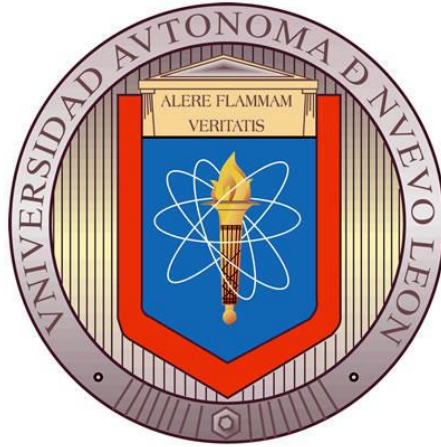


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**EMPLEO DE UNA BIOPELÍCULA DE *SERRATIA* EN LA
CONSTRUCCIÓN DE UN BIOÁNODO CON POSIBLE APLICACIÓN
EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA**

POR

CARLOS JESÚS CASTILLO ZACARÍAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA**

OCTUBRE, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Comité de aprobación de tesis:

Empleo de una biopelícula de *Serratia* en la construcción de un bioánodo con posible aplicación en una celda de combustible microbiana

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Presidente

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Dra. Nora Aleyda García Gómez

Dra. María Teresa Garza González

Dr. Ulrico López Chuken

Dr. Roberto Parra Saldívar

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez
Subdirectora de Posgrado en Ciencias

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó gracias a la beca otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Adicionalmente se agradece a la Facultad de Ciencias Químicas y al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey por la infraestructura facilitada para la realización de este proyecto.

Quiero destacar un profundo agradecimiento a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas y al Dr. Juan Villarreal Chiu, por su dirección en este proyecto. Adicionalmente, agradezco a mi comité tutorial, y de manera muy especial a la Dra. Tere Garza.

Un muy especial agradecimiento al Dr. Roberto Parra Saldívar por su ayuda en el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo por su siempre disposición a compartir sus conocimientos y permitir mi desarrollo profesional.

Gracias también a mis compañeros del laboratorio de Biotecnología 1 por el trabajo y tiempo compartido. Extiendo mi eterna gratitud a mi familia y de manera muy especial a Karen Hernández Robledo.

Al APC, a Conchita y al Padre Félix.

Dedicada a:
Dios y a mi madre.

RESUMEN

Carlos Jesús Castillo Zacarías

Fecha de Graduación: 3 de octubre de 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: Empleo de una biopelícula de *Serratia* en la construcción de un bioánodo con posible aplicación en una celda de combustible microbiana.

Número de páginas:

**Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con orientación en
Microbiología Aplicada**

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y método de estudio: El presente estudio busca contribuir al desarrollo de energías renovables y la sustitución del uso de los combustibles fósiles. Por lo tanto, esta tesis expone el uso de una biopelícula de *Serratia* en una celda de combustible microbiana. Para lograr esto, se examinó primero la capacidad exoelectrogénica del cultivo en estudio y se comparó con la capacidad mostrada por un cultivo de referencia. Posteriormente, se llevó a cabo la producción de una biopelícula sobre el ánodo, esto de manera controlada y que estuviera integrado por el mayor número posible de células viables del cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E, ya que fue este el que mostro mayor poder exoelectrogénico en los estudios de reducción de Fe(III). Este bioánodo se caracterizó por la técnica de dilución y siembra en placa y por microscopia electrónica de barrido (MEB). Finalmente, el desempeño bioelectrogenico del bioánodo pre-acondicionado y del cultivo planktonico fue evaluado por medio de la determinación del diferencial de potencial entre ánodo y cátodo de la CCM.

Contribuciones y conclusiones: Se logró describir la capacidad reductora de Fe(III) por parte del cultivo autóctono de *Serratia marcescens* 11E. Además, fue posible llevar a cabo la generación de una biopelícula con las características deseadas para ser utilizado como bioánodo en una CCM. La CCM generada, tuvo un desempeño aceptable en cuanto a la generación de densidad de potencia ya que los valores obtenidos por el bioánodo pre-acondicionado y por el cultivo planktónico se encuentran dentro del rango de valores reportados en la literatura en condiciones similares de experimentación. Además, es destacable que el desempeño generado por el bioánodo pre-acondicionado es mejor al producido por el cultivo planktónico. Por lo anterior, este tipo de bioánodo es una opción viable para utilizar en la generación de bioelectricidad en celdas de combustible microbianas.

FIRMA DEL ASESOR: _____

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Celdas de combustible microbianas	3
1.2 Bioánodo	4
1.3 Microorganismos exoelectrogénicos	5
1.4 Mecanismos de transferencia de electrones	7
1.5 Transferencia directa de electrones	8
1.6 Transferencia indirecta de electrones	9
1.7 Electrodo	13
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Ubicación del desarrollo del proyecto	29
6.2 Materiales	30
6.2.1 Equipos	30
6.2.2 Reactivos	30
6.3 Métodos	31
6.3.1 Identificación del cultivo bacteriano por medio de pruebas bioquímicas	31
6.3.2 Caracterización molecular de <i>Serratia</i>	32

6.3.3 Producción de un cultivo pigmentado de <i>Serratia</i>	33
6.3.4 Producción de un cultivo no pigmentado de <i>Serratia</i>	34
6.3.5 Producción de un cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i>	36
6.3.6 Reducción de Fe(III) por el cultivo pigmentado de <i>Serratia</i>	37
6.3.7 Reducción de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>Serratia</i>	39
6.3.8 Reducción de Fe(III) por <i>S. oneidensis</i>	40
6.3.9 Extracción, purificación y caracterización química de la prodigiosina	40
6.3.10 Reducción de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>Serratia</i> en presencia de prodigiosina exógena	42
6.3.11 Reducción de Fe(III) por el cultivo pigmentado y no pigmentado de <i>Serratia</i> , <i>S. oneidensis</i> , y el cultivo no pigmentado de <i>Serratia</i> en presencia de prodigiosina exógena con donadores de electrones alternativos	43
6.3.12 Desarrollo activo de bioánodos	44
6.3.12.1 Lavado de electrodos de grafito	44
6.3.12.2 Producción de inóculo no pigmentado de <i>Serratia</i>	45

6.3.12.3	Diseño Plackett-Burman para la producción de una biopelícula de un cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> en condiciones controladas	46
6.3.12.4	Determinación de viabilidad celular del cultivo no pigmentado de <i>Serratia</i>	47
6.3.12.5	Producción de inóculo de <i>S. oneidensis</i>	48
6.3.12.6	Diseño Plackett-Burman para la producción de una biopelícula de un cultivo no pigmentado de <i>S. oneidensis</i> en condiciones controladas	49
6.3.12.7	Determinación de viabilidad celular de <i>S. oneidensis</i>	50
6.3.13	Desempeño del bioánodo generado en una CCM de doble cámara	50
6.3.13.1	Configuración de la CCM	50
6.3.13.2	Biocatalizador y agua residual sintética	51
6.3.13.3	Operación de la CCM	52
6.3.13.4	Análisis	53
7.	RESULTADOS	54
7.3.1	Identificación del cultivo bacteriano por medio de pruebas bioquímicas	54
7.3.2	Análisis de ADN del aislado bacteriano	58
7.3.3	Producción de un cultivo pigmentado de <i>S.</i>	

