ed. Limusa, 2008. p. 303

<sup>85</sup> METCALF Y EDDY Op. cit. p. 862

<sup>86</sup> MADIGAN op. cit. p. 927

mediante procesos microbiológicos en los que una bacteria utiliza este material orgánico para crecer y descomponerlo simultáneamente.<sup>87,88</sup>

**1.4.2.4 Tratamiento terciario.** El objetivo de esta fase del tratamiento es remover contaminantes determinados, metales pesados, compuestos no biodegradables o remover compuestos que no haya sido posible eliminar en tratamientos previos. Este es un conjunto de procesos fisicoquímicos que incluyen precipitación, intercambio iónico, micro filtración, coagulación química e incluso osmosis inversa. Este tratamiento se emplea para dar la posibilidad de reutilizar esta agua en diversos procesos productivos.<sup>89</sup>

---

<sup>87</sup> METCALF Y EDDY Op. cit. p. 169

<sup>88</sup> MADIGAN Op. cit. p. 929

<sup>89</sup> METCALF Y EDDY Op. cit. p. 170



## METODOLOGÍA

Según el objetivo general y los objetivos específicos establecidos, se llevarán a cabo una serie de fases que permitirán el desarrollo del proyecto, empezando con la definición de las condiciones bajo las cuales operará la celda, incluyendo las cepas a utilizar, mediadores, y demás factores. Luego por medio de experimentos en la celda se determinará el efecto de las concentraciones de mediador en el sistema para finalmente establecer la relación que existe entre el crecimiento de las bacterias y la producción de energía eléctrica durante el proceso.

### **2.1 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVOREZCAN LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA LABORATORIO**

**2.1.1 Selección del mediador.** La selección del mediador a utilizar se realizará por medio de una revisión bibliográfica en la cual se establecerá cuál de ellos presenta mayor afinidad por las bacterias a utilizar, teniendo en cuenta parámetros como la disponibilidad del mismo, la cantidad de artículos reportados en bases de datos (como Scopus, Science Direct, Springer Link, EBSCO, entre otras) acerca de su uso en celdas de combustible microbianas, e incluso descartando aquellos mediadores que puedan resultar tóxicos para los microorganismos utilizados.

Una vez seleccionado, se procederá a realizar la revisión bibliográfica para identificar el rango de concentraciones a utilizar, basado en estudios que reporten la influencia de la concentración del mediador en la producción de energía eléctrica mediante CCM, sumado a los parámetros mencionados en el párrafo anterior y en el apartado 1.1.2.

**2.1.2 Temperatura.** Cada microorganismo tiene una temperatura donde su crecimiento se ve favorecido, por lo que en las inmediaciones de esta se espera que la bacteria crezca de tal manera que beneficie la generación de energía. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, en primera instancia se debe conocer la temperatura en la que el crecimiento de cada microorganismo se ve beneficiado, aplicando la clasificación de los distintos microorganismos según temperatura. Tanto la *Escherichia coli* como la *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias de tipo mesófilo, por lo que la temperatura donde estas bacterias pueden crecer es de 10°C hasta 45°C

**2.1.3 pH.** Por medio de una comparación entre los antecedentes presentados de donde se utilizan estos microorganismos en CCM, y su clasificación según el pH de crecimiento, se obtendrá un valor que se utilizará como punto de partida para la experimentación.

En proyectos previos se reportan datos obtenidos experimentalmente para las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en los cuales se determina una relación directa entre el pH y la eficiencia de producción energética. Estas cepas se deben mantener en condiciones cercanas a la neutralidad, por lo que se tomaran muestras de pH en intervalos de 3 horas por medio de un potenciómetro que se recalibrará después de cada prueba. Es importante mencionar que al agregar algún tipo de mediador a la cámara anódica el pH de la misma se podría aumentar o disminuir según la naturaleza de esa sustancia.

**2.1.4 Agua residual sintética.** Se procederá a realizar una revisión bibliográfica de aguas residuales sintéticas utilizadas como caldo de cultivo para el crecimiento de bacterias y la generación de energía eléctrica en CCM. Adicionalmente, se comparará la composición de este medio sintético con los requerimientos nutricionales de cada microorganismo que propicien el correcto crecimiento y desarrollo de estas cepas; y por último, se evaluarán factores como la disponibilidad del medio, el costo del mismo, entre otros.

**2.1.5 Determinación de la configuración de la CCM.** Se procederá a realizar las corridas experimentales según lo establecido en el proyecto de investigación “Implementación de una celda de combustible microbiana para la generación de energía eléctrica a escala laboratorio” desarrollado simultáneamente en el grupo de investigación de Energías alternativas <sup>90</sup>

## **2.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MEDIADOR EN LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN LA CCM**

**2.2.1 Diseño de experimentos.** Según las condiciones de operación establecidas para la experimentación en el apartado 2.1, se planteará un diseño de experimentos, el cual consistirá en una serie de pruebas experimentales modificando una o más variables y posteriormente, evaluando su efecto en una variable respuesta. Se decidirá el nivel y el tipo del diseño de experimentos. Inicialmente se parte de los valores de concentración seleccionados y las cepas de las bacterias.

**2.2.2 Ejecución de pruebas.** Se realizarán según las especificaciones del diseño de experimentos, además de tener en cuenta parámetros que sean susceptibles de modificaciones. Las corridas experimentales tendrán una duración de 30 horas cada una, donde se llevarán a cabo las mediciones correspondientes a través de un pirómetro (temperatura), multímetro (voltaje e intensidad) y un pHmetro tipo lápiz (pH). Es importante mencionar que para la ejecución de las pruebas se cuenta con

---

<sup>90</sup> BERMUDEZ, María y BERNAL, Erika. Implementación De Una Celda De Combustible Microbiana a Escala Laboratorio Para La Generación De Energía Eléctrica. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de América, 2017. p. 1-108

un sistema que ajusta la temperatura, el cual requiere revisión periódica. El inóculo de los microorganismos se realizará en la cámara anódica, junto con el mediador (en caso de ser requerido) y el sustrato.

Al término de las pruebas ejecutadas con base en el diseño de experimentos, se seleccionará la combinación que produzca mayor energía eléctrica, expresada en voltios, para cada uno de los microorganismos y se hará la réplica correspondiente para cada cepa. Adicionalmente, se realizará una prueba para cada microorganismo sin utilizar mediador, que serán utilizadas como blanco de comparación de las corridas.

Las réplicas durante la experimentación son importantes debido a que permite mejorar la confiabilidad de los datos obtenidos, específicamente debido a que expondrá el efecto del mediador en el funcionamiento de la celda y la producción de energía en la misma.

**2.2.3 Parámetros para la evaluación de la energía eléctrica producida.** La cantidad de energía eléctrica producida en la celda de combustible microbiana será un indicador fundamental para evaluar el desempeño de esta tecnología. Estos indicadores se presentaron en el apartado 1.2.1 junto con sus respectivas ecuaciones. Las mediciones de voltaje e intensidad se tomarán con un multímetro digital.

**2.2.4 Estimación del efecto del mediador sobre las cepas.** Una vez evaluada la producción de energía eléctrica obtenida, de acuerdo con la revisión bibliográfica se establecerán 2 valores de concentración del mediador y se evaluará la influencia de dicha variación en el aumento o reducción de electricidad para cada cepa.

## **2.3 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS UTILIZADAS EN FUNCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA**

**2.3.1 Cinética de crecimiento.** Asociado a la ejecución de pruebas previamente mencionada se realizará el cálculo del número de células de cada uno de los microorganismos haciendo uso del método de recuento de colonias en placa. Esta técnica permite detectar el medio de cultivo, determinando el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de la muestra al ser inoculadas en un medio de cultivo sólido y apropiado. Teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento de los microorganismos se usará la siembra por extensión o por vertido en placa, donde la diferencia radica en el orden en que se adiciona la muestra y el volumen de la misma. Además, se harán las respectivas diluciones para proceder a inocular la muestra, incubarla a la temperatura adecuada para posteriormente hacer el conteo de las colonias y así determinar la velocidad con que estas crecen y finalmente desarrollar la cinética de crecimiento. Una vez

determinada la cinética de crecimiento se establecerá la relación presente entre el crecimiento del microorganismo y la producción de energía eléctrica.

**2.3.1.1 Parámetros para la evaluación de crecimiento microbiano.** Con el fin de evaluar el crecimiento de cada una de las bacterias se tendrán en cuenta dos parámetros, la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación.

- **Velocidad de crecimiento:** Se conoce como el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. Es característica para cada microorganismo y depende principalmente de factores como la capacidad de crecimiento del microorganismo y el ambiente donde se encuentra, entre otros.<sup>91, 92</sup>

Matemáticamente, se puede calcular la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial como la pendiente de la gráfica construida con los valores de tiempo en el eje de las abscisas (eje x), y el logaritmo natural de las células vivas en la ordenada (eje y) durante la fase exponencial. La ecuación que resume lo anteriormente mencionado es:<sup>93</sup>

**Ecuación 6.** Calculo para la velocidad de crecimiento a través de la pendiente de la recta de logaritmo de crecimiento vs tiempo

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_f) - \text{Ln}(N_0)}{t_f - t_0}$$

- **Tiempo de generación:** Es el tiempo que requerido para que la población se duplique, evidentemente, dentro de la fase exponencial.<sup>94</sup>

**Ecuación 7.** Tiempo de duplicación o generación

$$t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$$

**2.3.2 Determinación de parámetros de calidad del agua.** Mencionado en el apartado 1.1.2, el DQO es el indicador asociado al grado de biorremediación logrado sobre el agua empleada durante el proceso. Para evaluar este parámetro se hará uso del método con dicromato potásico que consiste en una oxidación de la materia orgánica utilizando el compuesto previamente mencionado como oxidante en presencia de ácido sulfúrico y catalizadores como los iones de plata. Así pues, se

---

<sup>91</sup> MADIGAN Op. Cit.

<sup>92</sup> DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. España: Acribia, S.A. 1995. 291p.

<sup>93</sup> MAIER Op. Cit.

<sup>94</sup> MADIGAN Op. Cit.

evaluará la reducción de carga orgánica en el agua residual sintética obtenida al final de las 30 horas para las 2 cepas en comparación con el agua compuesta únicamente por tripticasa de soya.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 3.1 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVOREZCAN LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS A ESCALA LABORATORIO

**3.1.1 Selección del mediador.** Para la selección de los mediadores encargados de ayudar en la transferencia de electrones desde el interior de la bacteria hasta los electrodos de la cámara, se utiliza en primera instancia la afinidad de las bacterias hacia los mismos. Cabe resaltar que la *Pseudomonas aeruginosa* se encarga de producir sus propios intermediarios que hagan esta labor, sin embargo, las pruebas se realizarán con el mediador seleccionado para la *Escherichia coli*, y así evaluar el efecto de estos en ambas cepas de bacterias. En el cuadro 1 se muestran los principales mediadores utilizados para distintas bacterias en CCM.

**Cuadro 1.** Mediadores más empleados con la *Escherichia coli* y mediadores producidos por la *Pseudomonas aeruginosa* en una celda de combustible microbiana.

<b>Bacteria</b>	<b>Mediador</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Azul de metileno <sup>95</sup> Rojo neutro <sup>96</sup> Tionina <sup>97</sup>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Ferrocianuro de potasio <sup>98</sup> Piocianina <sup>99,100</sup> Fenazina-1-carboxamida <sup>101,102</sup>

<sup>95</sup> TASKAN Ergin, ÖZKAYA Bestamin, HASAR Halil. Effect of Different Mediator Concentrations on Power Generation in MFC Using Ti-TiO<sub>2</sub> Electrode. En: International Journal of Energy Science. Febrero, 2014. Vol. 4. No. 1

<sup>96</sup> *Ibíd.*

<sup>97</sup> NAJAFPOUR Ghasem, EUN OH Sang, Investigation of different mediators in microbial fuel cell with cyclic voltammeter. Pakistan Journal of Biotechnology. Vol 10. (2013) p. 37-51

<sup>98</sup> KISHORE Sai, VELVIZHI G., SULONEN Mira, HAAVISTO Johanna, KOROGLU Emre, CETINKAYA Afsin, SINGH Surya, ARYA Divyanshu, MODESTRA Annie, KRISHNA Vamsi, VERMA Anil, OZKAYA Bestami, LAKANIEMI Aino, PUHAKKA Jaakko, MOHAN Venkata. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol 53. (2016) p.462–476.

<sup>99</sup> RABAEY Korneel, VERSTRAETE Willy, Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. En: Trends in Biotechnology. Vol.23. No. 6. Junio, 2005 p. 292-298

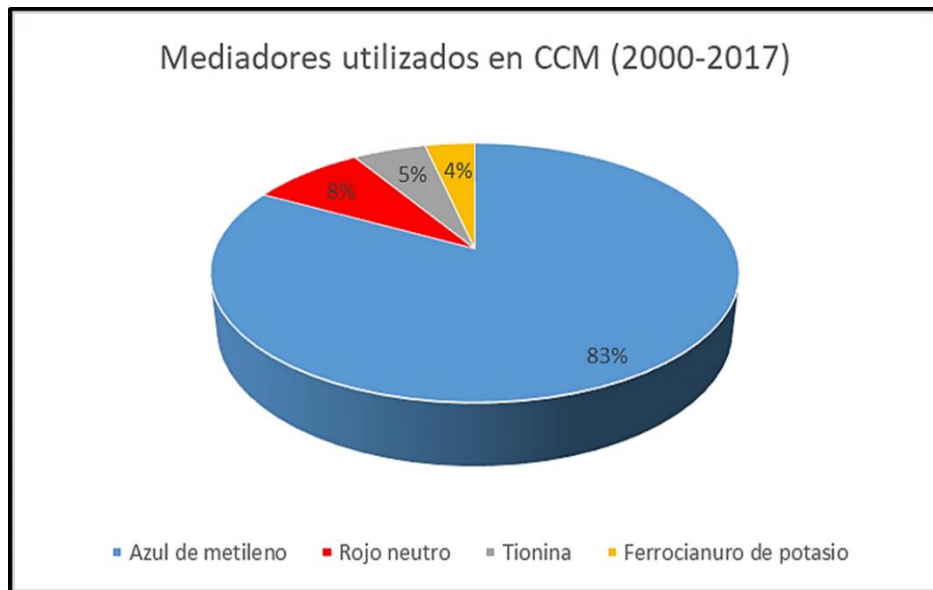
<sup>100</sup> GUO Kun, HASSETT Daniel, GU Tingyue. Microbial fuel cells: Electricity generation from organic wastes by microbes. En: Microbial Biotechnology: Energy and environment. 2012. p. 162-189

<sup>101</sup> RABAEY Op. cit.

<sup>102</sup> GUO Op. cit.

Teniendo definidos los mediadores más utilizados para esta bacteria en CCM, se procedió a realizar búsquedas con cada uno de los mediadores listados anteriormente, en combinación con las dos bacterias a utilizar, seleccionando artículos entre el 2000-2017 (Anexos A-D), donde se evidencia que el mediador más utilizado para la operación en CCM y las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es **Azul de metileno**. En el gráfico 1 se presentan los mediadores más utilizados en una CCM, donde el azul de metileno presenta el mayor número de menciones.

**Gráfico 1.** Selección de mediador según revisión en base de datos SCOPUS



Por otra parte, el azul de metileno ha sido utilizado previamente en el grupo de investigación, obteniendo resultados satisfactorios en términos de producción de energía eléctrica (464 mV para *Escherichia coli*, y 365 mV para *Pseudomonas aeruginosa*).<sup>103</sup>

**3.1.2 Selección de concentraciones para cada mediador.** Una vez seleccionado el mediador a utilizar para el funcionamiento de la celda de combustible (Azul de metileno), se procedió a elegir las concentraciones a utilizar durante la experimentación. Con referencia a estudios realizados anteriormente, se seleccionaron dos concentraciones de mediador.

<sup>103</sup> MEDINA, Sergio y ZAPATA, Maria. Evaluación De La Producción De Energía Eléctrica Y Disminución De DQO En Agua Residual Sintética Mediante Celdas De Combustible Microbianas a Escala Laboratorio. Bogotá, Colombia: Universidad de América, 2017. p. 1-141

**Tabla 2.** Concentraciones seleccionadas de mediador

<b>Mediador</b>	<b>Concentración (mol/l)</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
<b>Azul de metileno</b>	0,0003 <sup>104,105,106,107</sup>	0,0960
	0,0001 <sup>108, 109, 110, 111</sup>	0,0320

Fueron seleccionadas las concentraciones de mediador presentadas en la tabla 2, empezando por aquella que reportó mejores resultados en términos de producción eléctrica (0,0003 M) y una concentración menor empleada también en diversas investigaciones (0,0001 M). No se elige una concentración más alta porque no se conoce con claridad si puede llegar a ser tóxica para alguna de las 2 cepas. Adicionalmente, se pretende corroborar los resultados de la experimentación a realizar con lo reportado en la literatura bajo las concentraciones de las cuales se hace mayor mención.

**3.1.3 Temperatura.** La temperatura es un factor determinante para el crecimiento de los microorganismos, a medida que esta se acerca al valor más favorable para cada microorganismo, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y el crecimiento se acelera. Por encima de dicho valor algunas proteínas se desnaturalizan y por debajo puede presentarse congelamiento y no se presenta crecimiento del microorganismo.<sup>112</sup>

Es por esto que, dependiendo de las características metabólicas de cada bacteria, se estableció el rango de temperatura para el crecimiento de la bacteria, y adicionalmente, la temperatura en la cual el microorganismo crece de manera más rápida en la CCM.

- ***Escherichia coli*:** Se catalogan como microorganismos mesófilos debido a que su crecimiento puede llevarse a cabo en temperaturas comprendidas entre 8°C y 48°C. Las condiciones donde el crecimiento es máximo consisten en

<sup>104</sup> TASKAN Op. cit

<sup>105</sup> PERMANA,Dani, et al. Preliminary Investigation of Electricity Production Using Dual Chamber Microbial Fuel Cell (DCMFC) with Saccharomyces Cerevisiae as Biocatalyst and Methylene Blue as an Electron Mediator. En: Procedia Chemistry. 2015. vol. 17, p. 36-43

<sup>106</sup> NAJAFPOUR Op. cit.

<sup>107</sup> SUGNAUX,Marc, et al. Probing electron transfer with Escherichia coli: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: Bioresource Technology. November 2013. vol. 148, p. 567-573

<sup>108</sup> ZUHRI,Fachryan, et al. Effect of methylene blue addition as a redox mediator on performance of microbial desalination cell by utilizing tempe wastewater <br /> . En: International Journal of Technology. vol. 6, p. 952-961

<sup>109</sup> NAJAFPOUR Op. cit.

<sup>110</sup> RAHIMNEJAD,M., et al. Methylene blue as electron promoters in microbial fuel cell. En: International Journal of Hydrogen Energy. October 2011. vol. 36, no. 20, p. 13335-13341

<sup>111</sup> TASKAN Op. cit

<sup>112</sup> MADIGAN Op. cit. p 152.



temperaturas entre los 35 y 40 °C, por lo que la celda de combustible microbiana se operará a una temperatura constante de 37°C durante todas las fases de crecimiento de la cepa.<sup>113 114</sup>

- ***Pseudomonas aeruginosa***: Para el crecimiento máximo de la bacteria, la temperatura se encuentra en un rango entre 4 y 42 °C, es decir, son también organismos mesófilos, y es por ello (al igual que con la *Escherichia coli*), la celda de combustible microbiana se operará a una temperatura constante de 37°C durante todas las fases de crecimiento de dicha cepa.<sup>115</sup>

Tanto la *Escherichia coli* como la *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias de tipo mesófilo, por esta razón la temperatura de la cámara se mantuvo en 37°C (±2°C). Con el fin de asegurar esta condición, se empleó una nevera de poliestireno expandido (icopor) con dos bombillos y un regulador de voltaje. Este último permitió ajustar el calor emitido por los bombillos y gracias a la naturaleza del material aislante de la nevera se limitó el intercambio térmico con el medio. Este parámetro se monitoreó constantemente en intervalos de 3 horas para mantener las condiciones de operación cercanas a 37°C.