<i>marcescens</i> 11E	63
7.3.4 Producción de un cultivo no pigmentado de <i>S.</i> <i>marcescens</i> 11E	63
7.3.5 Producción de un cultivo de <i>S. oneidensis</i>	65
7.3.6 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	65
7.3.7 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	66
7.3.8 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	67
7.3.9 Caracterización química de la prodigiosina extraída	68
7.3.10 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E en presencia de prodigiosina exógena	70
7.3.11 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	73
7.3.12 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	74
7.3.13 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	75
7.3.14 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E en presencia de prodigiosina exógena	77
7.3.15 Efecto de donadores de electrones alternativos en la	

reducción de citrato de Fe(III) y óxido de Fe(III) por los cultivos en evaluación	79
7.3.15.1 Cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E y citrato de Fe(III)	80
7.3.15.2 Cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E y citrato de Fe(III)	81
7.3.15.3 Cultivo de <i>S. oneidensis</i> y citrato de Fe(III)	82
7.3.15.4 Cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E con citrato de Fe(III) y adicionado con prodigiosina exógena	83
7.3.15.5 Cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E y óxido de Fe(III)	85
7.3.15.6 Cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E y óxido de Fe(III)	86
7.3.15.7 Cultivo de <i>S. oneidensis</i> y óxido de Fe(III)	88
7.3.15.8 Cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E con óxido de Fe(III) y adicionado con prodigiosina exógena	89
7.3.16.1 Diseño factorial fraccionado y determinación de viabilidad celular del cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	94
7.3.16.2 Diseño factorial fraccionado y determinación de viabilidad celular del cultivo de <i>S. oneidensis</i>	96

7.3.17 Desempeño del bioánodo generado en una CCM de doble cámara	98
7.3.17.1 Configuración y operación de la CCM	98
7.3.17.2 Bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	99
7.3.17.3 Bioánodo pre-acondicionado de <i>S.</i> <i>oneidensis</i>	104
7.3.17.4 Cultivo planktónico y no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	108
7.3.17.5 Cultivo planktónico de <i>S. oneidensis</i>	110
8. DISCUSIÓN	114
9. CONCLUSIONES	125
10. FUTURAS PRESPECTIVAS	128
11. REFERENCIAS	130

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Diagrama típico de una celda de combustible microbiana	4
2. Mecanismos de transferencia de electrones a un aceptor final	8
3. Estructura de la prodigiosina	12
4. Mecanismos de reducción de Fe(III)	16
5. Pruebas bioquímicas	57
6. Electroforesis de ADN aislado	58
7. Electroforesis de los amplicones	59
8. Electroforesis preparativa para purificación	60
9. Electroforesis del fragmento amplificado después de la purificación	61
10. Relaciones evolutivas de los taxones	62
11. Efecto de la glucosa sobre la producción del metabolito secundario prodigiosina	64
12. Inóculos de los cultivos no pigmentados y pigmentados de <i>S. marcescens</i>	64
13. Producción de Fe(II) por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i>	66
14. Producción de Fe(II) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	67
15. Producción de Fe(II) por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	68

16.	Espectro de FTIR y cromatograma de HPLC de prodigiosina purificada	69
17.	Producción de Fe(II) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> en presencia de prodigiosina exógena	71
18.	Producción de Fe(II) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos	73
19.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i>	74
20.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	75
21.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	76
22.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> en presencia de prodigiosina exógena	78
23.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos	79
24.	Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i>	80
25.	Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	81
26.	Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) con	

	glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	82
27.	Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> en presencia de prodigiosina exógena	84
28.	Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos	85
29.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i>	86
30.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	87
31.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	88
32.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) con glicerol y glucosa como donador de electrones por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> en presencia de prodigiosina exógena	90
33.	Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos	91
34.	Micrografía de microscopio electrónico de barrido (MEB)	

	del cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	95
35.	Micrografía de microscopio electrónico de barrido (MEB)	
	MEB del cultivo de <i>S. oneidensis</i>	97
36.	Celda de combustible microbiana diseñada en el programa	
	Solidworks	98
37.	Panel frontal y diagrama de bloque de LabVIEW	99
38.	Sistema de monitoreo de mV-mA de CCM con	
	<i>S. marcescens</i> no pigmentada como biocatalizador	100
39.	Actividad bioelectrogénica de CCM con bioánodo	
	pre-acondicionado de <i>S. marcescens</i> no	
	pigmentada como biocatalizador	102
40.	Densidad de potencia en función de cada ciclo de la	
	CCM con bioánodo pre-acondicionado de	
	<i>S. marcescens</i> no pigmentada como	
	biocatalizador	103
41.	Sistema de monitoreo de mV-mA de CCM con	
	<i>S. oneidensis</i> como biocatalizador	104
42.	Actividad bioelectrogénica de CCM con bioánodo	
	pre-acondicionado de <i>S. oneidensis</i>	106
43.	Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM	
	con bioánodo pre-acondicionado de <i>S. oneidensis</i>	107
44.	Actividad bioelectrogénica de la CCM con cultivo planktónico	
	de <i>S. marcescens</i> no pigmentada	109
45.	Densidad de potencia en función de cada ciclo de la	

	CCM con cultivo planktónico de <i>S. marcescens</i>	
	no pigmentada	110
46.	Actividad bioelectrogénica de la CCM con cultivo planktónico de <i>S. oneidensis</i>	112
47.	Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM con cultivo planktónico de <i>S. oneidensis</i>	113

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
I. Ejemplos de mediadores redox	11
II. Información de tipos de CCMs	22
III. Matriz decodificada del diseño Plackett-Burman generado en Minitab para el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i>	47
IV. Matriz decodificada del diseño Plackett-Burman generado en Minitab para el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	49
V. Resultados de pruebas bioquímicas	56
VI. Resumen de la producción, porcentaje y tasa de reducción de Fe(III) a las 144 h de incubación por el cultivo pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	92
VII. Resumen de la producción, porcentaje y tasa de reducción de Fe(III) a las 144 h de incubación por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E	92
VIII. Resumen de la producción, porcentaje y tasa de reducción de Fe(III) a las 144 h de incubación por el cultivo de <i>S. oneidensis</i>	93
IX. Resumen de la producción, porcentaje y tasa de reducción de Fe(III) a las 144 h de incubación por el cultivo no pigmentado de <i>S. marcescens</i> 11E en presencia de prodigiosina exógena	93

X.	Diseño Plackett-Burman (factorial fraccionado) con UFC de <i>S. marcescens</i> no pigmentada como valor de respuesta	95
XI.	Diseño Plackett-Burman (factorial fraccionado) con UFC de <i>S. oneidensis</i> como valor de respuesta	97

NOMENCLATURA

TWh	Terawatt-hora
CCMs	Celdas de combustible microbianas
CCM	Celda de combustible microbiana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Tris Borato y EDTA
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
DSW	Medio de agua residual sintético
lbs/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
pb	Pares de bases
UFC	Unidades formadoras de colonias
FTIR	Espectroscopía en el infrarrojo por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
W/m ²	Watts por metro cuadrado
mW/m ²	MiliWatts por metro cuadrado
μW/cm ²	MicroWatts por centímetro cuadrado
W/cm ²	Watts por centímetro cuadrado
W/m ³	Watts por metro cúbico
mA	Miliamperios
mV	Milivolts
AQDS	Antraquinona 2,6 disulfonato

AQHS	Antraquinona 2 sulfonato
BRH	Bacteria reductora de hierro
°C	Grados Celsius
Mtr	Sistema respiratorio metálico (metal respiratory system)
MtrCy	Citocromo del sistema respiratorio metálico (metal respiratory System cytochrome)
OmcA	Citocromo A de membrana externa (outer membrane cytochrome A)
MtrC	Citocromo del tipo decahaem de membrana externa (outer membrane decahaemc-type cytochrome)
BHI	Infusión cerebro corazón
LB	Luria-Bertani
µg/mL	Microgramos por mililitro
mM	Milimolar
cm	Centímetros
Ω	Ohm
VP	Voges-Proskauer

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En 2016, la población humana se estimaba en 7 billones de habitantes y para el año 2050 la proyección es que la población mundial alcanzará los 9.4 billones de personas y será necesario proveer electricidad con el objetivo de satisfacer sus necesidades básicas (Ortman and Guarneri, 2019; Population Reference Bureau, 2016). Esta creciente población implica un desafío ya que actualmente se está llevando a cabo una sobre explotación de recursos tanto bióticos como abióticos, así como un excesivo uso de combustibles fósiles con lo cual ocurre también un aumento en la emisión de gases de efecto invernadero y en la generación de aguas residuales de diferente origen (*Crist et al.*, 2017; *Lin et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta esto, actualmente gran parte de la investigación científica se ha centrado en el desarrollo de tecnologías que utilicen fuentes renovables para la generación de electricidad las cuales producen menos daño al ambiente (*Biresselioglu et al.*, 2018). Entre las principales fuentes renovables

utilizadas o bajo investigación y desarrollo se encuentran la energía eólica, solar, geotérmica, oceánica, hidráulica y los sistemas bioelectroquímicos (Burke and Stephens, 2018; Ludin *et al.*, 2018; Pant *et al.*, 2012; Schiermeier *et al.*, 2008).

Los sistemas bioelectroquímicos son dispositivos que se basan en el principio de generar una respuesta eléctrica a partir del metabolismo microbiano por degradación de materia orgánica en el medio de cultivo. Esta respuesta eléctrica puede ser usada para diversos fines como el funcionamiento de dispositivos eléctricos o incluso su almacenamiento. (Logan *et al.*, 2019).

Los primeros trabajos en sistemas bioelectroquímicos fueron descritos por M.C. Potter en 1910 en su seminario titulado: “Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds” (Pant *et al.*, 2012). En este trabajo se define a la celda de combustible microbiana (CCM) como un sistema bioelectroquímico que generan electricidad por medio de la oxidación de glucosa por microorganismos. Posteriormente, diversos investigadores ampliaron el número de compuestos orgánicos que pueden ser utilizados como sustratos para la generación de electricidad. Entre estos compuestos químicos se encuentran el acetato, glicerol, lactato o distintos tipos de aguas residuales de origen industrial o doméstica (Christwardana *et al.*, 2018; Dang *et al.*, 2016^a, 2016^b; Ma *et al.*, 2016; Marone *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2016).

1.1 Celdas de Combustible Microbianas

Como se mencionó anteriormente, una CCM es un dispositivo bioelectroquímico en el cual el objetivo final es llevar a cabo la producción de energía eléctrica a partir de la degradación de compuestos orgánicos por medio de microorganismos exoelectrogénicos, generalmente bacterias. Cada uno de los componentes de una CCM típica son mostrados debajo (ver Figura 1). Este dispositivo consta de dos cámaras separadas por una membrana de intercambio de protones; una anódica que se encuentra en condiciones anaerobias y una catódica mantenida en condiciones aerobias (Chaijak *et al.*, 2018). En el interior de la cámara anódica se encuentran sustratos orgánicos que al ser oxidados a temperatura ambiente por microorganismos genera electrones que pueden ser transportados al exterior de la célula y ser transferidos hacia el ánodo y posteriormente ser transportados hacia el cátodo por medio de un circuito externo (Du *et al.*, 2018). Existen diversos tipos de celdas de combustible microbianas (CCMs), como lo son las de doble cámara, cámara sencilla, de cátodo al aire, tubulares, fotosintéticas y bentónicas (Chen *et al.*, 2017a, 2017b; Gajda *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Todos estos tipos de CCMs varían en cuanto a los tipos de

microorganismos a utilizar, el material del que están fabricados los electrodos y el tipo de sustrato a oxidar por parte de los microorganismos.

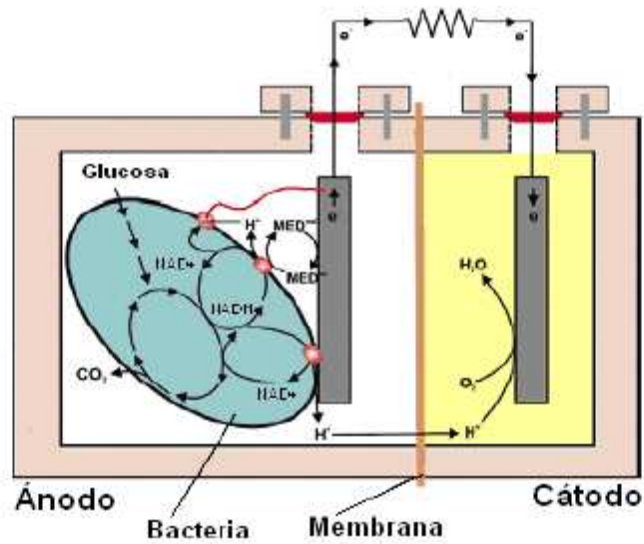


Figura 1. Diagrama típico de una celda de combustible microbiana (Modificado de Logan *et al.*, 2006).

1.2 Bioánodo

El bioánodo, esto es, el desarrollo de una biopelícula bacteriana sobre la superficie anódica de una CCM es el paso principal y uno de los componentes determinantes para la generación de electricidad en estos dispositivos. Esto debido a que el contacto físico facilita la transferencia de electrones desde el microorganismo hacia una superficie, en este caso el ánodo (Wahab *et al.*, 2018).

Es por esto que tres factores cobran gran importancia en el desempeño de la CCM: el material del cual está compuesto el ánodo, el sustrato que servirá como donador de electrones y el microorganismo utilizado (Jung and Pandit, 2018).

1.3 Microorganismos exoelectrogénicos

Diversos microorganismos han sido utilizados como inóculos para formar un bioánodo, en este aspecto es importante el remarcar el que no todos los microorganismos poseen capacidad exoelectrogénica, esto es, llevar a cabo la transferencia de electrones hacia un ánodo que funcione como aceptor final de electrones y de esta forma generar electricidad en una celda de combustible microbiana (Prakasham and Kumar, 2018).

El uso de lodos activados como inóculo, provenientes de diversas industrias, han sido utilizados con el objetivo de producir biopelículas sobre ánodos de CCMs (Kim *et al.*, 2004; Liu Hong, 2004; Wu *et al.*, 2019). Un excelente ejemplo de estudios que utilizaron lodos activados como inóculos fue el llevado a cabo en 2018 por Yakar y colaboradores, los cuales desarrollaron sobre electrodos de grafito plano un lodo activado aislado de un reactor metanogénico. Del mismo modo, Meng y colaboradores (2019) desarrollaron un biopelícula sobre un ánodo

de base titanio a partir de un inóculo que provenía de un biorreactor anaerobio utilizado para el tratamiento de aguas residuales (Meng *et al.*, 2019).