**3.1.4 pH.** Generalmente una CCM opera con valores de pH entre 6 y 8 en la cámara anódica y un pH neutro o superior en la cámara catódica. Esto se debe a que el proceso microbiano anódico funciona bien alrededor del pH neutro y la actividad microbiana disminuye a pH más alto o más bajo. Un pH más alto en la cámara anódica favorece una mayor eliminación en términos de DQO, pero reduce la potencia eléctrica y un pH más alto en la cámara catódica puede mejorar la potencia de salida de la CCM debido a mejoras en la cinética de reducción de oxígeno.<sup>116</sup>

Para las cepas que se emplearán en la celda se estableció para cada una de ellas su valor de pH:

- ***Escherichia coli***: Su rango de pH de crecimiento se encuentra entre 6.4 y 7.2, clasificándose, así como microorganismos que crecen en condiciones de neutralidad.<sup>117</sup> Según la revisión bibliográfica, el valor más utilizado en la

---

<sup>113</sup> REZA, Mohammad, et al. Competition between *E. coli* and *Shewanella* sp. for electricity generation in air cathode MFC in presence of methylene blue as artificial mediator. En: Environmental Progress & Sustainable Energy. Marzo, 2015. vol. 34, no. 4, p. 1097-1105

<sup>114</sup> PRIYA Lalitha, T. RAMACHANDRAN, SUNEESH P. V. Fabrication and characterization of high power dual chamber *E. coli* microbial fuel cell. En: Materials Science and Engineering. Vol. 149. 2016.

<sup>115</sup> ANNETTE, E. La Bauve; MATTHEW, J. Wargo. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas Aeruginosa*. En: Curr Protoc Microbiol. Mayo, 2012, p. 2

<sup>116</sup> SCOTT Keith, op. cit.

<sup>117</sup> MANDERSON, Daniel; DEMPSTER, Robert; CHISTI, Yusuf. A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. Septiembre, 2005, vol. 33, p. 173

experimentación en CCM utilizando esta bacteria es de 7.<sup>118,119</sup> Adicionalmente, según trabajos previos, el valor con el que se obtuvo el mejor desempeño en la celda es igual a 6.5.<sup>120</sup>

Es así como se elige el valor de 7 como pH, basados en las menciones realizadas en diferentes artículos, el cumplimiento del rango teórico y que la celda de combustible microbiana a utilizar presenta mejoras técnicas que no se lograron cumplir totalmente en proyectos pasados.

- ***Pseudomonas aeruginosa***: Su pH de crecimiento se encuentra en un rango entre 4 y 8, clasificándose como microorganismos que crecen en condiciones de neutralidad. Según revisiones bibliográficas el pH donde su crecimiento se ve favorecido es de 7.<sup>121,122,123</sup> Mientras que en trabajos previos el valor con el que se obtuvo mejor desempeño en la celda (en términos de voltaje e intensidad) fue con un pH igual a 8. El valor elegido de pH es igual a 7 debido a las mismas justificaciones presentadas con la *Escherichia coli*.

**3.1.5 Selección del agua residual sintética a utilizar.** El agua residual sintética a utilizar debe cumplir con los requerimientos nutricionales de los dos microorganismos a utilizar, tales como macronutrientes, micronutrientes, afinidad con el sustrato entre otras. Comúnmente, para la operación en celdas de combustible microbiano se utilizan medios sintéticos comerciales, tales como el caldo de Luria Bertani (LB) que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias seleccionadas.

---

<sup>118</sup> SUGNAUX Mrc, MERMOUD Sophie, DA COSTA Ana Ferreira, HAPPE Manuel, FISHCER, Fabian. Probing electron transfer with *Escherichia coli*: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: Bioresource Technology. 12 de Julio del 2013. P. 3.

<sup>119</sup> WANG Chin-Tsan, CHEN Wei-Jung, HUANG Ruei-Yao. Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*. En: International Journal of Hydrogen Energy. 2010, p. 3.

<sup>120</sup> MEDINA Op. Cit.

<sup>121</sup> RUIZ MARTINEZ, Lidia. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antibióticos. Barcelona, 2007, p. 6. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de medicina. Departamento de patología.

<sup>122</sup> KATHIRAVAN, T; MARYKALA, J; SUNDARAMANICKAM, A; KUMARESAN, S; BALASUBRAMANIAN T. Studies on nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* for lipase production. En: Pelagia Research Library. 2012, vol. 1, p. 593.

<sup>123</sup> GONZALEZ Juan, CASTAÑEDA Irma, ALCÁNTARA Jaime, MENDOZA, Arturo. Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en solución mínima de sales con detergente Ace. En: Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2013.

En la tabla 3 se listaron las composiciones de aguas residuales sintéticas comúnmente usadas en CCM. Basados en esta información se procedió a buscar un medio de cultivo que se asemejara en gran medida a las composiciones listada anteriormente, para garantizar el correcto crecimiento de las bacterias en la cámara.

**Tabla 3.** Medios utilizados como agua residual sintética para cada bacteria en CCM

Medio utilizado como agua	Bacteria	Composición	Concentración (g/L)
Luria-Bertani (LB)	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	10
		Peptona	10
		Levadura	5
		NaCl	10
		NaHCO <sub>3</sub>	10
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>124</sup>	8,5
Medio sintético	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	5
		Levadura	5
		NaHCO <sub>3</sub>	2,5
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
		Peptona	15
		KCl <sup>125,126</sup>	2
Medio Sintético	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa	10
		Levadura	5
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,5
		NaHCO <sub>3</sub> <sup>127</sup>	10
Luria–Bertani Broth (LB)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Triptona	10
		Levadura	5
		NaCl <sup>128</sup>	10

Se seleccionó el caldo **Tripticasa de soya** por su similitud en composición, su costo relativamente bajo (Anexo E), y porque adicionalmente, este caldo de cultivo ha sido utilizado previamente en investigaciones como:

- Tesis de grado (Pertenece al grupo de investigación en Energías alternativas): MEDINA, Sergio y ZAPATA, Maria. Evaluación De La Producción De Energía Eléctrica Y Disminución De DQO En Agua Residual Sintética

<sup>124</sup> XI Op. cit. P. 1180

<sup>125</sup> REZA, Competition between E. coli and Shewanella sp. for electricity generation in air cathode MFC in presence of methylene blue as artificial mediator. Op. cit. P. 1100

<sup>126</sup> REZA, Mohammad, et al. Kinetics investigation of diversity cultures of E. coli and Shewanella sp., and their combined effect with mediator on MFC performance. En: Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 25 May 2015. vol. 25, p. 42-50

<sup>127</sup> PARK, Doo Hyun, et al. Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with Neutral Red. En: Biotechnology Letters. Junio 2000. vol. 22, p. 1301-1304

<sup>128</sup> PHAM Op. cit. P. 1120

Mediante Celdas De Combustible Microbianas a Escala Laboratorio. Bogotá, Colombia: Universidad de América, 2017. p. 1-141

- DE OLIVEIRA, Helinando, et al. Development of low cost microbial fuel cell based on Escherichia coli. En: IEEE International Conference on Nanotechnology. Julio 2015. vol. 15, p. 940

**Tabla 4.** Composición caldo tripticasa de soya

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Triptona	17
Peptona de soja	3
NaCl	5
Glucosa	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5

Fuente: MERK MILLIPORE, Tryptic Soy Broth (TSB), Casein-Peptone Soy meal-Peptone (CASO) Broth [En línea] Citado 10 de Agosto de 2017, disponible en: [http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Tryptic-Soy-Broth,MDA\\_CHEM-105459?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.co%2F#anchor\\_orderingcomp](http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Tryptic-Soy-Broth,MDA_CHEM-105459?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.co%2F#anchor_orderingcomp), Alemania.

Con el fin de verificar el cumplimiento de los requerimientos nutricionales del microorganismo en términos de macronutrientes (carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, calcio, fósforo, potasio, sodio, magnesio, entre otros) y algunos macronutrientes, de la composición del caldo comercial tripticasa de soya tenemos:

- La triptona de soya es un digerido pancreático de caseína, se utiliza como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo, puesto que está compuesta de una mezcla de aminoácidos, incluidos aminoácidos esenciales y péptidos más grandes. Posee también calcio (0.019%) magnesio (0,0065%) potasio (0,95%) y sodio (2,10%)<sup>129</sup>.
- La peptona de soya la peptona es producto de una digestión enzimática de tejidos animales, como tal está compuesto de una mezcla de aminoácidos, incluidos aminoácidos esenciales y péptidos de bajo peso molecular Es ampliamente utilizado como suplemento para medios de cultivo microbiológicos, ya que sirve como un hidrolizado nutritivo, posee nutrientes como calcio (0.023%) magnesio (0,013%), potasio (0,25%) y sodio (1,40%)<sup>130</sup>.

<sup>129</sup> GRISP Research Solution. Tryptone. [Electronic(1)]. Porto, Portugal. [Consultado el 15 de Noviembre2017]. Disponible en: <http://www.grisp.pt/docs/gcm23-tryptone.pdf>

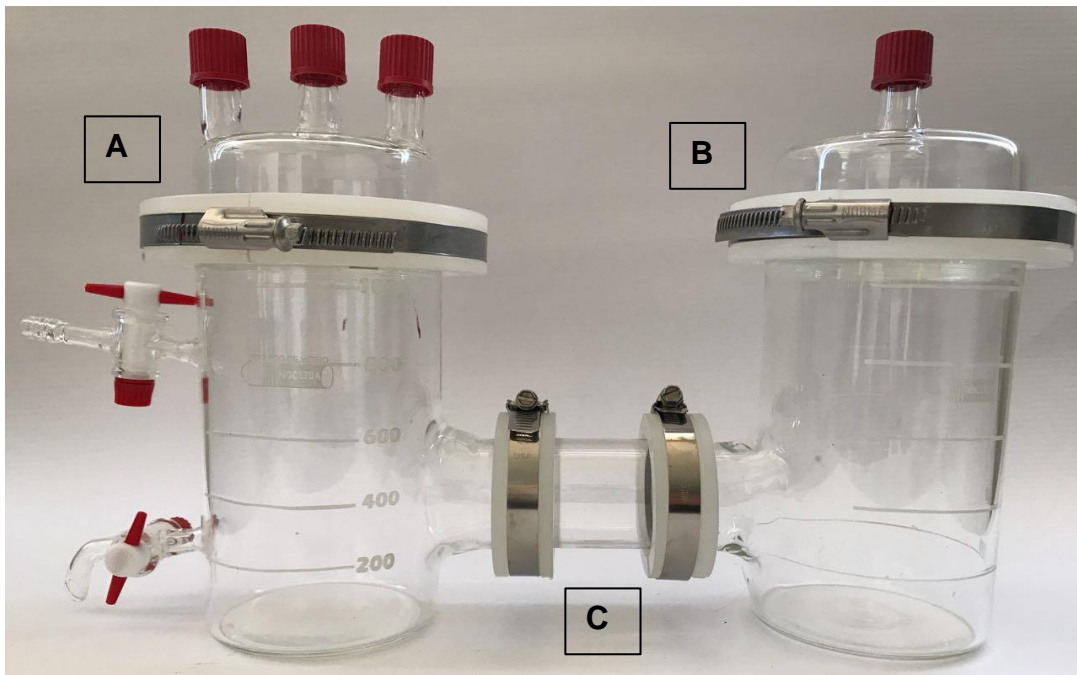
<sup>130</sup> GRISP Research Solution. Bacteriological Peptone. [Print(0)]. Porto, Portugal. Enero 2016. [Consultado el 15 Noviembre2017]. Disponible en: <http://www.grisp.pt/docs/gcm22-bacteriological-peptone.pdf>

- La Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) representa la fuente de carbono, el fosfato dipotásico ( $KH_2PO_4$ ) aporta oxígeno, potasio y fósforo y el cloruro de sodio ( $NaCl$ ) es una de las fuentes donadoras de sodio.

El caldo de cultivo **Trypticase de soya** cumple con todos los requerimientos nutricionales en términos de micro y macronutrientes como se muestra en la tabla 4, por lo cual la selección es la más adecuada para el crecimiento y evaluación de los microorganismos para la producción de energía eléctrica en la CCM.

**3.1.6 Determinación de la configuración de la CCM.** La celda de combustible microbiana empleada para el desarrollo de la experimentación se presenta en la imagen 1. La celda se construyó según un análisis y evaluación de parámetros tales como la conductividad térmica, temperatura máxima de utilización, resistividad eléctrica, conductividad eléctrica para cámaras, conductividad eléctrica y/o resistividad eléctrica para electrodos igual que temperatura máxima de utilización, longitud de puente de intercambio y demás parámetros evaluados en el trabajo de grado titulado: “Implementación de una celda de combustible microbiana a escala laboratorio para generación de energía eléctrica” de las autoras BERMUDEZ, María y BERNAL, Erika. La celda utilizada fue construida en vidrio, cuya configuración consta de dos cámaras de un volumen total de 1 L cada una, y un volumen efectivo de 800 mL.

**Imagen 1.** Celda de combustible microbiana empleada en la experimentación



Respecto a la cámara anódica (A en la imagen 1), presenta condiciones de anaerobiosis, garantizadas por una tapa que está asegurada con abrazaderas metálicas y un sobre de anaerobiosis marca Thermo Scientific (Anexo F). Esta tapa posee 3 orificios en la parte superior con los que se pretende realizar mediciones de temperatura, voltaje y un soporte de vidrio que mantenga el sobre en la parte más alta de la cámara evitando así el contacto con el agua sintética. Dichos orificios se encuentran sellados por un tapón de silicona que no permite el paso de aire. Adicionalmente, presenta dos válvulas laterales, una de ellas, ubicada en la parte baja de la cámara anódica, se utilizará para tomar muestras de pH y de cinética de crecimiento cuando así se requiera mientras que la otra válvula será utilizada en proyectos posteriores en el grupo de investigación.

La cámara catódica (B en la imagen 1) no presenta válvulas laterales, y la tapa que la sella solo presenta un orificio por donde sale el alambre conductor que sostiene el electrodo. Los electrodos utilizados fueron placas de grafito con dimensiones de 7x4x0.8 cm, los cuales van soportados por un alambre de cobre en cada una de las cámaras.

Por último, las cámaras están conectadas entre sí a través de un puente de intercambio protónico de vidrio de 4 cm de diámetro y 10 de largo (C en la imagen 1), en cuyo interior se utilizó una mezcla de agar, cloruro de potasio (KCl) y agua que permite la transferencia de protones. Esta mezcla se solidifica y queda fija en las paredes, lo que garantiza la anaerobiosis del montaje. El montaje de la CCM junto con la preparación del inóculo se muestra en el Anexo F.

## **3.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MEDIADOR EN LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA EN LA CCM**

**3.2.1 Diseño de experimentos.** El diseño de experimentos a efectuar es un diseño factorial debido a que es más eficiente en el análisis de los factores y su influencia en la variable respuesta. En particular, para el presente trabajo es importante analizar el efecto en el voltaje respecto al uso y concentración de mediador.<sup>131</sup> Las especificaciones de este diseño son:

- Niveles: 2. Se tomaron dos niveles porque serán dos las condiciones a evaluar su efecto en la variable respuesta: 2 bacterias y 2 concentraciones del mediador elegido.
- Variables independientes: 2. Estas incluyen el tipo de bacteria, y la concentración del mediador.

---

<sup>131</sup> MONTGOMERY, Douglas. Diseño Y Análisis De Experimentos. 2da. ed. México: Limusa Wiley, 2004. p. 690

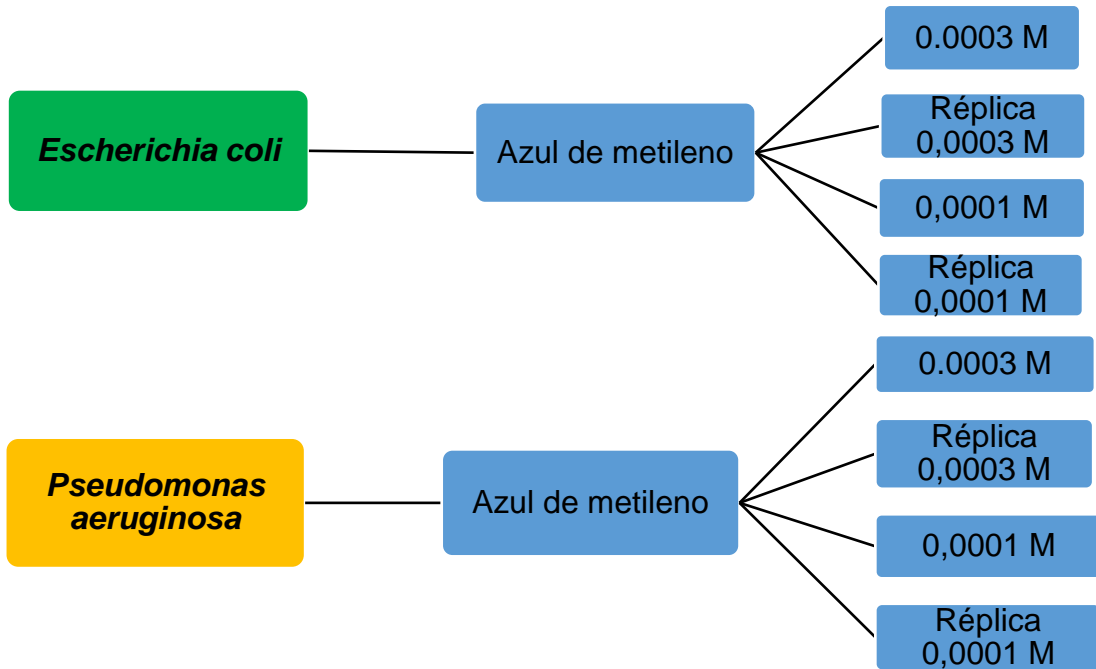
- Variables dependientes: 1. Será tomado el voltaje como única variable dependiente, pues el valor que tome este parámetro se verá directamente influenciado por el efecto de las variables independientes.
- Réplicas: 2. Se seleccionarán las dos mejores corridas de cada una de las bacterias en términos del mayor voltaje obtenido con el fin de realizar una réplica y posterior cinética de crecimiento.

El número de pruebas a realizar se determina según:

$$\text{Número de pruebas} = [(Niveles)^{\text{Variables Independientes}}] * \text{Réplicas} + 2 \text{ Blancos}$$

$$\text{Número de pruebas} = [2^2] * 2 + 2 = 10$$

Figura 8. Diseño de experimentos



Según las especificaciones establecidas al inicio de este apartado se planteó un diseño de experimentos que se muestra en la figura 8 que da inicio con cada uno de los microorganismos a emplear (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), seguido del uso del mediador seleccionado en el apartado 3.1.1 para cada bacteria, y tendrá dos concentraciones según lo establecido en el apartado 3.1.2.

**3.2.2 Ejecución de pruebas.** Basados en el diseño de experimentos seleccionado, se ejecutaron las 8 pruebas más dos pruebas realizadas en ausencia de mediador (utilizados como blancos de comparación), donde a partir de la producción de electricidad en términos de voltaje e intensidad de corriente, se seleccionó la mejor concentración de mediador para cada cepa de bacteria, y así posteriormente realizar dos pruebas adicionales con el fin de garantizar la veracidad de los resultados, y además permita construir la cinética de crecimiento correspondiente.

**3.2.2.1 Preparación del inóculo.** Para realizar la experimentación, debemos realizar la preparación del inóculo, para lo cual se utilizó el estándar de turbidez de McFarland, que es utilizado para ajustar la concentración de microorganismos en una suspensión líquida, comparando visualmente la turbidez del inóculo con la turbidez del patrón seleccionado. Estos patrones son preparados adicionando Cloruro de Bario ( $BaCl_2$ ) a una solución de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) para obtener un precipitado de sulfato de bario ( $BaSO_4$ )<sup>132</sup>

**Figura 9.** Preparación de patrones de McFarland y su equivalencia en número de bacterias.

Standard no.	Vol (ml)		No. of bacteria/ml ( $10^8$ ) represented
	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.175%)	$H_2SO_4$ (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

FUENTE: GARCIA, Lynne y ISENBERG, Henry. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3 ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. p. 942

El patrón seleccionado fue el patrón # 2, por lo que el número de bacterias inoculadas será de aproximadamente  $6 \times 10^8$  UFC/ml, posteriormente, se realizan las comparaciones hasta obtener la misma turbidez del patrón seleccionado. Parte del diagrama se lista en el Anexo F.