Recientemente se han utilizado inóculos de lodos activados como fuente de microorganismos exoelectrogénicos para la construcción de bioánodos (Wang *et al.*, 2018). Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Makhtar y colaboradores (2018), en el cual se desarrolló una biopelícula sobre un ánodo de grafito utilizando como inóculo lodo activado proveniente de un digestor anaerobio (Makhtar *et al.*, 2018).

Algunos estudios han utilizado cultivos puros de microorganismos con resultados variables en cuanto a la densidad de potencia generada. En el 2010, Kiely y colaboradores encontraron que bacterias pertenecientes a *Shewanella putrefaciens* que formaban parte de un consorcio bacteriano mixto y en el cual se encontraban en baja proporción, eran capaces de producir una densidad de potencia de 17.4 mW/m² en comparación con la producida por el cultivo mixto (10.1 mW/m²) (Kiely *et al.*, 2010). Tomando así relevancia el ensayo de generación de electricidad por parte de cultivos puros identificados en CCMs ya que cada especie posee una capacidad exoelectrogénica muy particular que en ocasiones puede ser enmascarada o inhibida por la presencia de otros microorganismos por ejemplo en los consorcios microbianos o lodos activados.

Un ensayo usual para determinar de forma rápida si un microorganismo posee capacidad exoelectrogénica es el determinar su poder de reducción de Fe(III) o Mn(IV) (Wang *et al.*, 2018). Mediante dicho ensayo se han identificado diferentes microorganismos que han sido probados en CCMs y han mostrado

resultados variables en cuanto a la generación de densidad de potencia (Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014).

1.4 Mecanismos de transferencia de electrones

Se han propuesto tres principales mecanismos para explicar la forma en que diversos microorganismos llevan a cabo la transferencia de electrones hasta el aceptor final (ver Figura 2), siendo este el ánodo para el caso de una CCM: i) transferencia directa de electrones por medio de citocromos de superficie. ii) transferencia indirecta de electrones utilizando un mediador redox y iii) por medio de pilis (Harnisch *et al.*, 2011; Nealson, 2017).

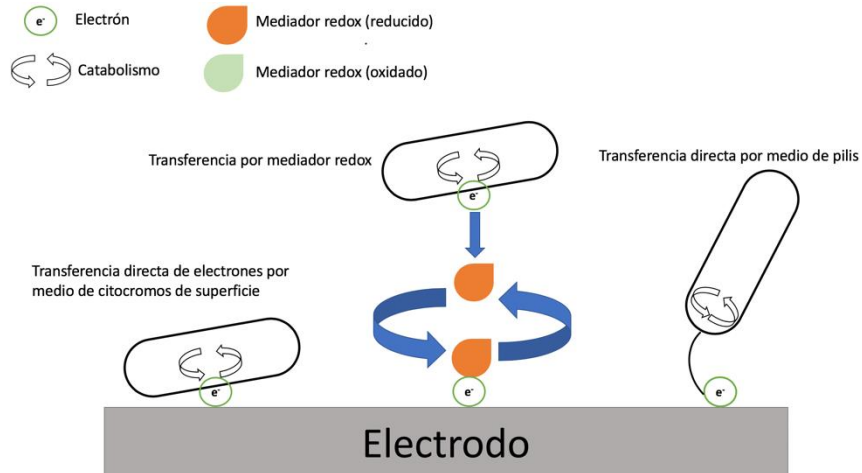


Figura 2. Mecanismos de transferencia de electrones a un aceptor final.

1.5 Transferencia directa de electrones

Dentro de los microorganismos que se han identificado realizan transferencia directa de electrones a ánodos utilizando citocromos de superficie de membrana del tipo C se encuentran las bacterias pertenecientes a los géneros *Shewanella* (Bücking *et al.*, 2010) y *Geobacter* (Lovley, 2012). En estos mismos géneros bacterianos se ha demostrado el uso de pilis (también conocidos como nanocables) como un medio utilizado por el microorganismo para entrar en contacto directo con un electrodo que funciona como aceptor distante de electrones (Stöckl *et al.*, 2019).

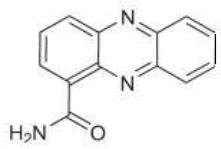
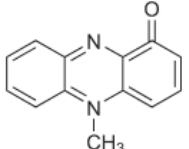
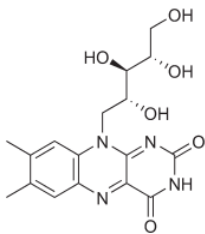
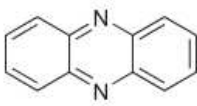
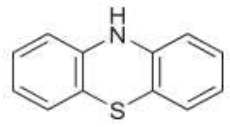
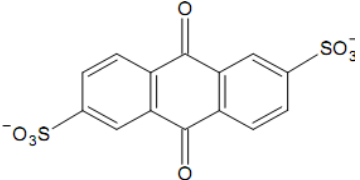
1.6 Transferencia indirecta de electrones

Por otra parte, la transferencia indirecta de electrones utilizando (i) mediadores redox endógenos (metabolitos secundarios producidos por el microorganismo) como la piocianina (Lu *et al.*, 2018) y fenazina-1-carboxamida (Zhang *et al.*, 2018) ambas producida por bacterias del género *Pseudomonas*, 2,6-di-terbutil-p-benzoquinona en *Klebsiella* (Melo-Nascimento *et al.*, 2018) y riboflavina en *Shewanella* (Yano *et al.*, 2018) o (ii) mediadores redox exógenos (compuestos orgánicos o inorgánicos artificiales) como el 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (In Ho *et al.*, 2011), azul de metileno (Ortega *et al.*, 2018) rojo de metilo (Yuan and Minteer, 2019) y antraquinona 2,6 disulfonato (AQDS) (Dantas *et al.*, 2018) ha sido documentada también en diversas investigaciones. Las estructuras químicas de algunos mediadores redox reportados en la literatura son mostrados en el presente documento (ver TABLA I).

La prodigiosina, es un metabolito secundario producido por diversas bacterias Gram-negativas, principalmente del género *Serratia* (ver Figura 3). Esta molécula muestra similitudes estructurales con las moléculas redox presentadas anteriormente. Es por esto por lo que algunas referencias indican que esta molécula presenta un comportamiento catalítico/redox. Sin embargo, en la

actualidad es desconocida su contribución como mediador redox exógeno (Domagala *et al.*, 2015; Tomat, 2016).