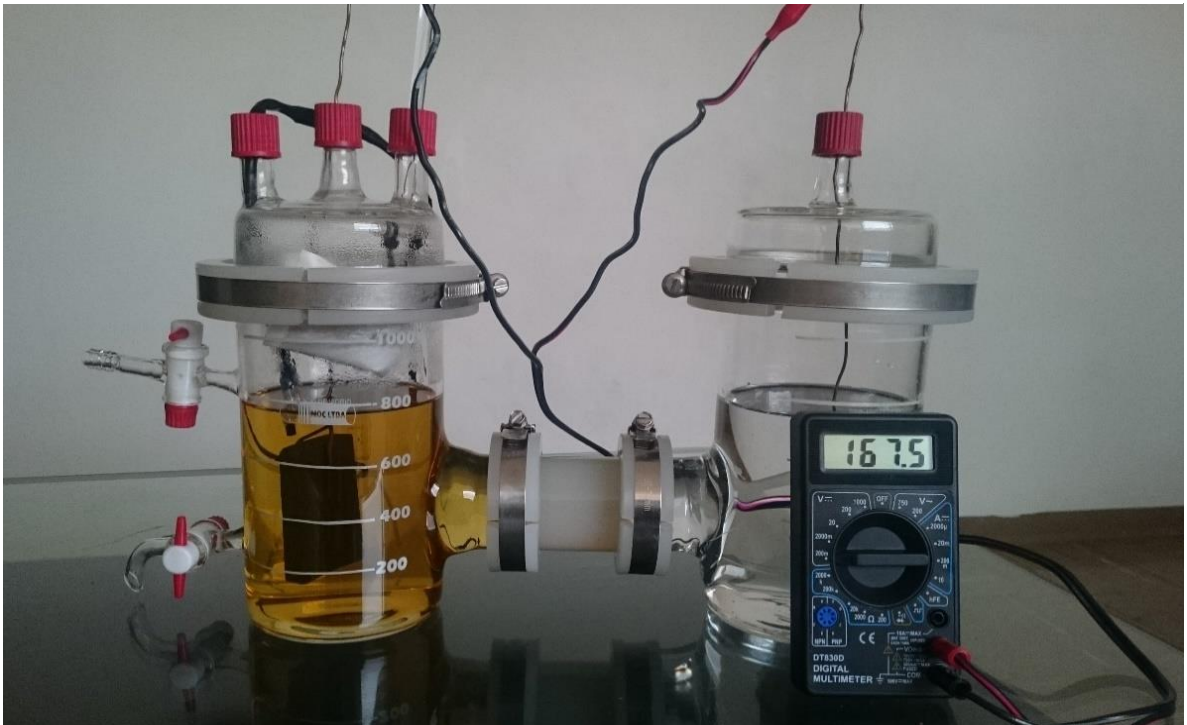
<sup>132</sup> GARCIA, Lynne y ISENBERG, Henry. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3 ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. p. 2701



### 3.2.2.2 Pruebas experimentales *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Inicialmente se desarrollaron las pruebas con *Escherichia coli* correspondientes a cada una de las concentraciones seleccionadas de azul de metileno y el blanco de comparación equivalente a esta cepa en ausencia de mediador. La duración de cada corrida experimental fue de 30 horas, en las cuales se monitoreó la temperatura y pH para garantizar el correcto funcionamiento de la celda, y adicionalmente, se realizaron mediciones de voltaje e intensidad, con los cuales se analizará el efecto de la concentración de mediador en la producción de energía. El montaje correspondiente se presenta en la imagen 2.

**Imagen 2.** Montaje de la celda de combustible microbiana al momento de iniciar las pruebas.



Los datos obtenidos durante cada prueba se muestran en el Anexo G, los datos promedio de cada prueba y el valor máximo obtenido durante cada una de ellas se muestran a continuación.

**Tabla 5.** Datos obtenidos para las pruebas realizadas con *Escherichia coli* y Azul de metileno

Prueba	Bacteria	Concentración de Mediador (M)	Voltaje promedio (mV)	Intensidad promedio ( $\mu$ A)	Voltaje máximo (mV)	Intensidad máxima ( $\mu$ A)
1	<i>E. coli</i>	0,0001	211,68	83,91	299	134
2	<i>E. coli</i>	0,0001	188,55	126,18	258	168
3	<b><i>E. coli</i></b>	<b>0,0003</b>	<b>331,51</b>	<b>107,91</b>	<b>416</b>	<b>166</b>
4	<b><i>E. coli</i></b>	<b>0,0003</b>	<b>338,54</b>	<b>173,27</b>	<b>447</b>	<b>241</b>
5	<i>E. coli</i>	-	185,44	90,64	241	104

Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando esta vez *Pseudomonas aeruginosa* con las mismas concentraciones de azul de metileno previamente seleccionadas, y el blanco de comparación. Los datos obtenidos en cada prueba se muestran en el Anexo H, los datos promedio junto con el valor máximo de los mismos se muestran a continuación en la tabla 6.

**Tabla 6.** Datos obtenidos para las pruebas realizadas con *Pseudomonas aeruginosa* y Azul de metileno

Prueba	Bacteria	Concentración de Mediador (M)	Voltaje promedio (mV)	Intensidad promedio ( $\mu$ A)	Voltaje máximo (mV)	Intensidad máxima ( $\mu$ A)
6	<i>P. aeruginosa</i>	0,0001	297,93	453,18	362	601
7	<i>P. aeruginosa</i>	0,0001	380,84	197,91	507	301
8	<i>P. aeruginosa</i>	0,0003	308,12	208,27	403	321
9	<i>P. aeruginosa</i>	0,0003	277,15	153,64	354	242
10	<i>P. aeruginosa</i>	-	294,17	257,82	404	383

**3.2.2.3 Estimación de parámetros para la evaluación de la energía eléctrica producida y muestra de cálculo.** Una vez desarrolladas las 10 pruebas correspondientes con la *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se realizó la determinación de parámetros que permiten obtener la cantidad de energía producida por la celda de combustible microbiana en términos de potencia, densidad de corriente, densidad de potencia y potencia volumétrica basados en los valores promedio de voltaje e intensidad.

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos y en seguida se muestra el modelo de cálculo correspondiente a la prueba No.1.

**Tabla 7.** Parámetros para la evaluación de energía durante las 10 pruebas

Pruebas	Voltaje promedio (V)	Intensidad promedio (A)	Potencia (W)	Densidad de corriente (A/m <sup>2</sup> )	Densidad de potencia (W/m <sup>2</sup> )	Potencia volumétrica (W/m <sup>3</sup> )
1	0,2117	8,391,E-05	1,776,E-05	0,0111	0,0024	0,7709
2	0,1885	1,262,E-04	2,379,E-05	0,0167	0,0032	1,0326
3	0,3315	1,079,E-04	3,577,E-05	0,0143	0,0047	1,5526
4	0,3385	1,733,E-04	5,866,E-05	0,0229	0,0078	2,5460
5	0,1854	9,064,E-05	1,681,E-05	0,0120	0,0022	0,7295
6	0,2979	4,532,E-04	1,350,E-04	0,0600	0,0179	5,8600
7	0,3808	1,979,E-04	7,537,E-05	0,0262	0,0100	3,2713
8	0,3081	2,083,E-04	6,417,E-05	0,0276	0,0085	2,7853
9	0,2772	1,536,E-04	4,258,E-05	0,0203	0,0056	1,8481
10	0,2942	2,578,E-04	7,584,E-05	0,0341	0,0100	3,2918

### Muestra de cálculo prueba No.1.

Según el apartado 1.1.1. donde se presentan los indicadores que indican el desempeño de una CCM y sus respectivas ecuaciones, se procedieron a evaluar dichos parámetros como sigue a continuación:

- Potencia

$$P = V * I$$

$$P = 0,21168 V * 8,39091 \times 10^{-5} A$$

$$P = 1,77620 \times 10^{-5} W$$

- Densidad de corriente: Según el apartado 3.1.5, donde se mencionan las dimensiones de cada electrodo, el área correspondiente es igual a 0,0075520 m<sup>2</sup>.

$$J = \frac{I}{a}$$

$$J = \frac{8,39091 \times 10^{-5} A}{0,0075520 \text{ m}^2}$$

$$J = 0,01111 \frac{A}{m^2}$$

- Densidad de potencia

$$DP = \frac{P}{a}$$

$$DP = \frac{1,77620 \times 10^{-5} W}{0,0075520 m^2}$$

$$DP = 0,00235 \frac{W}{m^2}$$

- Potencia volumétrica: Según el apartado 3.1.5, el volumen correspondiente a los electrodos de grafito empleados es igual a 0,00002304 m<sup>3</sup>.

$$P_v = \frac{P}{V}$$

$$P_v = \frac{1,77620 \times 10^{-5} W}{0,00002304 m^3}$$

$$P_v = 0,77092 \frac{W}{m^3}$$

**3.2.2.4 Mejores resultados durante las 10 pruebas en la CCM.** A partir de los datos obtenidos durante cada prueba presentados en los anexos G y H, y los valores presentados en la tabla 8 donde se obtienen los valores promedio de intensidad y voltaje, se realizó adicionalmente un valor promedio entre cada prueba y su réplica con el fin de poder evidenciar de manera más clara que condición es aquella que favorece la mejor producción de electricidad para cada cepa.

**Tabla 8.** Valores promedio entre las pruebas y sus réplicas.

Prueba	Concentración de Mediador (M)	Voltaje promedio (V)	Intensidad promedio (A)	Potencia (W)	Densidad de corriente (A/m <sup>2</sup> )	Densidad de potencia (W/m <sup>2</sup> )	Potencia volumétrica (W/m <sup>3</sup> )
1,2	0,0001	0,20011	0,00011	2,1021E-05	0,01391	2,78E-03	0,91237
3,4	0,0003	0,33502	0,00014	4,7101E-05	0,01862	6,24E-03	2,04432
6,7	0,0001	0,33938	0,00033	1,1,E-04	0,04311	1,46E-02	4,79532
8,9	0,0003	0,29264	0,00018	5,2954E-05	0,02396	7,01E-03	2,29835

Según la tabla 8 se puede observar el comportamiento para las 2 cepas según la concentración de mediador empleada. Para la *Escherichia coli* bajo una concentración de  $3 \times 10^{-4}$  M de azul de metileno (Pruebas 3 y 4), así como para la *Pseudomonas aeruginosa* bajo una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M (Pruebas 6 y 7) se presentó la mejor producción de energía eléctrica en términos de los indicadores que expresan el desempeño de la CCM.

Se observó que una concentración más alta de mediador no implica una mayor producción de electricidad en las 2 cepas. En el caso de la *Escherichia coli* la mayor concentración de azul de metileno implicó el mayor voltaje al igual que los demás parámetros, corroborando así la información encontrada y revisada en la literatura.<sup>133,134,135,136,137</sup>

Caso contrario con la *Pseudomonas aeruginosa* donde la menor concentración favoreció que los parámetros de desempeño fueran más altos, pese a que no se encuentra explícitamente el uso de ciertas concentraciones de mediador con esta cepa, se puede pensar que al ser un microorganismo electrogénico que por sí mismo está en la capacidad de producir sus mediadores, sólo en pequeñas cantidades puede llegar a favorecer las condiciones para que se produzca mayores

<sup>133</sup> DE OLIVEIRA, Helinando, et al. Development of low cost microbial fuel cell based on *Escherichia coli*. En: IEEE International Conference on Nanotechnology. Julio 2015. vol. 15, p. 940

<sup>134</sup> RAHIMNEJAD, Mostafa, et al. Investigation of different mediators in microbial fuel cell with cyclic voltammeter. En: Pakistan Journal of Biotechnology. Enero 2013. vol. 10, no. 2, p. 37-51

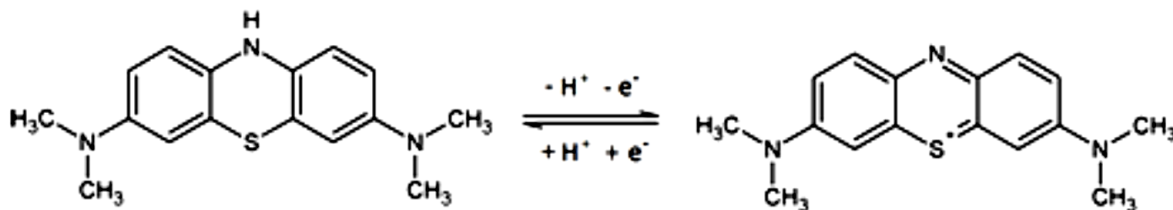
<sup>135</sup> REZA, Mohammad, et al. Kinetics investigation of diversity cultures of *E. coli* and *Shewanella sp.*, and their combined effect with mediator on MFC performance. *Op. Cit.*

<sup>136</sup> XI, Ming-yue y SUN, Yan-ping. Preliminary Study on *E. coli* Microbial Fuel Cell and On-electrode Taming of the Biocatalyst. En: The Chinese Journal of Process Engineering. Diciembre 2008. vol. 8, no. 6, p. 1179-1184

<sup>137</sup> SUGNAUX, Marc, et al. Probing electron transfer with *Escherichia coli*: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: Bioresource Technology. November 2013. vol. 148, p. 567-573

voltajes pues a medida que se vaya aumentando la concentración de mediador, es posible que la producción energética no mejore como se espera al inhibir los mediadores endógenos.

**Figura 10.** Reacción de oxidación-reducción para el azul de metileno



FUENTE: ZUHRI,Fachryan, et al. Effect of methylene blue addition as a redox mediator on performance of microbial desalination cell by utilizing tempe wastewater. En: International Journal of Technology. vol. 6, p. 952-96

En la figura 10 se ilustra la reacción reversible del azul de metileno como mediador redox en la CCM. Los electrones procedentes de la cadena transportadora del microorganismo son captados por el azul de metileno en su forma oxidada, una vez ocurre esta captación cambia el mediador a una forma reducida. Posteriormente, la forma reducida se oxida nuevamente en el ánodo para retornar a su forma oxidada. Esto es utilizado como fuerza motriz para el transporte de iones entre la bacteria y el electrodo debido a la diferencia de concentraciones iónicas.<sup>138</sup>

Estos compuestos usan la diferencia de energía entre el donador y aceptor de electrones, lo que promueve la formación de un gradiente de iones a través de la membrana. Este gradiente ayuda en la síntesis de ATP partiendo de ADP, transformando así la diferencia de potencial eléctrico en energía química.<sup>139</sup>

Entendiendo que el uso de mediador favorece la producción de energía eléctrica en la celda, los resultados obtenidos son satisfactorios, debido a que en las pruebas donde este parámetro no fue evaluado, presentan un menor voltaje en comparación con aquellas en las cuales se utilizó azul de metileno.

**3.2.2.5 Réplicas de las pruebas con los mejores resultados en términos de producción de electricidad.** Establecida la concentración adecuada para cada cepa, se realizaron las 2 pruebas con estas condiciones con el objetivo de evidenciar los mejores resultados en términos de la variable respuesta y el

<sup>138</sup> ZUHRI Op. Cit.

<sup>139</sup> KUMAR,Ravinder; SINGH,Lakhveer y ZULARISAM,A. W. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. April 2016. vol. 56, p. 1322-1336

comportamiento de las condiciones de operación mencionadas en los apartados 2.1.2 y 2.1.3. como lo son el pH y la temperatura durante las 30 horas. Los resultados de las réplicas de las pruebas con los mejores resultados en términos de voltaje se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados experimentales de las mejores pruebas para cada cepa

Mejores pruebas	Concentración de Mediador (M)	Voltaje promedio (V)	Intensidad promedio (A)	Potencia (W)	Densidad de corriente (A/m <sup>2</sup> )	Densidad de potencia (W/m <sup>2</sup> )	Potencia volumétrica (W/m <sup>3</sup> )
<i>Escherichia coli</i>	0,0003	0,41427	0,00022	0,00009	0,02918	0,01209	3,96227
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0001	0,41712	0,00027	0,00011	0,03563	0,01486	4,87165

Una vez obtenidos los valores promedio de los parámetros de desempeño en términos de producción de electricidad se procedió a comparar con los resultados presentados en la literatura. Ver tabla 10.

**Tabla 10.** Valores de voltaje promedio y densidad de potencia reportados en la literatura

Referencia	Concentración de MB (M)	Voltaje promedio (V)	Densidad de potencia (W/m <sup>2</sup> )
140	3,00E-04	0,886	0,00448
	-	0,689	0,00212
	1,00E-04	-	0,022
141	3,00E-04	-	0,036
	-	-	0,0179
	4,00E-04	0,447	0,094
142	-	0,243	0,005
	3,00E-04	0,464	0,00398
143	-	0,268	0,000546

En comparación con los valores registrados en la literatura, se obtuvieron valores de voltaje promedio, y densidad de potencia similares mediante el uso de la celda de combustible microbiana utilizando azul de metileno en concentraciones de 0,0001 M y 0,0003 M. En el caso de la densidad de potencia, este parámetro presentó muy buenos resultados en comparación con las referencias bibliográficas, convirtiéndose así en un buen indicador acerca de las condiciones sobre las cuales se llevó a cabo la experimentación realizada pues generalmente cuando evalúan el

<sup>140</sup> PERMANA Op. Cit.

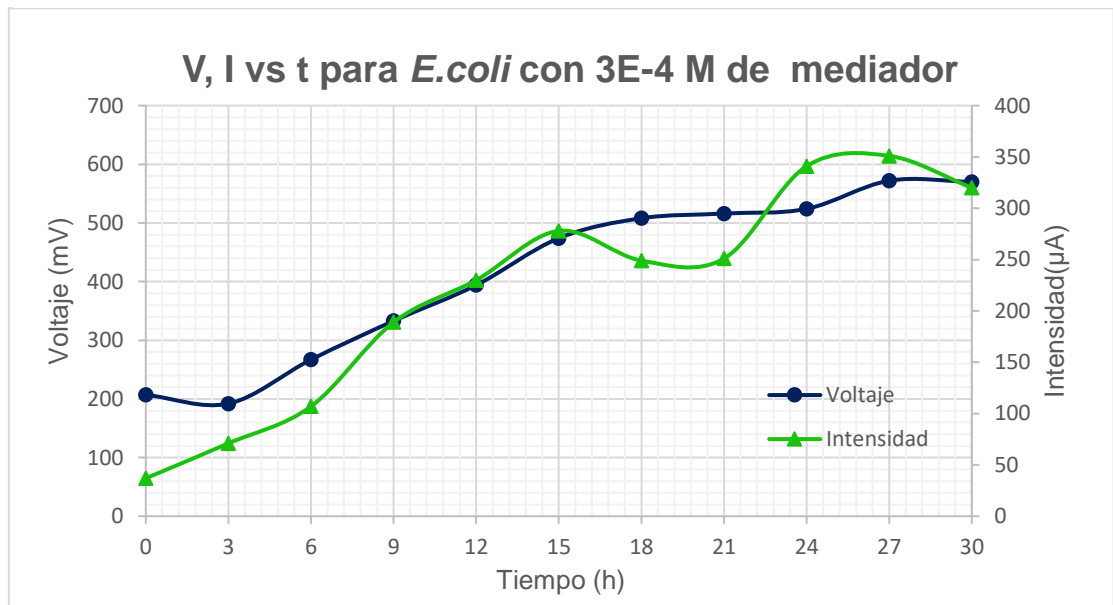
<sup>141</sup> TASKAN Op. Cit.

<sup>142</sup> NAJAFPOUR Op. Cit.

<sup>143</sup> MEDINA Op. Cit.

desempeño de la CCM uno de los parámetros con el que empiezan el análisis es precisamente con la densidad de potencia. El valor listado en la referencia “138” difiere un poco en términos de voltaje promedio, esto debido a que las condiciones de operación de la CCM son distintas, pues se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, una membrana de intercambio PEM conocida como SPEEK, y electrodos de cobre.<sup>144</sup>

**Gráfico 1.** Comportamiento del voltaje e intensidad de corriente a través del tiempo para *Escherichia coli*



En el gráfico 1 se presenta el comportamiento del voltaje e intensidad durante las 30 horas, donde se mantiene una tendencia similar entre estos parámetros, observando entre la hora 15 y 21 una disminución en los valores de intensidad mientras el voltaje sigue aumentando sin presentar cambios en su comportamiento. Una de las posibles razones fue que en este intervalo hubo una ligera disminución en la temperatura, generando una perturbación que afectó la intensidad de corriente.

Desde el punto de vista de la morfología de la *E. coli*, este microorganismo posee cuatro clases de antígenos, dentro de los cuales se encuentra el antígeno K, correspondiente al polisacárido de tipo capsular que envuelve a la bacteria, encargado de la protección de la bacteria y es posible que pueda llegar limitar el

<sup>144</sup> PERMANA Op. Cit.

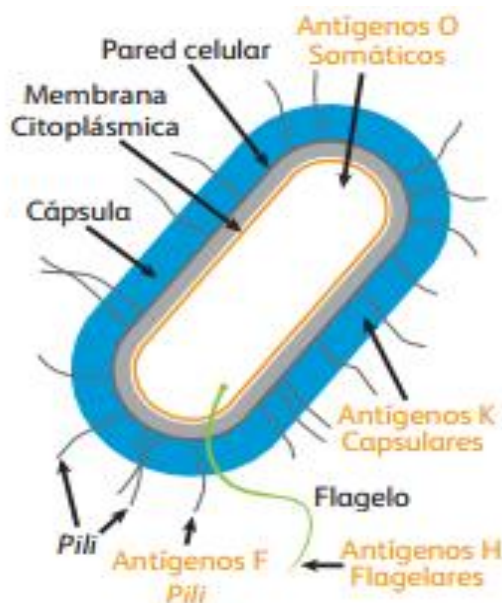


número de electrones que atraviesan la membrana celular hacia al exterior.<sup>145,146</sup>

La membrana celular externa de la *Escherichia coli* no contiene proteínas de membrana conductora o redox, siendo las porinas el único contacto que tiene el microorganismo hacia el exterior en términos del intercambio de pequeñas moléculas y el transporte de electrones. Cuando una porina está en contacto con el electrodo y están presentes en mayor cantidad, favorece una transferencia de electrones más elevada.