TABLA I.
EJEMPLOS DE MEDIADORES REDOX

Estructura	Mediador	Referencia
A) Endógenos	Nombre	
	Fenazina-1-carboxamida	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
	Piocianina	(Shang <i>et al.</i> , 2018)
	Riboflavina	(Yano <i>et al.</i> , 2018)
B) Exógenos		
	Rojo neutro	(Mardiana <i>et al.</i> , 2015)
	Azul de metileno	(Christwardana <i>et al.</i> , 2018b)
	Antraquinona-2,6-disulfonato	(Tsao <i>et al.</i> , 2019)

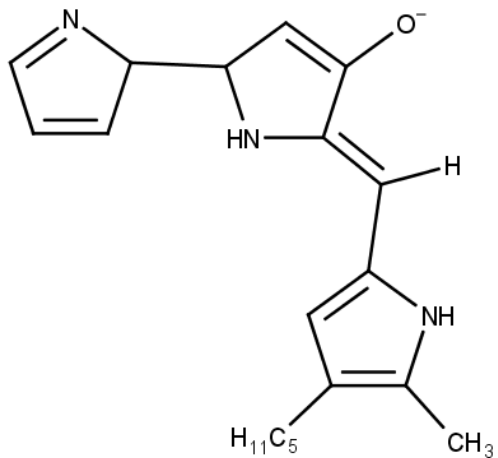


Figura 3. Estructura de la prodigiosina.

Por otra parte, es importante también el mencionar los diferentes sustratos a distintas concentraciones que han sido utilizados como donadores de electrones en CCM y que están ligados directamente al desempeño obtenido por estos dispositivos. Entre los sustratos utilizados se encuentran: acetato (Kodali *et al.*, 2017), butirato (Zhang *et al.*, 2011) y agua residual adicionada con glucosa (Huang *et al.*, 2017). En los casos anteriores la densidad de potencia producida fue de: $178 \mu\text{W cm}^{-2}$, 470mW m^{-2} y 320mW m^{-2} respectivamente.

1.7 Electrodo

Por último, un factor que también toma relevancia en el desempeño de una CCM es el material del que está hecho el electrodo a utilizar. Este material debe contar con ciertas características como lo son el que sean conductivos, biocompatibles y estables en la solución contenida en la cámara anódica (Huggins *et al.*, 2014; Logan *et al.*, 2018). Los materiales carbonáceos (carbón y grafito) han sido los materiales anódicos más utilizados debido a que son altamente conductivos, químicamente estables, biocompatibles y de bajo costo (Chen *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2011).

En 2003, Bond y Lovley utilizaron un ánodo de grafito sobre el cual se desarrolló una biopelícula de *Geobacter* de forma abundante y por el cual obtuvieron durante el análisis de la reacción bioelectroquímica una densidad de potencia de 65 mW/m² (Holmes *et al.*, 2004). Por otra parte, en el año 2010, Kiely y colaboradores reportaron el desarrollo de una biopelícula de un consorcio bacteriano sobre fibra de grafito y mediante el uso de microscopia electrónica de barrido mostraron la formación de una biopelícula gruesa y abundante formado por células que poseían numerosos pilis. La densidad de potencia generada por este sistema fue de 10 mW/m² (Kiely *et al.*, 2010).

En el 2013, Zhu y colaboradores lograron desarrollar una biopelícula de lodos activados sobre un ánodo de tela de carbón. En este estudio reportaron la generación de una alta densidad de potencia (1200 mW/m^2) la cual corresponde a una de las densidades de potencia más altas generadas por una CCM (Zhu et al., 2013).

Con el objetivo de estudiar la capacidad de *Serratia* para ser utilizada como bioánodo en una CCM primero es necesario el determinar si es un organismo exoelectrogénico, entender cómo es que lleva a cabo esta transferencia de electrones y determinar si existe interacción alguna que afecte su desempeño.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Como anteriormente se mencionó, el bioánodo de una CCM es uno de los puntos principales que determinan el desempeño del dispositivo (*Breheeny et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2010). Es por esto por lo que es de suma importancia tres factores y que merecen ser estudiados: i) el microorganismo a utilizar, ii) el material del cual está fabricado el electrodo y iii) el sustrato que servirá como donador de electrones (Chung and Okabe, 2009; Kumar *et al.*, 2018). En el caso de los microorganismos utilizados, estos deben ser exoelectrogénicos, esto es que tengan capacidad de transportar electrones desde su superficie celular hasta un aceptor terminal de electrones como lo es el hierro, utilizando para esto citocromos de superficie, pilis o algún transportador redox; ya sea endógeno o exógeno (ver Figura 4). Los principales ensayos realizados para determinar exoelectrogenicidad de microorganismos son evaluando su capacidad para reducir Fe(III) en su forma ya sea soluble o insoluble a Fe(II).

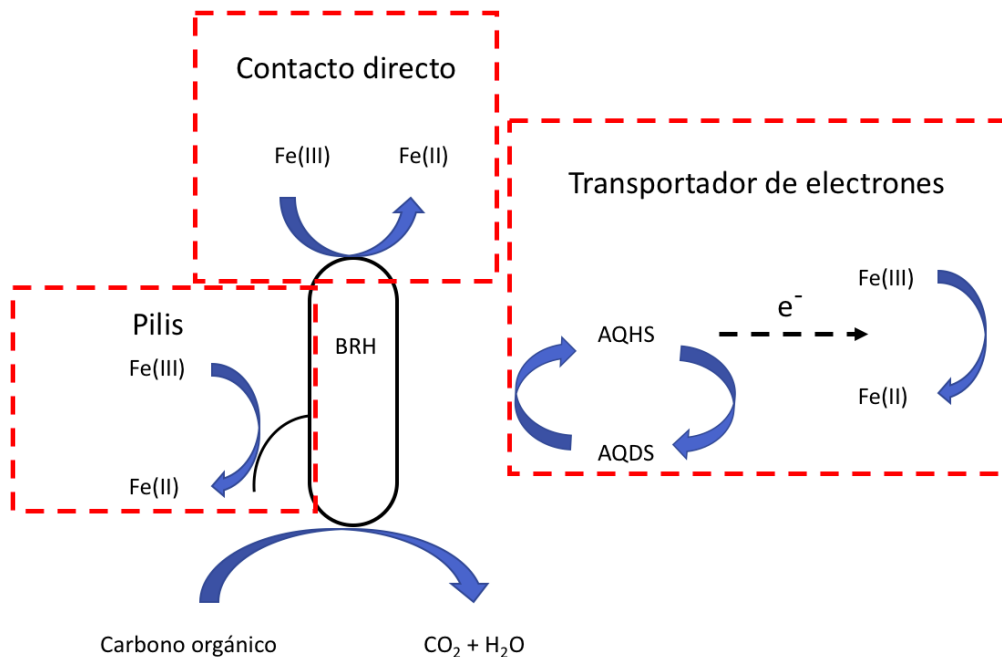


Figura 4. Mecanismos de reducción de Fe(III).
 *BRH: Bacteria reductora de hierro.