En este caso, pudo pasar que el número de porinas presentes en la cepa no fue lo suficientemente alto para obtener valores de intensidad en aumento o que no estaban haciendo un buen contacto con el electrodo.<sup>147</sup> Se verificó que efectivamente la concentración más alta de mediador elegida para la experimentación favoreció la producción de electricidad.

**Figura 11.** Estructura antigénica *Escherichia coli*



FUENTE: PFIZER. Reseña de *Escherichia coli*. Disponible en: [http://wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/ecoli.pdf](http://wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/ecoli.pdf)

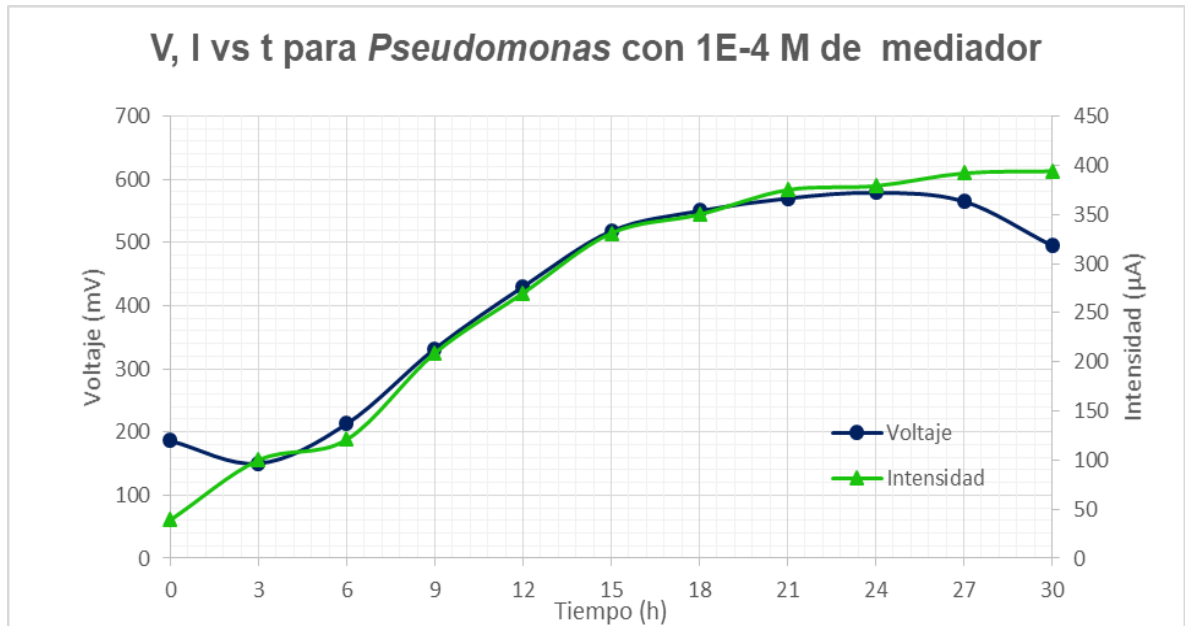
<sup>145</sup> MOLINA, Jose. Factores de patogenicidad bacteriana. [Print(0)]. [Consultado el 28 de noviembre 2017]. Disponible en:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>

<sup>146</sup> DONNENBERG, Michael. *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. En: Academic Press. p. 417

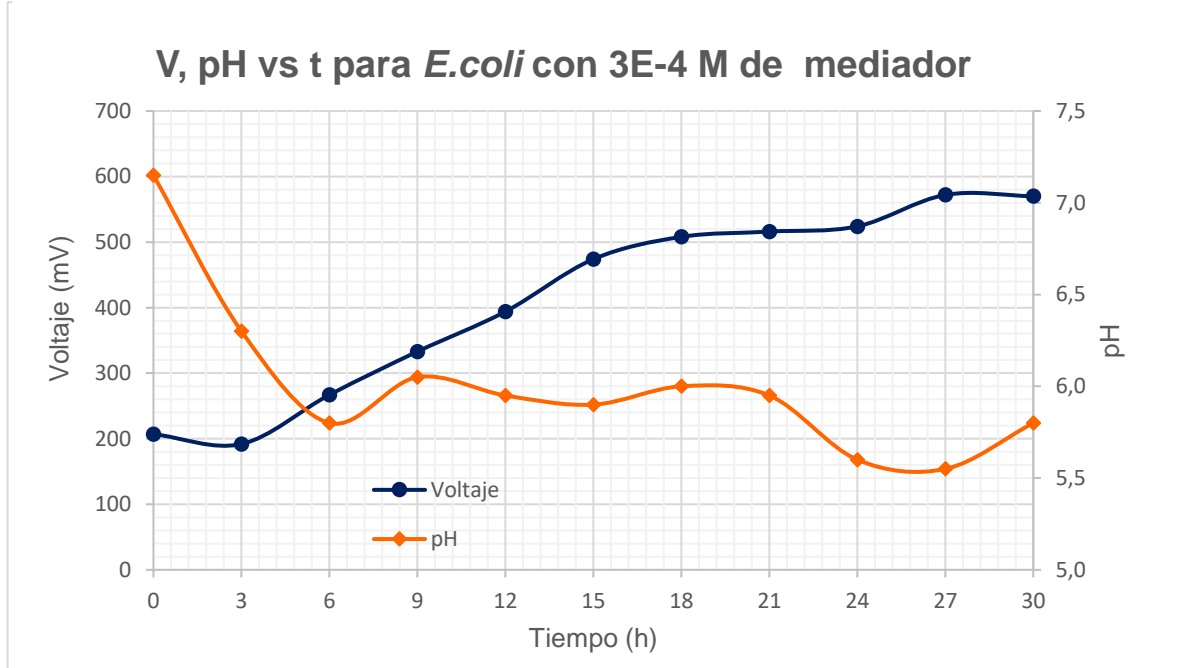
<sup>147</sup> SUGNAUX, Marc, et al. Probing electron transfer with *Escherichia coli*: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: *Bioresource Technology*. November 2013. vol. 148, p. 567-573

**Gráfico 2.** Comportamiento del voltaje e intensidad de corriente a través del tiempo para *Pseudomonas aeruginosa*



En el gráfico 2 se presenta un comportamiento bastante similar al obtenido con la *E. coli* con la diferencia que la intensidad mostró un comportamiento más estable junto con el voltaje. En esta prueba pudo ser posible que las perturbaciones fueron lo suficientemente pequeñas para no ejercer variaciones en las variables respuesta. Se verificó en comparación con las 10 pruebas iniciales que el efecto de la concentración más baja de mediador llevó a obtener valores de voltaje e intensidad significativamente altos y que no llegó a inhibir los mediadores endógenos que produce esta cepa en concreto.

**Gráfico 3.** Comportamiento del voltaje y pH a través del tiempo para *Escherichia coli*

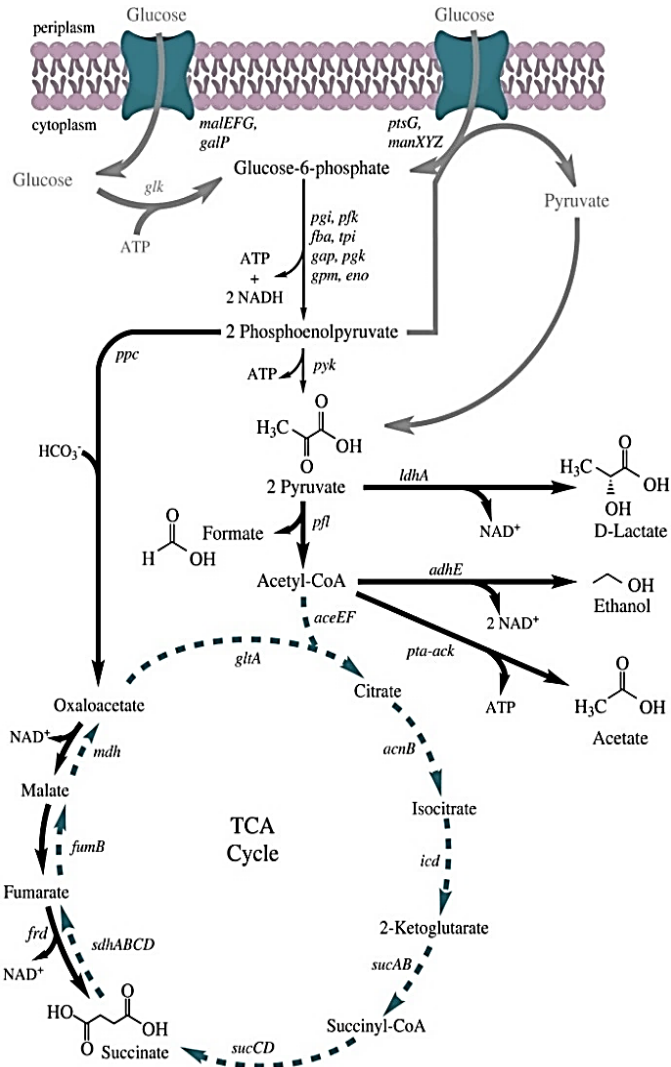


Según el gráfico 3 se presenta una relación inversa entre el voltaje producido y el pH del medio presente en la cámara anódica en relación al tiempo. El incremento en los niveles de acidez en el agua residual sintética puede dar razón en el transporte de electrones propio de la fosforilación oxidativa, donde al bombear iones hidrógeno hacia el exterior de la membrana celular. Adicionalmente, en el proceso de fermentación anaerobia propio de la *Escherichia coli* (ver figura 12) se lleva a cabo la producción de ATP y ácidos mixtos (ácido acético, ácido láctico, ácido butírico, ácido fórmico y ácido propiónico) que pueden reducir el valor del pH. Otro proceso a nivel celular mediante el cual se obtiene la producción de ácidos es la glucólisis con la obtención de ácido pirúvico.<sup>148</sup>

Se determinó que la acidificación del medio no afectó en la producción de electricidad a lo largo de las 30 horas para la *E. coli*.

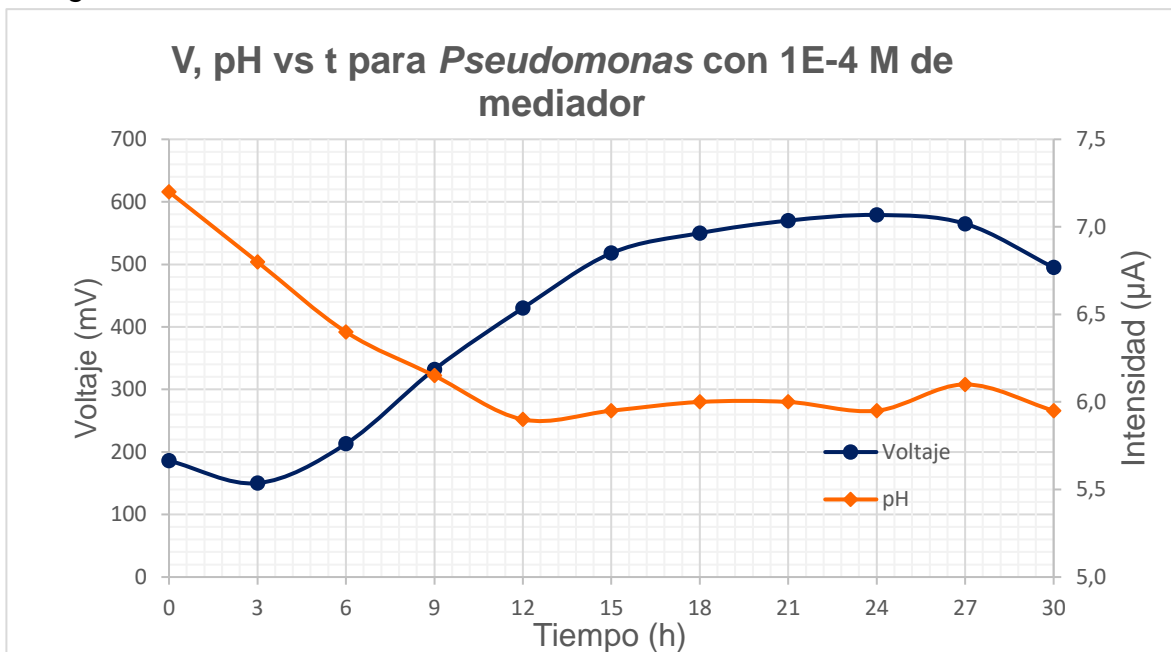
<sup>148</sup> FORSTER, Andreas y GESCHR, Johannes. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. En: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. vol. 2, p. 3

**Figura 12. Fermentación anaeróbica en *E.coli***



FUENTE: FORSTER, Andreas y GESCHR, Johannes. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. En: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. vol. 2, p. 3

**Gráfico 4.** Comportamiento del voltaje y pH a través del tiempo para *Pseudomonas aeruginosa*



Para la *Pseudomonas aeruginosa* se presenta en el gráfico 4 la relación inversa entre el voltaje producido y el pH de la cámara anódica durante las 30 horas, como ocurrió en su momento con la *E. coli*. Este comportamiento es explicado debido al proceso de glucólisis, la producción de ácidos mixtos durante la degradación de la glucosa a piruvato. Se determinó que el nivel de acidez en el medio no interfirió en la producción de energía eléctrica.

**3.2.2.6 Análisis ANOVA de un solo factor.** Basados en los resultados obtenidos en las réplicas de las pruebas que favorecieron la producción de energía eléctrica, se evaluó si existía diferencia significativa entre los voltajes obtenidos según el microorganismo empleado.

Para desarrollar este modelo se analiza como único factor el tipo de microorganismo utilizado, denotados con el subíndice 1 aquellos datos relacionados con la *Escherichia coli* y con el subíndice 2 a la *Pseudomonas aeruginosa*.

Inicialmente se plantean las hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$  No hay diferencia significativa entre el voltaje para cada cepa

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$  Hay diferencia significativa entre el voltaje para cada cepa

Se asignó un nivel de significancia de 0,05.

**Tabla 11.** Resultados del voltaje obtenido en las réplicas de las mejores pruebas

<b>Voltaje <i>E. coli</i> (1)</b>	<b>Voltaje <i>Pseudomonas</i> (2)</b>
207	186,1
192	150,2
267	213
333	332
394	430
474	518
508	550
516	570
524	579
572	565
570	495

El valor de n, relaciona el número de filas en los datos presentes y el valor de K es igual al número de columnas. Así n es igual a 11 y K a 2.

N representa el número total de datos correspondiente al producto entre n y K. N es igual a 22.

A partir de los datos de la tabla 11, se calcula los  $Y_i$  y  $Y_{i..}$  equivalentes a  $Y_{1.}=4350$ ,  $Y_{2.}=4588,3$  y  $Y_{..}=8938,3$ .

A partir de estos parámetros se construyó la tabla ANOVA, calculando las sumas de cuadrados: Suma de cuadrados totales (SCT), suma de cuadrados entre tratamientos ( $SCE_{TR}$ ) y suma de cuadrados dentro de tratamientos ( $SCD_{ER}$ ), los grados de libertad entre tratamientos, dentro de tratamientos y totales. Luego se calcularon los cuadrados medios totales ( $CM_T$ ), cuadrados medios entre tratamientos ( $CME_{TR}$ ) y cuadrados medios dentro de tratamientos ( $CMD_{ER}$ ) y finalmente se obtiene el cociente F. Este parámetro se compara con el F de tablas y a partir de ello se decidirá si se acepta o rechaza la hipótesis inicial.

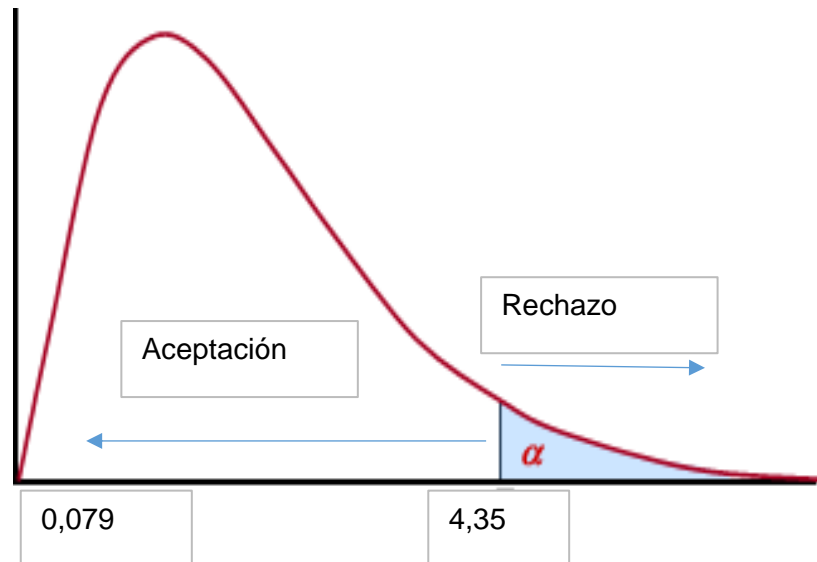
**Tabla 12.** Tabla análisis de varianza ANOVA

<b>Fuentes variación</b>	<b>Sumas cuadrados</b>	<b>Grados libertad</b>	<b>Cuadrados medios</b>
Entre horas	2581,222273	1	2581,222273
Dentro horas (ER)	651593,6236	20	32579,68118
Total	654174,8459	21	31151,18314

Cociente  $F_c = 0,079$

$$F_{[0,05;1;20]} = 4,35$$

**Imagen 3.** Zonas de aceptación y rechazo de la hipótesis planteada



Se llega a la conclusión de que no hay diferencia significativa entre los voltajes obtenidos según la cepa empleada, pues el parámetro  $F_c$  se encuentra en la zona de aceptación según la imagen 3.

### 3.3 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS UTILIZADAS EN FUNCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA

Para la realización de la curva de crecimiento correspondiente para las dos bacterias, se seleccionaron las pruebas para las que se obtuvieron los mejores resultados en términos de producción de energía eléctrica (tabla 9), para las cuales se realizó la toma de 2 mL de muestra cada 3 horas durante un total de 30 horas.

**3.3.1 Cinética de crecimiento.** Una vez se tomaron las 11 muestras, estas se llevaron a refrigeración para evitar que los microorganismos presentes en estas sigan creciendo. A continuación, se realizaron una serie de diluciones seriadas base 10, para cada una de las muestras extraídas durante el proceso para ambas bacterias y posterior a ello se llevó a cabo la siembra en superficie ilustrada en la figura 11, con el fin de realizar el conteo en placa. El Anexo J ilustra la preparación de las diluciones y el recuento en placa

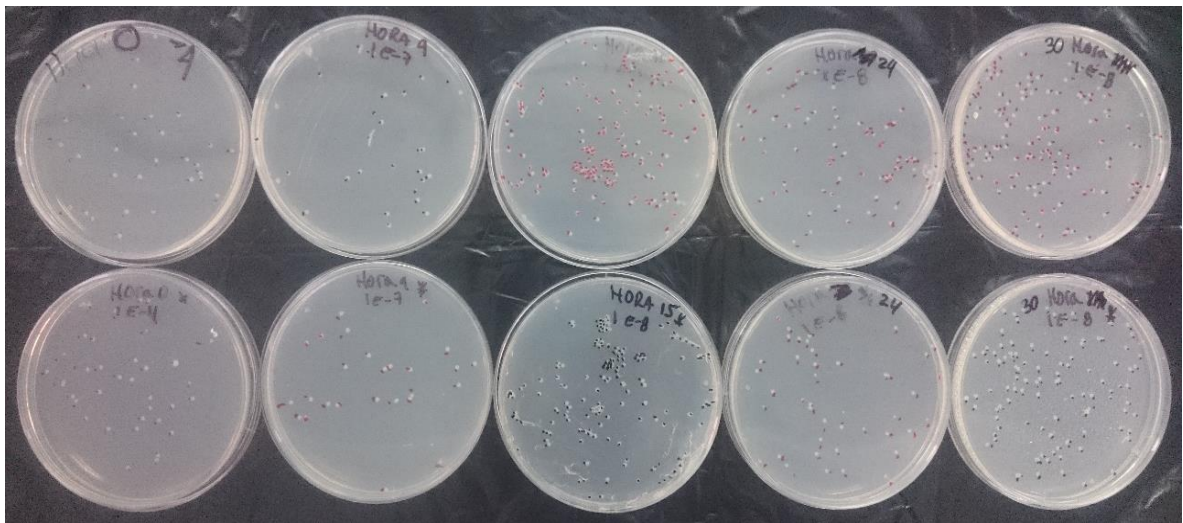
**Figura 13.** Método de recuento en placa



FUENTE: MADIGAN,Michael; MARTINKO,John y PARKER,Jack. Brock Biología De Los Microorganismos. 12 ed. España: Pearson, 2009. p. 169

**3.3.1.1 Construcción de curvas de crecimiento microbiano.** Para la construcción de la curva de crecimiento, en primera instancia se parte del conteo en placa realizado, con su correspondiente dilución; donde se procede a realizar la gráfica del logaritmo base 10 de las unidades formadoras de colonia por cada ml de muestra. Los datos se muestran en las tablas 13 y 14.

**Imagen 4.** Siembra en superficie hora 0, hora 9, hora 15, hora 24 y hora 30 para la *Escherichia coli* en las diluciones seleccionadas

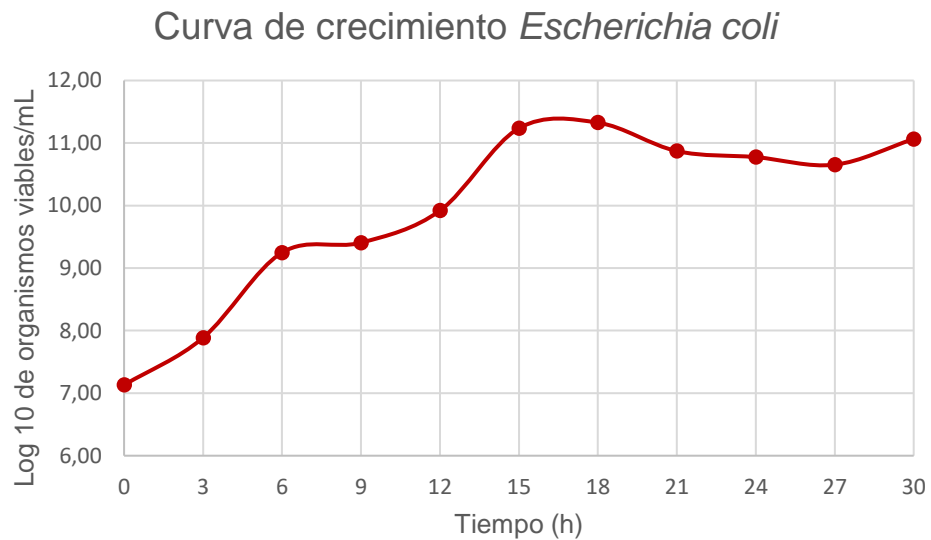




**Tabla 13.** Recuento en placa *Escherichia coli*

Hora	Dilución seleccionada	UFC	UFC/ml	Log 10
0	1,E-05	13,5	1,35,E+07	7,13
3	1,E-04	768	7,68,E+07	7,89
6	1,E-05	1769	1,77,E+09	9,25
9	1,E-07	25,5	2,55,E+09	9,41
12	1,E-07	83	8,30,E+09	9,92
15	1,E-08	172	1,72,E+11	11,24
18	1,E-08	212	2,12,E+11	11,33
21	1,E-07	743	7,43,E+10	10,87
24	1,E-08	59,5	5,95,E+10	10,77
27	1,E-08	45	4,50,E+10	10,65
30	1,E-08	116	1,16,E+11	11,06

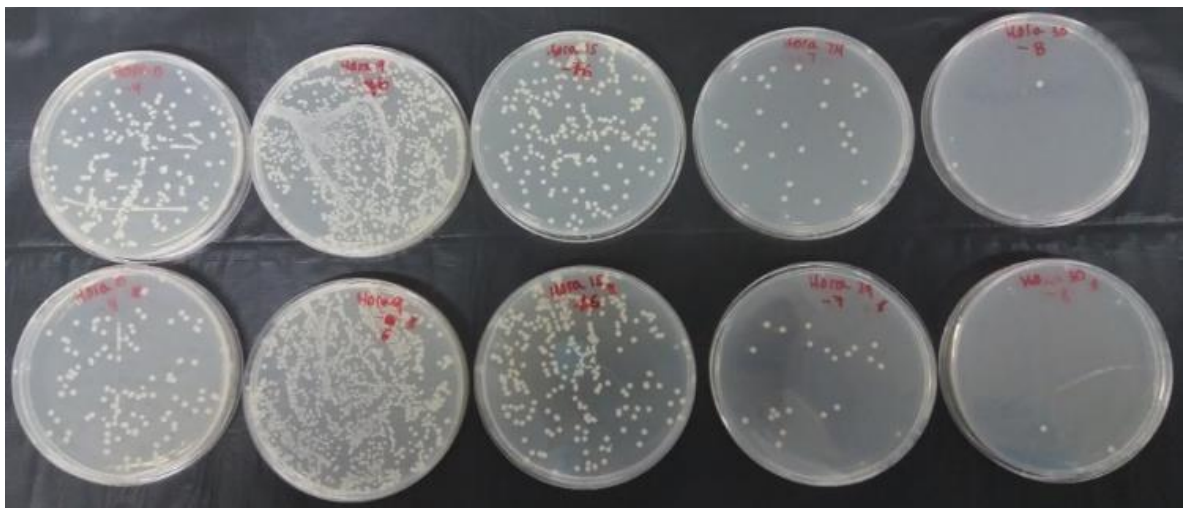
**Gráfico 5.** Curva de crecimiento de *Escherichia coli*



Según el gráfico 5, para la *Escherichia coli* se evidenció una fase de adaptación prácticamente inexistente, lo que representa que la cepa presenta una buena afinidad con el sustrato utilizado. Adicionalmente, la curva de crecimiento presenta algunos picos entre las horas 21 y 27, puede ser debido a la producción de ácidos mixtos producto de su proceso metabólico, que de alguna manera pudo afectar el crecimiento del microorganismo.

De la misma manera, entre las horas 24 y 30 pudo presentarse una fase criptica, donde los microorganismos vivos se alimentan de aquellos que han muerto y adicionalmente se denota un crecimiento continuo de la bacteria, alcanzando su duplicación máxima en la hora 18. Por último, después de 30 horas de operación no se evidencia con claridad una fase de muerte, lo cual puede representar la posibilidad de realizar una fermentación continua con el fin de suministrar más sustrato en la cámara anódica y así favorecer el crecimiento del microorganismo.

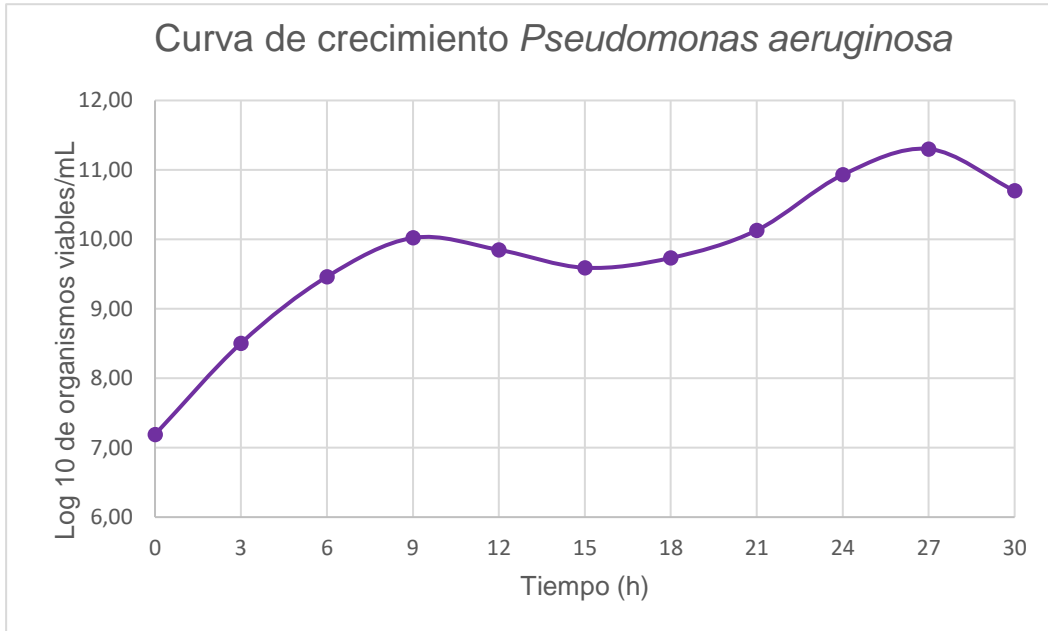
**Imagen 5.** Siembra en superficie hora 0, hora 9, hora 15, hora 24 y hora 30 para la *Pseudomonas aeruginosa* en las diluciones seleccionadas



**Tabla 14.** Recuento en placa *Pseudomonas aeruginosa*

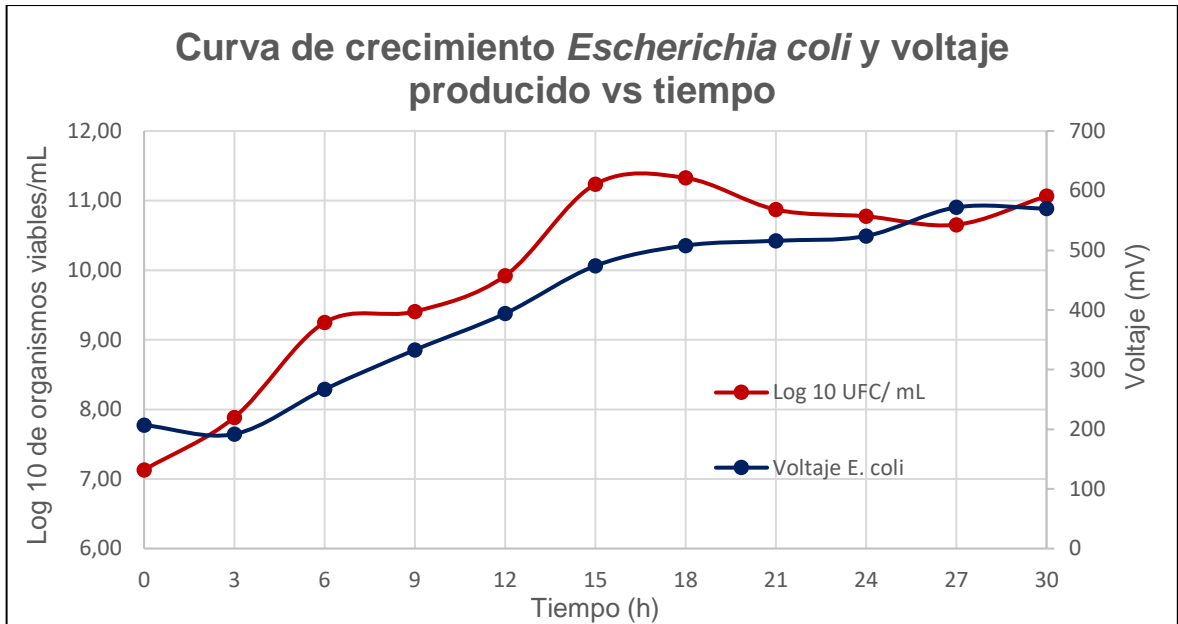
Hora	Dilución seleccionada	UFC	UFC/mL	Log 10
0	1,E-05	15,5	1,55,E+07	7,19
3	1,E-05	319,5	3,20,E+08	8,50
6	1,E-06	289,5	2,90,E+09	9,46
9	1,E-06	1050,5	1,05,E+10	10,02
12	1,E-06	707	7,07,E+09	9,85
15	1,E-07	39	3,90,E+09	9,59
18	1,E-07	54	5,40,E+09	9,73
21	1,E-08	13,5	1,35,E+10	10,13
24	1,E-09	8,5	8,50,E+10	10,93
27	1,E-10	2	2,00,E+11	11,30
30	1,E-10	0,5	5,00,E+10	10,70

**Gráfico 6.** Curva de crecimiento *Pseudomonas aeruginosa*

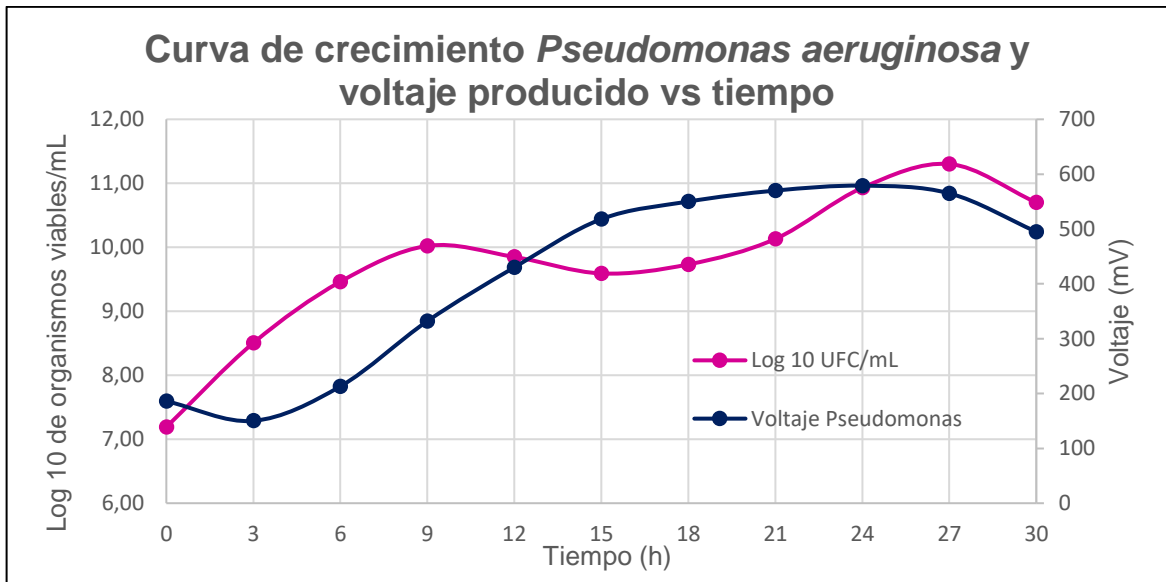


Como lo muestra el gráfico 6, para la *Pseudomonas aeruginosa* no se evidenció una fase de latencia o adaptación, iniciando directamente en fase exponencial. Esto representa que esta cepa presenta una buena afinidad por el sustrato. Entre las horas 12 y 18 se presenta una disminución en el crecimiento del microorganismo, presentándose por la posibilidad de perturbaciones en la temperatura en la que la celda operaba. Es posible evidenciar que se presenta un crecimiento constante, y alcanzó la duplicación máxima a las 27 horas. Pasadas las 30 horas no es posible evidenciar una fase de muerte.

**Gráfico 7.** Curva de crecimiento y voltaje producido durante las 30 horas para *Escherichia coli*



**Gráfico 8.** Curva de crecimiento y voltaje producido durante las 30 horas para *Pseudomonas aeruginosa*



En el gráfico 7 y 8 se puede evidenciar la relación directa entre el crecimiento del microorganismo, y la generación de energía eléctrica durante las 30 horas de pruebas en la CCM. En primera instancia, ambos gráficos aumentan el voltaje mientras los microorganismos se encuentran en la fase exponencial; en seguida, el voltaje se mantiene relativamente estable mientras se encuentran en fase estacionaria. Cabe resaltar que el descenso de voltaje reportado para ambas cepas, pudo haber sido ocasionada por perturbaciones tales como disminución o aumento de la temperatura.

**3.3.1.2 Parámetros para la evaluación del crecimiento microbiano.** A partir del apartado 2.3.1.2 se determinan los parámetros involucrados para cada una de las cepas.

- **Velocidad de crecimiento:**

Este parámetro se conoce como el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. A través de la inclinación de la curva de crecimiento en su fase exponencial, se determinó el cálculo de la pendiente de la línea recta donde se considera que el inicio de esta fase y posteriormente, donde alcanza su tasa de división máxima.

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_f) - \text{Ln}(N_0)}{t_f - t_0}$$

- ✓ **Velocidad de crecimiento para la *Escherichia coli*:** Los puntos seleccionados para esta bacteria fueron de la hora 0 hasta la hora 18, debido a que la fase exponencial inició inmediatamente.

$$\mu = \frac{(11,33) - (7,13)}{18 - 0}$$

$$\mu = 0,233 \text{ h}^{-1}$$

- ✓ **Velocidad de crecimiento para la *Pseudomonas aeruginosa*:** Los puntos seleccionados para esta bacteria fueron de la hora 0 hasta la hora 27, debido a que la fase de adaptación no es observable de la misma forma que en la cepa anteriormente descrita.

$$\mu = \frac{(11,30) - (7,19)}{27 - 0}$$

$$\mu = 0,152 \text{ h}^{-1}$$

Un aspecto a destacar es la diferencia que existe entre la velocidad de crecimiento obtenida para la *Escherichia coli* con respecto al crecimiento evidenciado por la *Pseudomonas aeruginosa*, dado que de manera gráfica se puede evidenciar que la *Escherichia coli* presenta un crecimiento máximo más rápido que la *Pseudomonas aeruginosa*, esto se corroboró debido a que la velocidad de crecimiento de la *E. coli* es 34,76% mayor que la *P. aeruginosa*. Aunque para ninguna de las bacterias se evidencia una fase de adaptación ni de muerte, la fase exponencial de la *E. coli* tiene una duración mayor; en consecuencia, de esto, la producción de energía eléctrica en la CCM se daría de manera más rápida usando esta cepa.

- **Tiempo de generación o duplicación:** Es el tiempo requerido en el cual una población de microorganismos alcanza su división máxima.

$$t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$$

- ✓ **Tiempo de duplicación para la *Escherichia coli*:**

$$t_d = \frac{\text{Ln } 2}{0,233 \text{ h}^{-1}}$$

$$t_d = 2,975 \text{ h}$$

- ✓ **Tiempo de duplicación para la *Pseudomonas aeruginosa*:**

$$t_d = \frac{\text{Ln } 2}{0,152 \text{ h}^{-1}}$$

$$t_d = 4,56 \text{ h}$$

Se pudo comprobar que la *Escherichia coli* alcanza una tasa de división máxima en un menor tiempo, es decir que su crecimiento va a ser más rápido, en comparación con la *Pseudomonas aeruginosa*. Adicionalmente, la producción de enzimas requeridas para la degradación del sustrato es más rápida en la *E. Coli* que en la *P. aeruginosa*, lo que muestra una mayor afinidad de la bacteria al sustrato.

Para comprobar esto, en la tabla 15 se listan algunas velocidades de crecimiento máximas, tiempos de duplicación para las cepas utilizadas dependiendo del sustrato utilizado.

**Tabla 15.** Velocidad de crecimiento máxima y tiempo de duplicación para las dos cepas utilizadas utilizando diferentes sustratos

Referencia	Bacteria	Sustrato	$\mu$ máx. (h <sup>-1</sup> )	t <sub>d</sub> (h)
149	<i>E. coli</i>	Hidrolizado acido de caseína, Extracto de levadura, NaCl, Glicerol, Glucosa	0,76	0,912
150	<i>E. coli</i>	Glucosa Galactosa	0,76	0,912
151	<i>E. coli</i>	Glucosa, Extracto de levadura, NaHCO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O , Peptona, KCl, Agar	0,42	1,650
152	<i>E. coli</i>	Garaetteok (torta de arroz coreana)	0,625	1,109
153	<i>P. aeruginosa</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, Extracto de levadura, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Glucosa	0,29	2,390
154,155	<i>P. aeruginosa</i>	Glucosa	0,4	1,733
156	<i>P. aeruginosa</i>	Tripticasa de soya y extracto de levadura	0,29	2,390
157	<i>P. aeruginosa</i>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , y ZnSO <sub>4</sub> Glucosa,	0,269	2,577

<sup>149</sup> POCCIAI, M. E.; BECCARIAI, A. J. y DONDO, R. G. Modeling the microbial growth of two *Escherichia coli* strains in a multi-substrate environment. En: Brazilian Journal of Chemical Engineering. Junio, 2014. vol. 31, no. 2, p. 347-354

<sup>150</sup> KOVAROVA, K.; ZEHNDER, A. J. B. y EGL, T. Temperature-Dependent Growth Kinetics of *Escherichia coli* ML 30 in Glucose-Limited Continuous Culture. En: Journal of Bacteriology. Agosto, 1996. vol. 178, no. 15, p. 4530-4539

<sup>151</sup> REZA Op. Cit.