Históricamente, este tipo de reducciones bacterianas han sido estudiadas desde 1994 por Lovley y colaboradores, los cuales encontraron que diferentes bacterias aisladas de diversas matrices ambientales son capaces de llevar a cabo la oxidación de distintas fuentes de carbono, extraer los electrones y reducir Fe(III). En su estudio también describieron como esta reducción aumenta cuando en el medio se encuentran presentes ácidos húmicos de diferente pureza. Este trabajo representa el primero realizado en el área de las reducciones bacterianas utilizando mediadores redox exógenos y como biocatalizador a la bacteria *Geobacter metallireducens* (Lovley *et al.*, 1996). Posterior a este estudio se

realizaron diversas investigaciones en diferentes aislados bacterianos con el objetivo de determinar su capacidad para reducir Fe(III), entre ellos se encuentran aquellos que evaluaron la presencia de mediadores redox endógenos. Fuller y colaboradores investigaron las características de crecimiento y de reducción de un consorcio bacteriano aislado del desecho generado en una planta procesadora de residuos minerales para la recuperación de Cr(VI). En sus resultados encontraron que el consorcio aislado lleva a cabo la reducción de Fe(III) utilizando riboflavina, una molécula orgánica generada durante su crecimiento, como mediador redox (Fuller *et al.*, 2014). El aislamiento de bacterias exoelectrogénicas se ha realizado también a partir de matrices ambientales en las cuales se ha estudiado la reducción de cristales insolubles de óxidos de Fe(III). Este es el caso del estudio realizado en 2015, en donde bacterias pertenecientes al género *Geobacter* y *Pelobacter* fueron aisladas y su capacidad de reducción fue ensayada en el laboratorio utilizando como donador de electrones acetato (Hori *et al.*, 2015). Posteriormente, la reducción de óxidos de hierro y silicatos de hierro llevada a cabo por la bacteria *Geobacter sulfurreducens* también fue estudiada y modelada por medio de espectroscopia de Mossbauer (T. Wu. *et al.*, 2017).

Finalmente, Nixon y colaboradores en el año 2016 aislaron diversas bacterias pertenecientes a los géneros *Desulfosporosinus* y *Geobacter* de medio ambientes glaciales. En este estudio, se muestra que la reducción es llevada a cabo a temperaturas tan bajas como lo son los 4 y 15 °C, siendo los 4 °C donde estas bacterias aisladas llevan a cabo una mayor tasa de reducción (Nixon *et al.*, 2017).

Por otra parte, es importante mencionar que el estudio de la reducción de diversos compuestos orgánicos mediada por moléculas redox exógenas ha sido investigada en diversas bacterias. Estos ensayos a los que distintas bacterias han sido sometidas son, de la misma manera que los realizados utilizando Fe(III), preámbulo a ensayos en CCMs. En 2004, dos Santos y colaboradores, estudiaron el impacto de diversos mediadores redox en la reducción de colorantes azo, utilizando como biocatalizadores lodo anaeróbico granular. En este estudio, se demostró que los mediadores redox exógenos antraquinona-2,6-disulfonato y antraquinona-2-sulfonato incrementan hasta en 8 veces la reducción del colorante (dos Santos *et al.*, 2004). En un estudio diferente llevado a cabo por Costa y colaboradores, se evaluó el efecto catalítico de una de las moléculas mencionadas anteriormente. La antraquinona-2,6-disulfonato mostró que aumenta en 3.5 veces la reducción del colorante rojo congo cuando se utiliza etanol como donador de electrones y un lodo activado como biocatalizador (Costa *et al.*, 2010). De la misma manera, en un estudio posterior se mostró que el azul de metileno utilizado como mediador redox aumenta la tasa de reducción hasta en un 99.25 % del colorante azo rojo congo; esto al utilizar *Shewanella oneidensis* MR-1 como biocatalizador (Liu *et al.*, 2016).

De la misma forma en que se ha estudiado ampliamente la reducción que llevan a cabo bacterias por medio de moléculas endógenas y exógenas que funcionan como mediadores redox, algunos estudios han ahondado en la reducción que es llevada a cabo por otros medios como lo son citocromos de superficie y pilis (llamados nano-cables recientemente).

En 2005, estudios en los cuales las proteínas de citocromos *omcS* y *omcE* fueron suprimidas en su síntesis en una cepa de *Geobacter sulfurreducens*, se demostró la incapacidad de esta bacteria para llevar a cabo la reducción de óxidos de Fe(III) y citrato de Fe(III). En el mismo estudio se demostró que esta cepa mutante solo podría reducir estos compuestos de Fe(III) si al medio de cultivo se agregaba el agente quelante ácido nitrilotriacético o el mediador redox antraquinona-2,6-disulfonato (Mehta *et al.*, 2005). Posteriormente, Coursolle y colaboradores utilizando cepas mutantes de *Shewanella oneidensis* mostraron que la vía MTr integrada por los citocromos MtrCy OmcA son esenciales para llevar a cabo la reducción de metales (Coursolle *et al.*, 2010). Otro método de transporte de electrones hacia un aceptor final que ocurre en bacterias es aquel en que los pilis actúan como transportadores directos. Diversos estudios han mostrado esta capacidad de algunas bacterias pertenecientes al género *Shewanella*. En 2005, Gorby y colaboradores estudiaron diversos mutantes de la cepa *Shewanella oneidensis* MR-1 en la cual no se expresaban los genes MtrC y OmcA que codifican para proteínas de citocromo que integran los pilis de esta bacteria. Estos mutantes mostraron nula habilidad para llevar a cabo la reducción de óxido de Fe(III) (Gorby *et al.*, 2006). Posteriormente, El-Naggar y colaboradores mostraron que los pilis de *Shewanella oneidensis* MR-1 son eléctricamente conductivos y que poseen altas tasas de transporte de electrones. Esto mediante pruebas de conductividad utilizando microscopia de fuerza atómica a lo largo de un pili. En el mismo estudio se demostró que mutantes deficientes en los citocromos MtrC y OmcA producen pilis morfológicamente

similares a los producidos por la cepa que no presenta mutación pero que presentan la característica de ser no conductores (Barrozo *et al.*, 2018).

Un factor clave a considerar en los dispositivos de generación de energía eléctrica como lo son las CCM es el material del cual está hecho el ánodo. Se han probado históricamente diversos tipos de materiales que al ser usados como ánodos o cátodos muestran mejorar el desempeño en función de la densidad de potencia generada por tanto la elección del electrodo en el cual se buscará generar un bioánodo que posea las características de alta conducción, biocompatible con el microorganismo biocatalítico a utilizar y que sea estable en la solución contenida en la cámara anódica (Corbella and Puigagut, 2018). Anteriormente, numerosos materiales carbonáceos han sido utilizados como base para inmovilizar los microorganismos. En el caso de los electrodos planos, los materiales más comunes del que están hechos son papel de carbono, platos de carbono y tela de carbono (Zikmund *et al.*, 2018). En el caso de electrodos de grafito rugoso fueron utilizados por Ter Heijne y colaboradores en 2008 y en su estudio reportaron la generación de una mayor densidad de potencia en comparación con los producidos utilizando como electrodos grafito plano (Ter Heijne *et al.*, 2008). En 2008, Zhao y colaboradores demostraron la generación de electricidad utilizando una CCM de una cámara con cátodo aéreo y utilizando como ánodo tela de carbón activado y como biocatalizador *Desulfovibrio desulfuricans*. La densidad de potencia obtenida en este estudio fue de 0.51 mW/cm² (Zhao *et al.*, 2008). En otro estudio realizado en 2009, y utilizando carbón activado granular, como biocatalizador los microorganismos que se encontraban en agua residual doméstica en una CCM de una cámara se

obtuvieron densidades de potencia de 5 W/m^3 (Jiang and Li, 2009). Ánodos fabricados con tela de carbono han sido utilizados también en CCMs. En 2009, Zhang y colaboradores generaron una densidad de corriente de 46 W/m^3 utilizando este tipo de ánodo en una CCM de una cámara con cátodo aéreo (Zhang *et al.*, 2009). Posteriormente en 2016, Cheng y colaboradores llevaron a cabo la generación de una densidad de potencia máxima de 773 mW/m^3 utilizando tela de carbono como ánodo en una CCM de una cámara con cátodo aéreo y utilizando como inóculo el efluente de una CCM con 3 meses de operación (Cheng *et al.*, 2017). Finalmente, en 2017 Wu y colaboradores produjeron una densidad de potencia de hasta 150 % mayor al utilizar una mezcla de malla de carbón y cepillo de carbono en comparación a cuando se utiliza solamente malla de carbón (S. Wu *et al.*, 2017).