<sup>152</sup> YOUNG PARK, Shin y HA, Sang-Do. Predictive growth model of the effects of temperature on the growth kinetics of generic *Escherichia coli* in the Korean traditional rice cake product "Garaetteok". En: Journal of Food Science and Technology. Octubre, 2017. p. 1-7

<sup>153</sup> CHEN, Suet Nee. Growth Kinetics of *Pseudomonas Aeruginosa*. Bozeman, Montana: Montana State University, 2001. p. 1-90

<sup>154</sup> BAKKE, R., et al. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms: Steady State. En: Biotechnology and Bioengineering. Marzo, 1985. vol. 26, no. 12, p. 1418-1424

<sup>155</sup> BEYENAL, Haluk; CHEN, Suet Nee y LEWANDOWSKI, Zbigniew. The double substrate growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa*. En: Enzyme and Microbial Technology. 2 January 2003. vol. 32, no. 1, p. 92-98

<sup>156</sup> ROBINSON, Joseph; TRULEAR, Michael y CHARACKLIST, William. Cellular Reproduction and Extracellular Polymer Formation by *Pseudomonas aeruginosa* in Continuous Culture. En: Biotechnology and Bioengineering. Abril, 1985. vol. 26, no. 12, p. 1409-1417

<sup>157</sup> FALLAHZADEH, V.; AHMADZADEH, M. y SHARIFI, R. Growth and pyoverdine production kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 in an experimental fermentor. En: Journal of Agricultural Technology. vol. 6, no. 1, p. 107-115

Partiendo de las velocidades de crecimiento obtenidas para la *Escherichia coli* ( $0,233 \text{ h}^{-1}$ ) y para la *Pseudomonas aeruginosa* ( $0,152 \text{ h}^{-1}$ ), comparadas con algunas listadas en la literatura y presentadas en la tabla 16, se puede evidenciar que la velocidad de crecimiento de ambas cepas en el caldo tripticasa de soya es buena. Adicionalmente, se corrobora que la velocidad de crecimiento de la *Escherichia coli* es mayor a la de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, comprobando que los valores obtenidos son lógicos y concuerdan con los estudios de la literatura.

En cuanto al tiempo de duplicación, (2,975 h para la *E. coli*, y 4,56 h para la *P. aeruginosa*), se comprobó que la *Escherichia coli* alcanza su duplicación máxima de manera más rápida que la *Pseudomonas aeruginosa*, donde los tiempos de duplicación para cada bacteria se asemejan a los reportados en la literatura. Puntualmente, el tiempo de duplicación obtenido para la *E. Coli* es un 44% mayor que el obtenido utilizando glucosa, extracto de levadura,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , peptona, KCl, y agar (1,650 h).<sup>158</sup> Hablando de la *P. aeruginosa*, el tiempo de duplicación coincide con investigaciones donde utilizan tripticasa de soya es 48% mayor (4,56 h).<sup>159</sup>

Por último, se pudo comprobar que ambas cepas presentan buena afinidad con el caldo tripticasa de soya utilizado como sustrato, siendo la *E. coli* quien presenta una afinidad mayor.

**3.3.2 Determinación parámetros de calidad del agua.** Como se ha mencionado las celdas de combustible microbianas permiten producir energía eléctrica y de manera simultánea reducir la carga orgánica presente en el sustrato a utilizar, en nuestro caso un agua residual sintética.

Se realizaron las pruebas de DQO para el agua resultante de las repeticiones tanto para la *Escherichia coli* como para la *Pseudomonas aeruginosa* en las condiciones donde se obtuvo el mayor valor de voltaje e intensidad. Las condiciones de las pruebas a utilizadas fueron:

- **Blanco:** Muestra de 500 mL de tripticasa de soya en concentración de 30 g/L, previamente pasada por un autoclave como recomienda el fabricante
- ***E. Coli:*** Muestra de 500 mL extraída de la operación de la CCM después de 30 horas, con un contenido de tripticasa de soya, azul de metileno al 0,0003 M, y el inóculo del microorganismo *Escherichia coli*
- ***P. Aeruginosa:*** Muestra de 500 mL extraída de la operación de la CCM después de 30 horas, con un contenido de tripticasa de soya, azul de metileno al 0,0001 M, y el inóculo del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*

---

<sup>158</sup> REZA Op. Cit.

<sup>159</sup> ROBINSON Op. Cit.



Mediante estas muestras, se analizará la reducción de la materia orgánica mediante la acción bacteriana en la CCM en el caldo tripticasa de soya que fue utilizado como blanco. Los resultados obtenidos (Anexo K) Se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados pruebas Demanda Química de Oxígeno

<b>Muestra</b>	<b>Contenido</b>	<b>DQO (mg/L O<sub>2</sub>)</b>
<b>1</b>	Blanco: Tripticasa de soya	23520
<b>2</b>	<i>E. Coli</i> , Tripticasa de soya, Azul de metileno 0,0003 M	20380
<b>3</b>	<i>P. aeruginosa</i> , Tripticasa de soya, Azul de metileno 0,0001 M	22510

Para desarrollar el análisis de la cantidad de materia orgánica reducida, expresada en términos de DQO, se procedió a comparar el porcentaje de reducción de cada muestra procedente del funcionamiento en la CCM (Muestras 2 y 3) con el Blanco seleccionado (Muestra 1), teniendo en cuenta que el tiempo de operación de la misma fue de 30 horas, los porcentajes de reducción de DQO se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Reducción DQO para operación de cada bacteria en CCM

<b>Muestra</b>	<b>Contenido</b>	<b>Reducción DQO (mg/L O<sub>2</sub>)</b>	<b>% Reducción DQO</b>	<b>Tiempo (Días)</b>
<b>2</b>	<i>E. Coli</i> , Tripticasa de soya, Azul de metileno 0,0003 M	3140	13,35	1,25
<b>3</b>	<i>P. aeruginosa</i> , Tripticasa de soya, Azul de metileno 0,0001 M	1010	4,29	1,25

Posteriormente, se listaron en la tabla 18 una serie de investigaciones realizadas concernientes a la disminución de la carga orgánica del sustrato en CCM, ilustrando la configuración de la celda, el porcentaje de reducción del DQO y el tiempo en días.

**Tabla 18.** Investigaciones realizadas que evidencian disminución de DQO en CCM

Referencia	Configuración MFC	% Reducción DQO	Tiempo (Días)
<sup>160</sup>	Una cámara	95%	0,25
<sup>161</sup>	Una cámara (tubular)	95%	
<sup>162</sup>	Dos cámaras Sin membrana	91%	50
<sup>163</sup>	Dos cámaras. PEM y Nafion	90%	6,7
<sup>164</sup>	Dos cámaras Puente de sal	88%	25
<sup>165</sup>	Una cámara Cátodo al aire	78%	2
<sup>166</sup>	Una cámara	77%	10
<sup>167</sup>	Una cámara	61%	36
<sup>168</sup>	4 series de dos cámaras	49%	50
<sup>169</sup>	Dos cámaras	11,43%	1

<sup>160</sup> LEDEZMA,Pablo; GREENMAN,John y IEROPOULOS,Ioannis. MFC-cascade stacks maximise COD reduction and avoid voltage reversal under adverse conditions. En: Bioresource Technology. April 2013. vol. 134, no. Supplement C, p. 158-165

<sup>161</sup> WANG,Yong-Peng, et al. Improving electricity generation and substrate removal of a MFC–SBR system through optimization of COD loading distribution. En: Biochemical Engineering Journal. 15 April 2014. vol. 85, no. Supplement C, p. 15-20

<sup>162</sup> GHANGREKAR,M. M. y SHINDE,V. B. Microbial Fuel Cell: A new approach of wastewater treatment with power generation. [Print(0)]. [Consultado el 1 de septiembre2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/228502202\\_Microbial\\_Fuel\\_Cell\\_A\\_New\\_Approach\\_of\\_Wastewater\\_Treatment\\_with\\_Power\\_Generation](https://www.researchgate.net/publication/228502202_Microbial_Fuel_Cell_A_New_Approach_of_Wastewater_Treatment_with_Power_Generation)

<sup>163</sup> LIAO,Qiang, et al. Electricity generation and COD removal of microbial fuel cells (MFCs) operated with alkaline substrates. En: International Journal of Hydrogen Energy. 11 November 2014. vol. 39, no. 33, p. 19349-19354

<sup>164</sup> SEVDA,S1 y SREEKRISHNAN,TR. - Effect of salt concentration and mediators in salt bridge microbial fuel cell for electricity generation from synthetic wastewater. En: Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering. vol. 47, no. 6, p. 878-886

<sup>165</sup>ZHANG,Xiaoyuan, et al. COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells. En: Bioresource Technology. January 2015. vol. 176, no. Supplement C, p. 23-31

<sup>166</sup> TOUACH,N., et al. Influence of the preparation method of MnO<sub>2</sub>-based cathodes on the performance of single-chamber MFCs using wastewater. En: Separation and Purification Technology. 17 October 2016. vol. 171, no. Supplement C, p. 174-181

<sup>167</sup> KIM,Taeyoung, et al. Coupling of anaerobic digester and microbial fuel cell for COD removal and ammonia recovery. En: Bioresource Technology. November 2015. vol. 195, no. Supplement C, p. 217-222

<sup>168</sup> REN,Lijiao; AHN,Yongtae y LOGAN,Bruce E. A Two-Stage Microbial Fuel Cell and Anaerobic Fluidized Bed Membrane Bioreactor (MFC-AFMBR) System for Effective Domestic Wastewater Treatment. En: Environmental Science & Technology. vol. 48, no. 7, p. 4199-4206

<sup>169</sup> MEDINA,Sergio y ZAPATA,Maria. Evaluación De La Producción De Energía Eléctrica Y Disminución De DQO En Agua Residual Sintética Mediante Celdas De Combustible Microbianas a Escala Laboratorio. Bogotá, Colombia: Universidad de América, 2017. p. 1-141

De la tabla 18 es posible analizar que después de 30 horas de operación en la celda de combustible microbiana, la cepa *Escherichia coli* fue la que obtuvo un mayor porcentaje de reducción del DQO (13,35%), con la cual fue posible reducir 3140 mg/L O<sub>2</sub>. Por otro lado, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* logró reducir 1010 mg/L O<sub>2</sub> lo que se traduce en un 4,29%, una remoción baja que permite analizar que esta cepa no logra obtener disminuciones eficientes de carga orgánica. El desempeño de la *Escherichia coli* fue satisfactorio y permite plantear la posibilidad de mayores tiempos de operación en la celda hasta obtener el mayor porcentaje de disminución de carga orgánica en el agua empleada.

Para las dos cepas cabe resaltar que comparado con los porcentajes de remoción listados en la tabla 13, el porcentaje de reducción es más bajo que estos, debido a que en estos estudios emplean montajes más robustos, configuraciones distintas (cámara sencilla, cámara sencilla tubular, cascadas de MFC, entre otros), con una PEM distinta y por tiempos de operación más largos. Sin embargo, comparado con un tiempo de operación menor (1 día) se obtuvieron mejores resultados, lo que evidencia que para un montaje de CCM similar, el tiempo de operación influye considerablemente en la reducción de DQO.

No obstante, se logró obtener una disminución de la carga orgánica presente en el agua residual sintética de manera simultánea a la producción de energía eléctrica en la celda.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo a revisiones bibliográficas y trabajos previos dentro del grupo de investigación se definieron las condiciones de operación para la celda de combustible microbiana las cuales fueron una temperatura de 37°C (+-2°C), pH inicial de 7, agua residual sintética cuya composición se basó en tripticasa de soya y la adición de azul de metileno como mediador bajo las concentraciones 0,0003 M y 0,0001 M.
- Se realizó un diseño de experimentos tipo factorial 2<sup>2</sup> con 2 réplicas donde se evaluaron diferentes concentraciones de mediador y su efecto en el voltaje obtenido. Según los resultados obtenidos en las pruebas experimentales se observó que el efecto de la concentración de mediador varía según la cepa sobre la cual actúe. Para la *Escherichia coli* los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de mediador de 0,0003 M, mientras que para la *Pseudomonas aeruginosa* fue con una concentración de 0,0001 M. Adicionalmente, A partir de un análisis de varianza ANOVA, se determinó que no hay diferencia significativa en términos del voltaje producido entre la *Escherichia coli* y la *Pseudomonas aeruginosa* haciendo uso de mediador.
- Basados en la cuantificación y cinética de crecimiento, la bacteria con mayor velocidad de crecimiento fue la *Escherichia coli* con un valor de 0,233 h<sup>-1</sup>, en comparación con la *Pseudomonas aeruginosa* el cual fue de 0,152 h<sup>-1</sup>, mostrando mayor afinidad por el sustrato por parte de la *Escherichia coli*, al no presentarse fase de adaptación. Adicionalmente con la construcción de las curvas de crecimiento para cada cepa y su respectiva producción de electricidad en términos de voltaje, se estableció que existe una relación directa entre estos dos parámetros evidenciada especialmente en la fase exponencial de ambas cepas.
- Se obtuvieron valores de DQO para muestras de agua residual sintética posteriores a las mejores pruebas de la *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, equivalentes a 20380 mg/L O<sub>2</sub> y 22510 mg/L O<sub>2</sub> respectivamente, en comparación con una muestra de agua con tripticasa de soya sin microorganismos ni mediador con un valor de 23520 mg/L O<sub>2</sub>. Se evidenció que la *Escherichia coli* logró una mayor reducción de carga orgánica con un porcentaje de 13,35%. Esto se puede comprobar con los resultados obtenidos a través de los parámetros de velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, donde la *E. coli* crece a una mayor velocidad al duplicarse en menor tiempo, degradando más rápido la carga orgánica presente en el sustrato.

## RECOMENDACIONES

Con el objetivo de profundizar en el tema de las celdas de combustible microbianas y dar continuidad a la investigación realizada se recomienda llevar a cabo proyectos teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- Realizar pruebas experimentales empleando diferentes mediadores en distintas concentraciones para evaluar el efecto que tiene la selección de estas sustancias en la producción de energía eléctrica para cada uno de los microorganismos.
- Analizar la cinética química de las reacciones electroquímicas que ocurren alrededor de los procesos dentro de la celda de combustible microbiana.
- Incrementar el tiempo de operación de la celda de combustible microbiana para evidenciar si existe una relación con la reducción de carga orgánica y además observar el comportamiento de los microorganismos durante la experimentación.
- Utilizar cultivos de bacterias mixtos para la operación en la CCM para evaluar el efecto de estas en la producción de energía eléctrica y la reducción de DQO
- Proponer un sistema de operación continuo, donde se agregue sustrato periódicamente para lograr una fermentación continua.
- Realizar pruebas experimentales utilizando agua residual caracterizada bajo las condiciones establecidas en el presente proyecto, evaluando la producción de electricidad y la reducción de carga orgánica.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALZATE,Liliana, et al. Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. En: INTERCIENCIA. Julio, 2008.vol. 33, no. 7, p. 503-509
- BAKKE,R., et al. Activity of Pseudomonas aeruginosa in Biofilms: Steady State. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. Marzo, 1985.vol. 26, no. 12, p. 1418-1424
- BERG,Jeremy; TYMOCZKO,John y STRYER,Lubert. Bioquímica. 6a. ed. Barcelona, España.: Reverté, 2007. 1026 p.
- BERMUDEZ,María y BERNAL,Erika. Implementación De Una Celda De Combustible Microbiana a Escala Laboratorio Para La Generacion De Energía Eléctrica. Bogotá, Colombia.: Fundación Universidad de América, 2017. p. 1-108.
- BEYENAL,Haluk; CHEN,Suet Nee y LEWANDOWSKI,Zbigniew. The double substrate growth kinetics of Pseudomonas aeruginosa. En: ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY. 2 January 2003.vol. 32, no. 1, p. 92-98
- BUTTI,Sai Kishore, et al. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. En: RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS. January 2016.vol. 53, p. 462-476
- Centro Virtual de Noticias Ministerio de Educación Nacional. Colombia Una Potencia En Energías Alternativas. [Electronic(1)]. [Consultado el 29 de noviembre 2017]. Disponible en: <http://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/article-117028.html>
- CHANG,Raymond. Química. 10ma. ed. Mc Graw Hill, 2010. 1085 p.
- CHEN,Suet Nee. Growth Kinetics of Pseudomonas Aeruginosa. Bozeman, Montana.: Montana State University, 2001. p. 1-90.
- DE OLIVEIRA,Helinando, et al. Development of low cost microbial fuel cell based on Escherichia coli. En: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGY. Julio 2015.vol. 15, p. 940
- DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL ESTADO DE NUEVA YORK. Manual De Tratamiento De Aguas Negras. 3rd ed. Limusa, 2008. 303 p.
- DONNENBERG,Michael. Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. En: ACADEMIC PRESS. p. 417

DU,Zhuwei; LI,Haoran y GU,Tingyue. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. En: BIOTECHNOLOGY ADVANCES. Octubre 2007.vol. 25, no. 5, p. 464-482

ESTEVE-NÚÑEZ,Abraham. Bacterias Productoras De Electricidad. [Print(0)]. Junio 2008. [Consultado el Marzo 20,2017]. Disponible en: <https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/45/Geobacter.pdf>

FALLAHZADEH,V.; AHMADZADEH,M. y SHARIFI,R. Growth and pyoverdine production kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 in an experimental fermentor. En: JOURNAL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY. vol. 6, no. 1, p. 107-115

FERNÁNDEZ,Jesús, *et al.* Tecnologías Para El Uso Y Transformación De Biomasa Energética. España: Ediciones Mundi-Prensa, 2015. 456-3 p.

FORSTER,Andreas y GESCHR,Johannes. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. En: FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY. vol. 2, p. 3

GARCIA,Lynne y ISENBERG,Henry. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. 2701 p.

GHANGREKAR,M. M. y SHINDE,V. B. Microbial Fuel Cell: A New Approach of Wastewater Treatment with Power Generation. [Print(0)]. [Consultado el 1 de septiembre2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/228502202\\_Microbial\\_Fuel\\_Cell\\_A\\_New\\_Approach\\_of\\_Wastewater\\_Treatment\\_with\\_Power\\_Generation](https://www.researchgate.net/publication/228502202_Microbial_Fuel_Cell_A_New_Approach_of_Wastewater_Treatment_with_Power_Generation)

GRISP Research Solution. Bacteriological Peptone. [Print(0)]. Porto, Portugal. Enero 2016. [Consultado el 15 Noviembre2017]. Disponible en: <http://www.grisp.pt/docs/gcm22-bacteriological-peptone.pdf>

GRISP Research Solution. Tryptone. [Electronic(1)]. Enero, 2016. [Consultado el 15 de Noviembre2017]. Disponible en: <http://www.grisp.pt/docs/gcm23-tryptone.pdf>

GUDE,Veera Gnaneswar. Wastewater Treatment in Microbial Fuel Cells – an Overview. [Electronic(1)]:2016. 287-307

HERNANDEZ,Alicia; ALFARO,Ileana y ARRIETA,Ronald. Microbiología Industrial. Universidad Estatal a Distancia, 2003. 266 p.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ,F. J., *et al.* Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. En: FUEL

PROCESSING TECHNOLOGY. October 2015.vol. 138, no. Supplement C, p. 284-297

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y DE CERTIFICACIÓN. Documentación: Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. 6 ed. Bogotá D.C.: ICONTEC., 2008. 36p

\_\_\_\_\_. Referencias bibliográficas: Contenido, forma y estructura. NTC 5613. 6 ed. Bogotá D.C.: El instituto., 2008. 33p.

\_\_\_\_\_. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. 6 ed. Bogotá D.C.: El instituto., 2008. 23p.

KIM, Taeyoung, et al. Coupling of anaerobic digester and microbial fuel cell for COD removal and ammonia recovery. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. November 2015.vol. 195, no. Supplement C, p. 217-222

KOVAROVA,K.; ZEHNDER,A. J. B. y EGL,T. Temperature-Dependent Growth Kinetics of Escherichia coli ML 30 in Glucose-Limited Continuous Culture. En: JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Agosto, 1996.vol. 178, no. 15, p. 4530-4539

KUMAR,Ravinder; SINGH,Lakhveer y ZULARISAM,A. W. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. En: RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS. April 2016.vol. 56, p. 1322-1336

LEDEZMA,Pablo; GREENMAN,John y IEROPOULOS,Ioannis. MFC-cascade stacks maximise COD reduction and avoid voltage reversal under adverse conditions. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. April 2013.vol. 134, no. Supplement C, p. 158-165

LIAO,Qiang, et al. Electricity generation and COD removal of microbial fuel cells (MFCs) operated with alkaline substrates. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY. 11 November 2014.vol. 39, no. 33, p. 19349-19354

LOGAN,Bruce E., et al. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. En: ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Julio, 2006.vol. 40, no. 17, p. 5181-5192

LOGAN,Bruce E. y REGAN,John M. Microbial Fuel Cells- Challenges and Applications. En: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY. Septiembre, 2016.vol. 40, no. 17, p. 5172-5180



MACKENZIE L.,Davis. Water and Wastewater Engineering: Design Principles and Practice. New York, Chicago, San Francisco, Athens, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto: McGraw Hill, 2010. 1301 p.

MADIGAN,Michael; MARTINKO,John y PARKER,Jack. Brock Biología De Los Microorganismos. 10th ed. España: Prentice Hall, 1998. 1011 p.

MAIER,Raina M. Chapter 3 - Bacterial Growth. En: MAIER,Raina M.; PEPPER,Ian L. y GERBA,Charles P. Environmental Microbiology (Second Edition). San Diego: Academic Press, 2009. 37-54 p. ISBN 9780123705198

MCKEE,Trudy y MCKEE,James. Bioquímica. Las Bases Moleculares De La Vida. 5th ed. McGraw-Hill, 2014. 769 p.

MEDINA,Sergio y ZAPATA,Maria. Evaluación De La Producción De Energía Eléctrica Y Disminución De DQO En Agua Residual Sintética Mediante Celdas De Combustible Microbianas a Escala Laboratorio. Bogotá, Colombia.: Universidad de América, 2017. p. 1-141.

METCALF y EDDY. Ingeniería De Aguas Residuales. 3rd ed. Madrid: McGraw-Hill, 1996. 862 p.

MOLINA,Jose. Factores De Patogenicidad Bacteriana. [Print(0)]. [Consultado el 28 de noviembre2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>

MONTGOMERY,Douglas. Diseño Y Análisis De Experimentos. 2da. ed. México: Limusa Wiley, 2004. 690 p.

NANDY,Arpita; KUMAR,Vikash y KUNDU,Patit P. Effect of electric impulse for improved energy generation in mediatorless dual chamber microbial fuel cell through electroevolution of Escherichia coli. En: BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS. 15 May 2016.vol. 79, p. 796-801

NELSON,David; COX,Michael y LEHNINGER,Albert. Principios De Bioquímica. 4a. ed. Omega, 2006. 1232 p.

NOGUÉS,Fernando; GARCIA-GALINDO,Daniel y REZEAU,Adeline. Energía De La Biomasa (Volumen I). 1a. ed. Zaragoza, España: Prensas de la Universidad de Zaragoza, 2010. 557 p.

PANDIT,Soumya, et al. Performance of electron acceptors in catholyte of a two-chambered microbial fuel cell using anion exchange membrane. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. February 2011.vol. 102, no. 3, p. 2736-2744

PARK, Doo Hyun, et al. Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with Neutral Red. En: BIOTECHNOLOGY LETTERS. Junio 2000.vol. 22, p. 1301-1304

PERMANA, Dani, et al. Preliminary Investigation of Electricity Production Using Dual Chamber Microbial Fuel Cell (DCMFC) with *Saccharomyces Cerevisiae* as Biocatalyst and Methylene Blue as an Electron Mediator. En: PROCEDIA CHEMISTRY. 2015.vol. 17, p. 36-43

PHAM, Hai, et al. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Grampositive bacterium to achieve extracellular electron transfer. En: APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Octubre 2007.vol. 77, p. 1119-1129

POCCIAI, M. E.; BECCARIAI, A. J. y DONDO, R. G. Modeling the microbial growth of two *Escherichia coli* strains in a multi-substrate environment. En: BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING. Junio, 2014.vol. 31, no. 2, p. 347-354

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Manuales Sobre Energía Renovable: Biomasa. [Electronic(1)]. Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/5EA2E564AF6F41D405257CC1005B2354/\\$FILE/Manuales\\_sobre\\_energ%C3%ADa\\_renovableBIOMAS\\_A.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/5EA2E564AF6F41D405257CC1005B2354/$FILE/Manuales_sobre_energ%C3%ADa_renovableBIOMAS_A.pdf)

RAHIMNEJAD, Mostafa, et al. Investigation of different mediators in microbial fuel cell with cyclic voltammeter. En: PAKISTAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Enero 2013.vol. 10, no. 2, p. 37-51

RAHIMNEJAD, M., et al. Methylene blue as electron promoters in microbial fuel cell. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY. October 2011.vol. 36, no. 20, p. 13335-13341

REN, Lijiao; AHN, Yongtae y LOGAN, Bruce E. A Two-Stage Microbial Fuel Cell and Anaerobic Fluidized Bed Membrane Bioreactor (MFC-AFMBR) System for Effective Domestic Wastewater Treatment. En: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY. vol. 48, no. 7, p. 4199-4206

REZA, Mohammad, et al. Kinetics investigation of diversity cultures of *E. coli* and *Shewanella* sp., and their combined effect with mediator on MFC performance. En: JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY. 25 May 2015.vol. 25, p. 42-50

REZA, Mohammad, et al. Competition between *E. coli* and *Shewanella* sp. for electricity generation in air cathode MFC in presence of methylene blue as artificial

mediator. En: ENVIRONMENTAL PROGRESS & SUSTAINABLE ENERGY. Marzo, 2015.vol. 34, no. 4, p. 1097-1105

ROBINSON,Joseph; TRULEAR,Michael y CHARACKLIST,William. Cellular Reproduction and Extracellular Polymer Formation by Pseudomonas aeruginosa in Continuous Culture. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. Abril, 1985.vol. 26, no. 12, p. 1409-1417

ROMERO,Raul. Microbiología Y Parasitología Humana. 3a. ed. Panamericana, 2007. 1000 p.

RUIZ MARTÍNEZ,Lidia. "Pseudomonas Aeruginosa": Aportación Al Conocimiento De Su Estructura Y Al De Los Mecanismos Que Contribuyen a Su Resistencia a Los Antimicrobianos. Barcelona, España.: Universidad de Barcelona, 2007. p. 1-180.

SCHLEGEL,Hans G. Microbiología General. 7th ed. Omega, 1997. 654 p.

SCOTT,Keith y HAO YU,Eileen. Microbial Electrochemical and Fuel Cells Fundamentals and Applications. Boston: Woodhead Publishing, 2016. 410 p.

SEVDA,S1 y SREEKRISHNAN,TR. - Effect of salt concentration and mediators in salt bridge microbial fuel cell for electricity generation from synthetic wastewater. En: JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH. PART A, TOXIC/HAZARDOUS SUBSTANCES & ENVIRONMENTAL ENGINEERING. vol. 47, no. 6, p. 878-886

SUGNAUX,Marc, et al. Probing electron transfer with Escherichia coli: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. November 2013.vol. 148, p. 567-573

SUGNAUX,Marc, et al. Probing electron transfer with Escherichia coli: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. November 2013.vol. 148, p. 567-573

TORRES,Patricia, FORESTI,Eugenio y VAZOLLER,Rosana. Composición Y Uso De Agua Residual Doméstica En Reactores a Escala De Laboratorio. [Print(0)]. [Consultado el Septiembre 52017]. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=50288&indexSearch=ID>

TOUACH,N., et al. Influence of the preparation method of MnO<sub>2</sub>-based cathodes on the performance of single-chamber MFCs using wastewater. En: SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY. 17 October 2016.vol. 171, no. Supplement C, p. 174-181

University of Guelph, Food Science Department. Microbial Growth. [Print(0)]. Ontario, Canada. [Consultado el Noviembre 222017]. Disponible en: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/microbial-growth>

VAN SWAAIJ,Wim; KERSTEN,Sascha y PALZ,Wolfgang. Biomass Power for the World. Pan Stanford Publishing, 2015. 762 p.

VÁSQUEZ,Geinny. Panorama Del Tratamiento De Aguas Residuales Con Tecnología Anaerobia En La Costa Atlántica Colombiana. Bogotá, Colombia.: Universidad Nacional de Colombia, 2014. p. 174.

WANG,Yong-Peng, et al. Improving electricity generation and substrate removal of a MFC–SBR system through optimization of COD loading distribution. En: BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. 15 April 2014.vol. 85, no. Supplement C, p. 15-20

XI,Ming-yue y SUN,Yan-ping. Preliminary Study on E. coli Microbial Fuel Cell and On-electrode Taming of the Biocatalyst. En: THE CHINESE JOURNAL OF PROCESS ENGINEERING. Diciembre 2008.vol. 8, no. 6, p. 1179-1184

YOUNG PARK,Shin y HA,Sang-Do. Predictive growth model of the effects of temperature on the growth kinetics of generic Escherichia coli in the Korean traditional rice cake product “Garaetteok”. En: JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. Octubre, 2017.p. 1-7

ZHANG,Xiaoyuan, et al. COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. January 2015.vol. 176, no. Supplement C, p. 23-31

ZUHRI,Fachryan, et al. Effect of methylene blue addition as a redox mediator on performance of microbial desalination cell by utilizing tempe wastewater . En: INTERNATIONAL JOURNAL OF TECHNOLOGY. vol. 6, p. 952-961

## **ANEXOS**

# ANEXO A.

## INVESTIGACIONES HECHAS CON *Escherichia coli* Y AZUL DE METILENO ENTRE 2000-2017, TOMADO DE LA BASE DE DATOS SCOPUS.

Analyze search results

[Export](#) | [Print](#) | [E-mail](#)

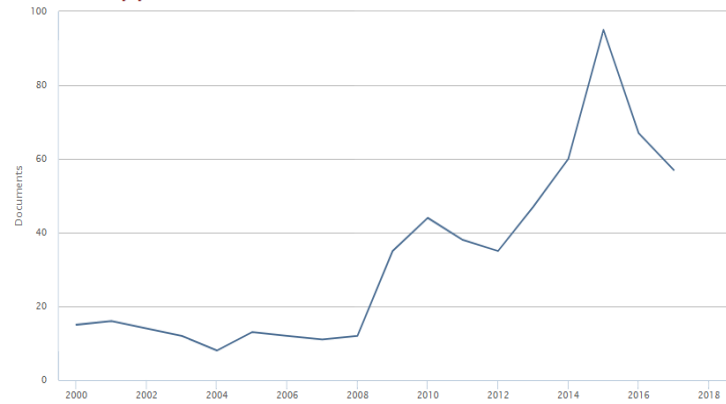
TITLE-ABS-KEY ("Escherichia coli" AND "methylene blue") [Back to your search results](#)

591 document results Choose date range to analyze: 2000 to 2017 [Analyze](#)

Year	Source	Author	Affiliation	Country/Territory	Document type	Subject area
------	--------	--------	-------------	-------------------	---------------	--------------

Year	Documents
2017	57
2016	67
2015	95
2014	60
2013	47
2012	35
2011	38
2010	44
2009	35
2008	12
2007	11
2006	12
2005	13
2004	8
2003	12
2002	14

Documents by year



## ANEXO B. DOCUMENTOS POR ÁREA PARA *Escherichia coli* Y AZUL DE METILENO, TOMADO DE LA BASE DE DATOS SCOPUS

Analyze search results

Export | Print | E-mail

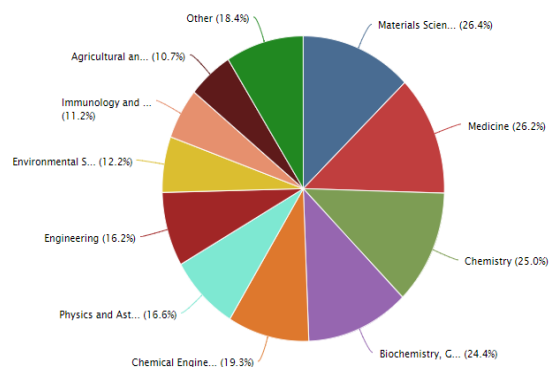
TITLE-ABS-KEY ("Escherichia coli" AND "methylene blue") [Back to your search results](#)

591 document results Choose date range to analyze: 2000 to 2017 [Analyze](#)

Year Source Author Affiliation Country/Territory Document type Subject area

Subject Area	Documents
Materials Science	156
Medicine	155
Chemistry	148
Biochemistry, Genetics and Molecu...	144
Chemical Engineering	114
Physics and Astronomy	98
Engineering	96
Environmental Science	72
Immunology and Microbiology	66
Agricultural and Biological Sciences	63
Pharmacology, Toxicology and Pha...	33
Health Professions	17
Veterinary	17
Energy	13
Dentistry	6
Earth and Planetary Sciences	5

Documents by subject area



## ANEXO C.

### INVESTIGACIONES HECHAS CON *Pseudomonas aeruginosa* Y AZUL DE METILENO ENTRE 2000-2017, TOMADO DE LA BASE DE DATOS SCOPUS

Analyze search results

[Export](#) | [Print](#) | [E-mail](#)

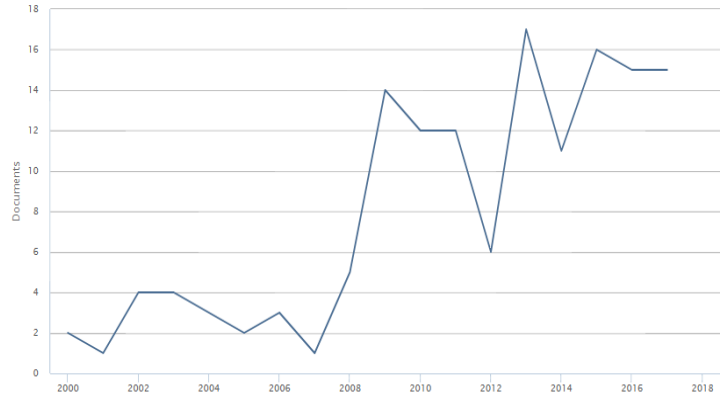
TITLE-ABS-KEY ("pseudomonas aeruginosa" AND "methylene blue") [Back to your search results](#)

143 document results Choose date range to analyze: 2000 to 2017 [Analyze](#)

**Year** | Source | Author | Affiliation | Country/Territory | Document type | Subject area

Year	Documents
2017	15
2016	15
2015	16
2014	11
2013	17
2012	6
2011	12
2010	12
2009	14
2008	5
2007	1
2006	3
2005	2
2004	3
2003	4
2002	4

Documents by year





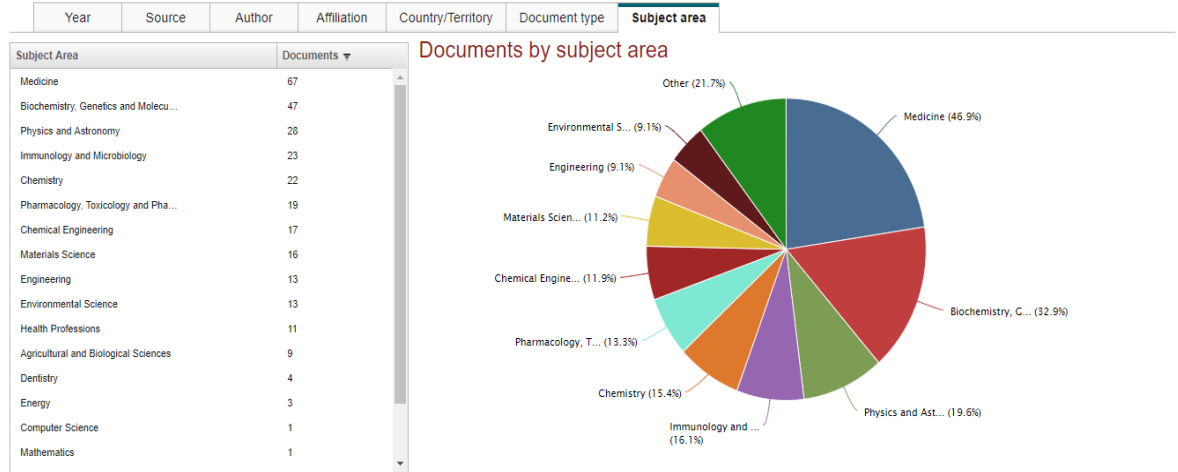
## ANEXO D. DOCUMENTOS POR ÁREA PARA *Pseudomonas aeruginosa* Y AZUL DE METILENO, TOMADO DE LA BASE DE DATOS SCOPUS

Analyze search results

Export | Print | E-mail

TITLE-ABS-KEY ("pseudomonas aeruginosa" AND "methylene blue") [Back to your search results](#)

143 document results Choose date range to analyze: 2000 to 2017 [Analyze](#)



**ANEXO E.**  
**COSTO DEL MEDIO SINTÉTICO UTILIZADO COMO AGUA RESIDUAL**

Bogotá, 1 de Septiembre de 2017

Señores

**UNIVERSIDAD DE AMERICA**  
**ATN. ING. DAVID FERNANDO**  
**WITTINGHAN**  
**LABORATORIO**  
CIUDAD

**COTIZACION No. SR-218**

ITM	DESCRIPCION	MARCA	CAN T	V/UNITARI O	V/TOTAL	IV A	ENTREG A
1	CALDO CASO TRIPTONA SOYA FCOX500GR  REF. 1054590500	MERCK	1	182.000	182.000	19	15 DIAS
2	CALDO NUTRITIVO FCOX500GR REF.CM-001	OXOID	1	474.400	474.400	19	15 DIAS

**CONDICIONES  
COMERCIALES**

IVA : 19% NO INCLUIDO EN EL VALOR UNITARIO

PAGO : ANTICIPADO

**VIGENCIA : 30 DIAS**

ENTREGA : DENTRO DE LOS PROXIMOS 15 DIAS DESPUES DE LLEGADA LA ORDEN

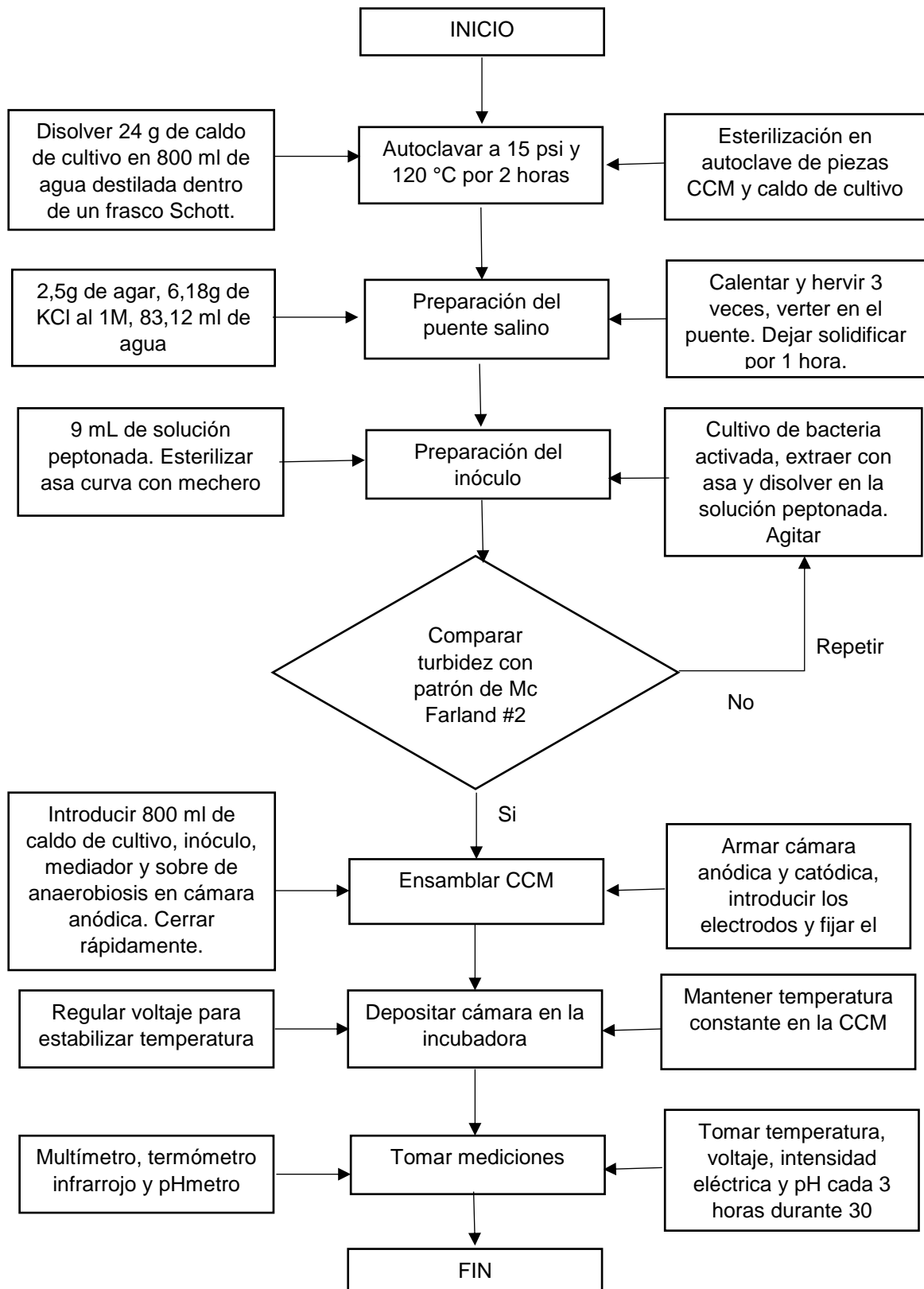
\*\*\*LAS ENTREGAS ESTAN SUJETAS A LA DISPONIBILIDAD DE LOS FABRICANTES \*\*\*

\*\*\* GUSTOSOS DE PODER  
SERVIRLES \*\*\*



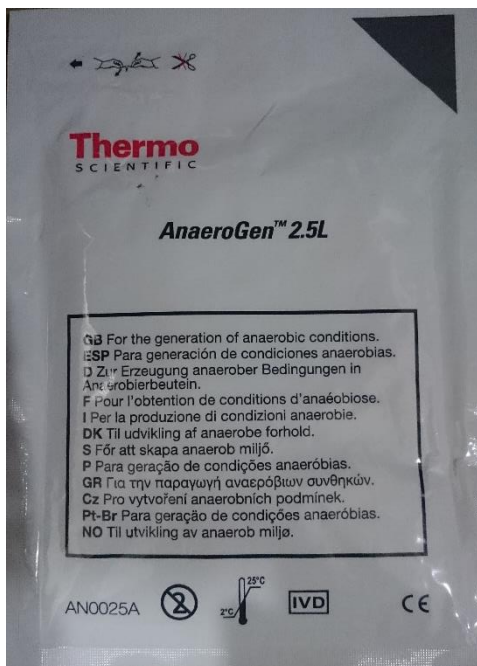
**SEBASTIAN RAMIREZ**  
**RAMIREZ**  
ASESOR QUIMICO

**ANEXO F.**  
**DIAGRAMA DE MONTAJE DE CCM Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO**



## ANEXO G.

### SOBRE DE ANAEROBIOSIS UTILIZADO DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN



**ANEXO H.**  
**RESULTADOS PRUEBAS EXPERIMENTALES *Escherichia coli* Y AZUL DE METILENO**

**Prueba 1 (Azul de metileno 0,0001 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	92,3	69	31,0	7,1
3	80,8	57	37,7	6,7
6	165,4	50	36,8	6,7
9	214	80	35,6	6,3
12	180	55	38,6	6,1
15	201	70	39,1	5,9
18	258	97	36,7	6
21	299	134	36,7	6
24	289	101	37,7	5,8
27	275	109	37,8	5,6
30	274	101	38,0	5,6
<b>Promedio</b>	<b>211,68</b>	<b>83,91</b>	<b>36,88</b>	<b>6,16</b>