El sustrato donador de electrones y la configuración de la CCM a utilizar son otros factores importantes que considerar. Se ha encontrado que la altura, ancho, y la forma geométrica de las cámaras anódicas y catódicas están relacionadas directamente con la densidad de potencia generada por el dispositivo (Logan *et al.*, 2015). En el caso de los sustratos utilizados, la respuesta en cuanto a densidad de potencia varía dependiendo del microorganismo utilizado o del tipo de lodo activado, ya sea aerobio o anaerobio. Por tanto, es difícil predecir el tipo de respuesta a obtener en función del uso de glucosa, acetato, lactato, etanol, fumarato o algún otro compuesto que pueda ser usado como donador de electrones (Zhang *et al.*, 2019). En los últimos años se han probado diferentes tipos de configuraciones de CCMs, mostrando resultados variados en la densidad de potencia generada por estos dispositivos (Ge and He,

2016; Huang *et al.*, 2016; Ieropoulos *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017, 2015; Mecheri *et al.*, 2016).

Los tipos de CCM estudiadas durante los 2 últimos años, el tipo de ánodo utilizado, sustrato alimentado y la densidad de potencia obtenida en el dispositivo completo son mostradas en el presente documento (ver TABLA II).

TABLA II.
INFORMACIÓN DE TIPOS DE CCMs

Tipo de CCM	Sustrato	Biocatalizador	Ánodo	Densidad de potencia	Referencia
CCM de doble cámara	Agua residual de industria farmacéutica	Lodo activado	Barra de grafito	204.9 mW/m ²	(Ismail and Habeeb, 2017)
CCM de una cámara con cátodo aéreo	Agua residual sintética y glucosa (500 mg/L)	Lodo activado	Tela de grafito	0.32 W/m ²	(Huang <i>et al.</i> , 2017)
CCM de una cámara	Agua residual sintética y acetato de sodio (3 g/L)	Lodo activado	Carbón activado	178 μW/cm ²	(Kodali <i>et al.</i> , 2017)
CCM tubular de una cámara y cátodo aéreo	Solución de NaCl (35 mg/L) y residuos de frutas y vegetales	Microorganismos provenientes de los residuos de frutas y vegetales	Cepillo de fibra de carbón	55 mW/m ²	(Jannelli <i>et al.</i> , 2016)
CCM de doble cámara	Buffer de fosfato y glucosa	Lodo activado	Filtro de carbón	65.4 mW/m ²	(Chen <i>et al.</i> , 2017a)
CCM de terractota	Agua residual y acetato de sodio	Lodo activado	Fibra de carbón	1.71 mW/cm ²	(Gajda <i>et al.</i> , 2017)
CCM de doble cámara	Agua residual sintética (14.1 mS/cm) y acetato de sodio	Consorcio marino	Filtro de carbón	1.9 mW/m ³	(Margaria <i>et al.</i> , 2017)
CCM con cátodo aéreo acoplado a un humedal	Buffer de fosfatos, sacarosa y acetato de sodio	<i>Escherichia coli</i>	Fibra de carbón con nanopartículas de alúmina y níquel	1540 mW/m ²	(Gupta <i>et al.</i> , 2017)
CCM osmótica	Medio mínimo de sales y acetato de sodio	Lodo anaerobio	Cepillo de carbón	1.8 A/m ²	(Qin <i>et al.</i> , 2017)
CCM de doble cámara	Agua residual de viñería	Lodo activado	Tela de carbón	420 mW/m ²	(Penteado <i>et al.</i> , 2016)
CCM fotosintética	Agua residual diluída	Lodo activado y microalgas	Cepillo de carbón	200 mA/m ²	(Ma <i>et al.</i> , 2017)

Como se muestra en el cuadro anterior, diversas investigaciones se han enfocado en estudiar la generación de densidad de potencia producida en distintos tipos de CCMs, utilizando lodos activados, distintos tipos de electrodos y diferentes fuentes de carbono como donadores de electrones. Sin embargo, no existen reportes que hayan llevado a cabo el aislamiento de una cepa bacteriana en la cual se estudie en primera instancia la reducción de Fe(III) con el objetivo de evaluar su capacidad exoelectrogénica, producción controlada de una biopelícula sobre un ánodo para generar un bioánodo con característica deseada y finalmente el probarlo en una celda de combustible microbiana de doble cámara con membrana protónica. Por lo tanto, la generación de conocimiento va enfocada a responder los siguientes cuestionamientos que nos permitirán alcanzar los objetivos de investigación trazados.

¿Bacterias del género *Serratia* son capaces de llevar la reducción de Fe(III) en su forma soluble e insoluble?

¿Es posible llevar a cabo la generación de un bioánodo utilizando grafito como electrodo base y un cultivo de bacterias del género *Serratia* y que posteriormente sea utilizado en una CCM?

¿Es posible optimizar el desempeño de una CCM que utiliza bacterias del género *Serratia* como biocatalizador?

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

La producción de bioánodos bacterianos en materiales conductores de electricidad ha atraído la atención de diversos investigadores que estudian las CCMs (Fang *et al.*, 2015; Fraiwan *et al.*, 2013; Lay *et al.*, 2015; Logan *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013; Oyiwona *et al.*, 2018; Tommasi y Lombardelli, 2017; Trapero *et al.*, 2017; Yellappa *et al.*, 2019; Zang *et al.*, 2012). Desafortunadamente, pocos grupos se han enfocado en algunos aspectos biológicos de suma importancia como el tratar de elucidar si la transferencia de electrones ocurre de forma directa o indirecta, la producción controlada de la biopelícula que colonizará el ánodo, aspectos metabólicos-nutricionales, y microambientales de los microorganismos utilizados. La importancia de este último punto radica en que la manipulación de algunas de estas condiciones

produce un cambio en el desempeño del dispositivo bioelectroquímico en función de la densidad de potencia generada.

En el presente trabajo se evaluará la capacidad para reducir Fe(III) por un cultivo de *Serratia* en su forma pigmentada y no pigmentada. Posteriormente, se producirá una biopelícula de este cultivo y se evaluará su capacidad para transferir los electrones obtenidos a partir de la oxidación de un donador de electrones hacia un material carbonáceo con la finalidad de ser utilizado como bioánodo en una CCM.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La biopelícula de *Serratia* tiene la capacidad de transferir electrones a partir de la oxidación de un donador de electrones a un material carbonáceo con la finalidad de desarrollar un bioánodo con posible aplicación en una celda de combustible microbiana.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de una biopelícula de *Serratia* para transferir electrones a un material carbonáceo a partir de la oxidación de un donador de electrones con la finalidad de desarrollar un bioánodo con potencial aplicación en una celda de combustible microbiana.