**Prueba 2 (Azul de metileno 0,0001 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	114,3	77	35,2	7,2
3	104,7	92	38,6	6,9
6	116,4	97	39,1	6,8
9	148,5	115	38,9	6,3
12	189,1	104	38,1	6
15	222	132	38,7	6,2
18	216	156	38,8	5,9
21	222	147	39,0	6,1
24	239	138	39,8	5,8
27	244	168	36,5	5,7
30	258	162	38,3	5,5
<b>Promedio</b>	<b>188,55</b>	<b>126,18</b>	<b>38,27</b>	<b>6,22</b>

**Prueba 3 (Azul de metileno 0,0003 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	186	35	34,0	7,1
3	166,6	63	35,3	6,7
6	262	103	38,5	5,5
9	416	109	37,3	5,9
12	407	99	35,0	5,8
15	331	101	36,0	5,8
18	374	121	37,0	5,8
21	403	132	37,6	5,8
24	341	114	37,7	5,7
27	382	144	36,7	5,5
30	378	166	37,7	5,8
<b>Promedio</b>	<b>331,51</b>	<b>107,91</b>	<b>36,62</b>	<b>5,95</b>

**Prueba 4 (Azul de metileno 0,0003 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	172,6	123	36,0	7,2
3	179,3	124	33,8	6,9
6	302	161	34,7	6,3
9	381	183	34,5	6
12	387	241	36,0	5,8
15	350	222	38,0	5,9
18	298	198	34,5	5,8
21	447	193	38,6	5,7
24	392	150	36,4	5,7
27	414	155	36,5	6
30	401	156	36,7	5,7
<b>Promedio</b>	<b>338,54</b>	<b>173,27</b>	<b>35,97</b>	<b>6,09</b>

**Prueba 5 (Sin azul de metileno)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	153,6	106	40,0	7,3
3	135	89	37,8	7
6	168,3	97	37,2	6,9
9	167,2	79	38,6	6,6
12	176,9	68	38,1	6,4
15	181,3	74	37,2	6,1
18	198,7	95	37,9	5,9
21	241	104	37,2	6
24	239	101	38,4	5,9
27	191	94	39,0	5,7
30	187,8	90	38,0	5,7
<b>Promedio</b>	<b>185,44</b>	<b>90,64</b>	<b>38,13</b>	<b>6,32</b>

**ANEXO I**  
**RESULTADOS PRUEBAS EXPERIMENTALES *Pseudomonas aeruginosa* Y**  
**AZUL DE METILENO**

**Prueba 6 (Azul de metileno 0,0001 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	173,3	166	39,1	7,3
3	188,9	288	39,5	6,9
6	229	389	37,4	6,8
9	315	443	39,7	6,5
12	328	470	39,4	6,2
15	331	494	38	6,1
18	322	491	37,2	6,2
21	329	517	37,4	5,8
24	348	546	39,6	5,9
27	351	580	39,7	5,8
30	362	601	38,4	5,7
<b>Promedio</b>	<b>297,93</b>	<b>453,18</b>	<b>38,67</b>	<b>6,29</b>

**Prueba 7 (Azul de metileno 0,0001 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	172,2	37	36,8	7,2
3	166,9	75	38,7	7,2
6	167,1	109	38,3	6,8
9	351	280	38,6	6,3
12	465	301	37,8	6,2
15	492	227	36,4	6,1
18	503	231	37,7	5,6
21	507	199	36,8	5,5
24	493	259	37,2	5,9
27	464	244	37,8	5,8
30	408	215	36,9	5,8
<b>Promedio</b>	<b>380,84</b>	<b>197,91</b>	<b>37,55</b>	<b>6,22</b>



**Prueba 8 (Azul de metileno 0,0003 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	190,3	95	36	7,1
3	197	165	38,9	6,7
6	210	186	40,4	6,3
9	216	190	37,8	5,8
12	269	234	38,5	6
15	351	302	38,7	5,9
18	379	321	38,4	5,9
21	403	203	39,2	5,6
24	390	190	38,2	5,8
27	395	195	38,4	5,7
30	389	210	37,9	5,6
<b>Promedio</b>	<b>308,12</b>	<b>208,27</b>	<b>38,4</b>	<b>6,04</b>

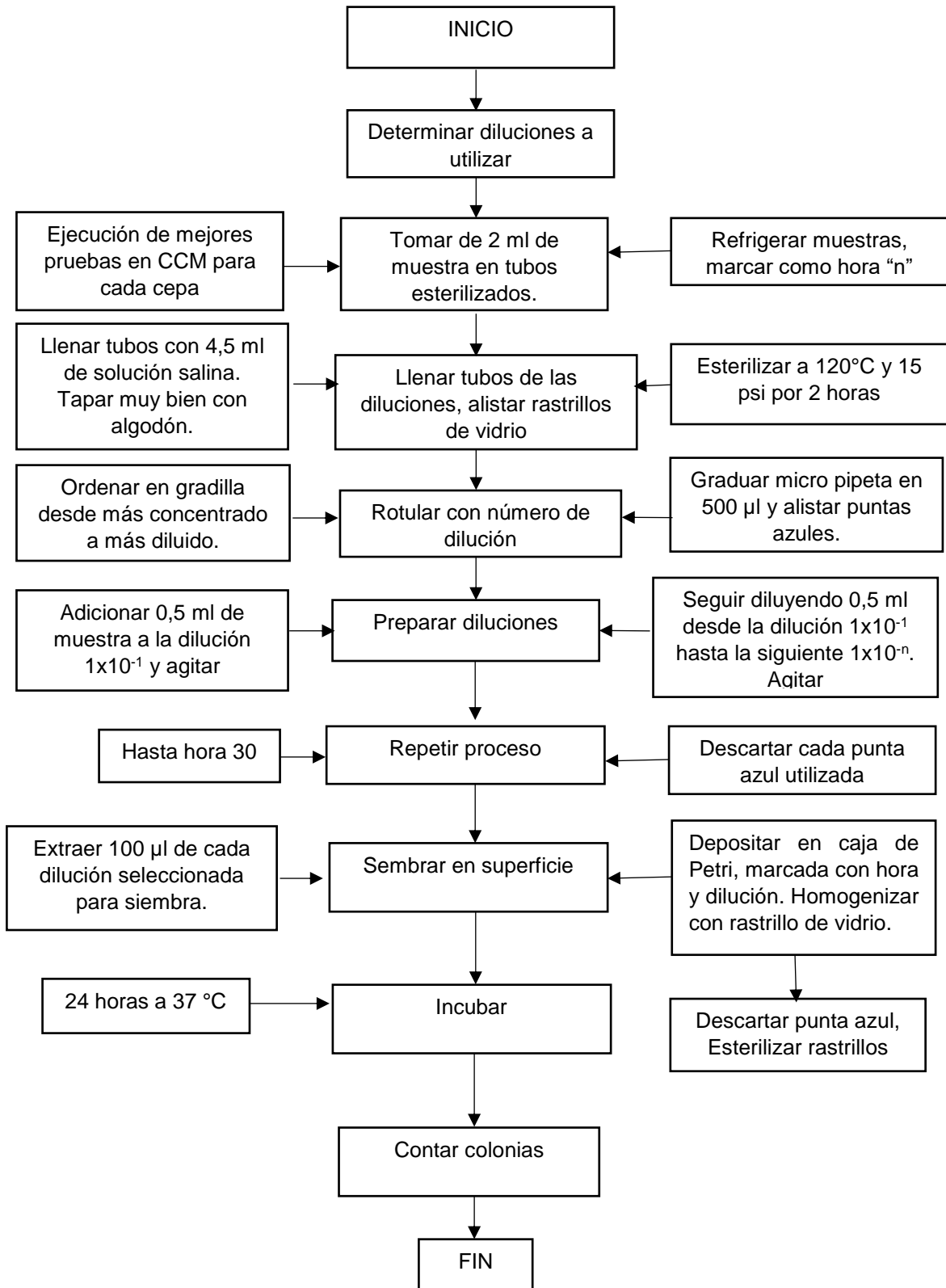
**Prueba 9 (Azul de metileno 0,0003 M)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	175,3	70	39,5	7,2
3	115,9	61	39,4	6,8
6	121,5	66	39,6	6,2
9	276	179	35,8	6
12	309	201	37,4	6
15	323	214	39,2	5,7
18	325	235	37,4	5,9
21	348	242	37,7	5,7
24	354	150	38,5	5,8
27	352	143	38,6	5,8
30	349	129	37,1	5,7
<b>Promedio</b>	<b>277,15</b>	<b>153,64</b>	<b>38,2</b>	<b>6,07</b>

**Prueba 10 (Sin azul de metileno)**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Voltaje (mV)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>pH</b>
0	114,7	28	30,4	7,3
3	169,2	181	39,2	7,2
6	235	264	39,1	6,9
9	316	349	39,5	6,7
12	222	304	40,1	6,4
15	354	383	38,7	6,3
18	331	282	36,8	5,7
21	339	290	38,1	5,8
24	371	230	38,2	6
27	380	267	38,6	5,9
30	404	258	38,3	6,2
<b>Promedio</b>	<b>294,17</b>	<b>257,82</b>	<b>37,91</b>	<b>6,42</b>

**ANEXO J**  
**PROCEDIMIENTO DILUCIONES SERIADAS Y RECuento EN PLACA**



## ANEXO K. RESULTADOS ANÁLISIS DE DQO OBTENIDOS

### LABORATORIOS PRODYCON S.A.S.

Bogotá D.C., 27/11/2017	N.I.T. 103,246,748-4
Solicitante : Leonardo Colmenares Valero	
Telefonos: 3143379258	FAX :
Dirección: Cra 51 # 167 - 50 Int 11 Apto 204	



**IDEAM**  
RESOL. No. 0860/27-04-2017



**Prodycon.**  
Laboratorio Ambiental

NIT. 800,070,853 - 7

REPORTE DE RESULTADOS DE LABORATORIO MUESTRA **168532**

Fecha Recepción: 21/11/2017

#### DATOS DE RECEPCION DE LA MUESTRA

Página 1 de 3

OBSERVACIONES :	Cadena de Custodia <input checked="" type="checkbox"/>	Fecha toma: 20/11/2017	Departamento: BOGOTA	Municipio: BOGOTA D.C.
Muestra tomada por el cliente.	Datos de Campo <input type="checkbox"/>	Hora toma: 16.00	Coordenadas:	
	Preservación <input type="checkbox"/>	Monitoreo: Cliente	Sitio: TRIPTICASA DE SOYA	
	Plan Muestral <input type="checkbox"/>	No Asignado	Monitoreo	
		Nombre plan:		

Parámetro de Análisis	Reproceso	Método	LC	Incertidumbre Combinada	Resultado	Unidades
A-DQO Rango Medio (Colorimétrico) ®		SM 5220 D	100	0.02785446	23520	mg/L O2

Nota: El resultado de este análisis es único y solo valido con el sello seco del Laboratorio. Queda totalmente prohibida la reproducción del mismo y solamente son validas las copias autorizadas con el sello seco del laboratorio. Este reporte aplica unicamente a la muestra analizada. Los valores de incertidumbre reportados corresponden a incertidumbre combinada (uc). Para expandir aplique:  $k \cdot uc \cdot \text{Concentración}$ . El factor de cobertura es  $k=2$  con un nivel de confianza del 95%.

\*: Identifica en donde se generó reproceso dentro del reporte de resultados por causa de PQR, PQR: Preguntas, quejas o reclamos.

La información asociada a estas muestras (Cadenas de custodia) reposaran en los archivos de Prodycon S.A.S. por un año.

Observaciones :

Firma Autorizada:

Gerente General  
Representante Legal

### LABORATORIOS PRODYCON S.A.S

Parámetros Acreditados ISO IEC 17025 por IDEAM Resolucion 3567/2014 Identificados con ® al frente. Plan de Muestreo; Cadena de Custodia y Datos de Campo, en Formatos anexos, identificados con el número de muestra y disponibles cuando el cliente los solicite.

**LABORATORIOS PRODYCON S.A.S.**

Bogotá D.C., 27/11/2017 N.I.T. 101,848,339-0  
 Solicitante : Leonardo Colmenares Valero  
 Telefonos: 3143379258 FAX :  
 Dirección: Cra 51 # 167 – 50 Int 11 Apto 204



**REPORTE DE RESULTADOS DE LABORATORIO MUESTRA 168534**

Fecha Recepción: 21/11/2017

**DATOS DE RECEPCION DE LA MUESTRA**

Página 1 de 1

**OBSERVACIONES :**

Muestra tomada por el cliente.

Cadena de Custodia  Fecha toma 20/11/2017 Departamento: BOGOTA Municipio: BOGOTA D.C.  
 Datos de Campo  Hora toma: 16.00 Coordenadas:  
 Preservación  Monitoreo: Cliente Sitio TRIPTICASA DE SOYA - E-COLI - AZUL DE METILENO  
 Plan Muestral  No Asignado Monitoreo  
 Nombre plan:

Parámetro de Análisis	Reproceso	Método	LC	Incertidumbre Combinada	Resultado	Unidades
A-DQO Rango Medio (Colorimétrico) ®		SM 5220 D	100	0.02785446	20380	mg/L O2

Nota: El resultado de este análisis es único y solo valido con el sello seco del Laboratorio. Queda totalmente prohibida la reproducción del mismo y solamente son validas las copias autorizadas con el sello seco del laboratorio. Este reporte aplica unicamente a la muestra analizada. Los valores de incertidumbre reportados corresponden a incertidumbre combinada (uc). Para expandir aplique: k\*uc\*Concentración. El factor de cobertura es k=2 con un nivel de confianza del 95%.

\*: Identifica en donde se generó reproceso dentro del reporte de resultados por causa de PQR, PQR: Preguntas, quejas o reclamos.

La información asociada a estas muestras (Cadenas de custodia) reposaran en los archivos de Prodycon S.A.S. por un año.

**Observaciones :**

Firma Autorizada:

Gerente General  
 Representante Legal

**LABORATORIOS PRODYCON S.A.S**

Parámetros Acreditados ISO IEC 17025 por IDEAM Resolucion 3567/2014 Identificados con ® al frente. Plan de Muestreo; Cadena de Custodia y Datos de Campo, en Formatos anexos, identificados con el número de muestra y disponibles cuando el cliente los solicite.

**LABORATORIOS PRODYCON S.A.S.**

Bogotá D.C., 30/11/2017 N.I.T. 103,246,748-4  
**Solicitante :** Leonardo Colmenares Valero  
**Telefonos:** 3143379258 **FAX :**  
**Dirección:** Cra 51 # 167 - 50 Int 11 Apto 204



**REPORTE DE RESULTADOS DE LABORATORIO MUESTRA 168711**

Fecha Recepción: 23/11/2017

**DATOS DE RECEPCION DE LA MUESTRA**

Página 3 de 3

Cadena de Custodia  Fecha toma 23/11/2017 Departamento: BOGOTA Municipio: BOGOTA D.C.  
 Datos de Campo  Hora toma: 10.30 Coordenadas:  
 Preservación  Monitoreo: Prodycon S.A. Sitio TRIPTICASA DE SOYA AZUL DE METILENO - PSEUDOMONA,  
 No Asignado Monitoreo AERUYINOSA  
 Plan Muestral  Nombre plan:

**OBSERVACIONES :**  
 Muestra tomada por el cliente.

Parámetro de Análisis	Reproceso	Método	LC	Incertidumbre Combinada	Resultado	Unidades
A-DQO Rango Medio (Colorimétrico)®		SM 5220 D	100	0.02785446	22510	mg/L O2


Nota: El resultado de este análisis es único y solo valido con el sello seco del Laboratorio. Queda totalmente prohibida la reproducción del mismo y solamente son validas las copias autorizadas con el sello seco del laboratorio. Este reporte aplica unicamente a la muestra analizada. Los valores de incertidumbre reportados corresponden a incertidumbre combinada (uc). Para expandir aplique:  $k \cdot uc \cdot \text{Concentración}$ . El factor de cobertura es  $k=2$  con un nivel de confianza del 95%.  
 \*: Identifica en donde se generó reproceso dentro del reporte de resultados por causa de PQR, PQR: Preguntas, quejas o reclamos.  
 La información asociada a estas muestras (Cadenas de custodia) reposaran en los archivos de Prodycon S.A.S. por un año.

**Observaciones :**  
**Firma Autorizada:**

Gerente General  
 Representante Legal

**LABORATORIOS PRODYCON S.A.S**

Parámetros Acreditados ISO IEC 17025 por IDEAM Resolucion 3567/2014 Identificados con ® al frente. Plan de Muestreo; Cadena de Custodia y Datos de Campo, en Formatos anexos, identificados con el número de muestra y disponibles cuando el cliente los solicite.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016


## AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES


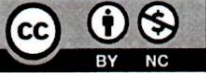

Nosotros, **Leonardo Colmenares Valero** y **David Fernando Wittinghan Puentes** en calidad de titulares de la obra **Evaluación del efecto de la concentración de mediador en la producción de energía eléctrica en agua residual sintética mediante celdas de combustible microbianas a escala laboratorio**, elaborada en el año 2017, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: [http://co.creativecommons.org/?page\\_id=13](http://co.creativecommons.org/?page_id=13)

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

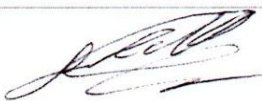
AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, a los 14 días del mes de Febrero del año 2018.

#### LOS AUTORES:

##### Autor 1

<b>Nombres</b>	<b>Apellidos</b>
Leonardo	Colmenares Valero
<b>Documento de identificación No</b>	<b>Firma</b>
1.032.467.484	

##### Autor 2

<b>Nombres</b>	<b>Apellidos</b>
David Fernando	Wittinghan Puentes
<b>Documento de identificación No</b>	<b>Firma</b>
1.019.095.021	