5.2 Objetivos específicos

- I. Caracterización molecular del cultivo de *Serratia*
- II. Determinar la capacidad exoelectrogénica de *Serratia*
- III. Desarrollar una biopelícula de *Serratia* y establecer las condiciones para la generación de un bioánodo
- IV. Determinar el desempeño del bioánodo en una celda de combustible microbiana

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del desarrollo del proyecto

La realización de este proyecto de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en los Laboratorios del Centro del Agua y en el Centro de Tecnología Avanzada para la Producción del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

6.2 Materiales

6.2.1 Equipos

Todos los equipos utilizados para el desarrollo de este proyecto así como sus modelos son especificados en la sección de Métodos.

6.2.2 Reactivos

Los reactivos utilizados para el desarrollo de este proyecto, así como sus marcas son claramente especificados en la sección de Métodos.

6.3 Métodos

6.3.1 Identificación del cultivo bacteriano por medio de pruebas bioquímicas

El aislado bacteriano productor de prodigiosina parcialmente identificado como *Serratia* sp. perteneciente al cepario del laboratorio de Biotecnología fue inoculado en 5 mL de caldo LB e incubado a 28 °C por 24 horas. Posteriormente, este cultivo fue utilizado para inocular los medios para pruebas bioquímicas: producción de pigmento en caldo BHI, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citratos, producción de H₂S, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, motilidad, gelatinasa, producción de gas, fermentación de glucosa, fermentación de lactosa y fermentación de sacarosa. Después de esto, los medios de cultivo fueron incubados según lo recomendado por Harley y Prescott (2002). Finalmente se realizó la comparación de los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura.

6.3.2 Caracterización molecular de *Serratia*

Con el objetivo de llevar a cabo la identificación molecular de la bacteria *Serratia* se realizó la extracción del ADN del cultivo bacteriano por el método de extracción fenol-cloroformo. Posteriormente, se amplificó la subunidad ribosomal pequeña 16S y finalmente se llevó a cabo la secuenciación por el método de Sanger. Los primers utilizados fueron los reportados por Souza y colaboradores (2006):

F515 (Forward) 5'-GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GCC AGC AGC
CGC GGT AA-3'

R1492 (Reverse) 5'- GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT
ACG ACT T - 3'

Se llevó a cabo la alineación de los primers para verificar la amplificación en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tolol/primer-blast/>. Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de DNA bacteriano, 1X PCR buffer (Promega), 1.65 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.5 µM de cada primer, 2 unidades de Taq Polimerasa (Promega). El programa de amplificación fue el siguiente: 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 92 °C por 1.5 minutos, 50 °C por 1.5 minutos, 72 °C por 2 minutos y extensión final a 72 °C por 10 minutos en un termociclador miniMJ de Bio-Rad.

Posteriormente el análisis del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1X adicionado con bromuro

de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. Al final de la electroforesis se llevó a cabo la visualización del gel utilizando un transiluminador (Spectroline ultraviolet transilluminator, Wetsbury, New York).

Para realizar la purificación del producto de PCR se cargaron 50 µL en un gel de agarosa al 1 %, se realizó la electroforesis y las bandas de aproximadamente 1000 pb fueron cortadas con bisturí y se sometieron a un proceso de purificación mediante el kit de purificación de productos de PCR desde geles de agarosa (Minelute gel extraction kit de QiaGene). Posteriormente, 2.5 µL del producto de PCR puro se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % esto para comprobar que el tamaño de banda fuera de 1000 pb. A partir de los productos de amplificación purificados anteriormente mencionados se realizó la secuenciación mediante el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975).

6.3.3 Producción de un cultivo pigmentado de *Serratia*

Para el desarrollo del inóculo, se utilizó una asada del cultivo indicado en el punto 6.3.1 y se inoculó en 5 mL de medio cacahuate al 1 % estéril, posteriormente se incubó por 24 horas a 28 °C. A partir de este cultivo se tomó de manera aséptica 1.5 mL y se inoculó en 15 mL de caldo cacahuate al 1 %

estéril, posteriormente se incubó por 24 horas a una temperatura de 28 °C y 150 rpm. Después del período de incubación se tomaron 10 mL del cultivo y se inocularon en 100 mL de medio cacahuate estéril contenido en un matraz Erlenmeyer, este cultivo se incubó por 20 horas a 28 °C y 150 rpm. Después de este último período de incubación, se tomaron 10 mL y se centrifugaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL de volumen por 20 minutos a 4 °C y 4,600 rpm. Posteriormente, se decantó el contenido del tubo Falcon y se agregaron 10 mL de solución salina al 0.85 % y se sometió a vortex por 1 minuto con el objetivo de lavar las células. Después de esto, se realizó un nuevo período de centrifugación por 20 minutos a 4 °C y 150 rpm, se decantó el contenido del tubo Falcon y se re-suspendieron con la cantidad necesaria de solución salina al 0.85% para ajustar la densidad óptica a 0.6, medida a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (Varian 50 Tablet, Palo Alto, California). Este fue el inóculo pigmentado de *Serratia* con color rojo producto de la generación de prodigiosina.

6.3.4 Producción de un cultivo no pigmentado de *Serratia*

Con el objetivo de obtener un cultivo de *Serratia* en el cual no hubiera producción de prodigiosina se realizó una búsqueda en literatura para encontrar los factores que inhiben la producción de este metabolito secundario. Se encontró

que los principales factores son: la densidad celular y la presencia altas concentraciones de glucosa en el medio. Se decidió realizar un ensayo para evaluar la concentración mínima de glucosa necesaria para evitar la producción de prodigiosina en medio LB. Se utilizó una asada del cultivo conservado en agar LB inclinado y se inocularon 5 mL de medio LB estéril adicionado con glucosa al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 %. Se incubaron por 24 horas a 28 °C. A partir de estos cultivos se tomaron de manera aséptica 1.5 mL de cada uno de los tubos y se inocularon en viales de vidrio con tapón de rosca que contenían 15 mL de caldo LB adicionado con glucosa al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % (cada cultivo se inoculó a la respectiva concentración de la cual provenía). Posteriormente, los viales inoculados se incubaron a 28 °C, 150 rpm por 24 horas. Después del período de incubación cada uno de los cultivos se inocularon en su respectivo matraz conteniendo 100 mL de caldo LB adicionado con glucosa al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 %. Finalmente, estos cultivos se incubaron a 28 °C, 150 rpm por 20 horas, después de lo cual se hizo una inspección visual para evaluar la producción de prodigiosina en el medio.

A partir del cultivo en el cual no hubo producción de prodigiosina se tomaron 10 mL y se centrifugaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL de volumen por 20 minutos a 4 °C y 4,600 rpm. Después de esto, se decantó el contenido del tubo Falcon y se agregó 10 mL de solución salina al 0.85 % y se sometió a vortex por 1 minuto con el objetivo de lavar las células. Posteriormente se centrifugó de nuevo por 20 minutos a 4 °C y 150 rpm, se decantó el contenido del tubo Falcon y se re-suspendieron con la cantidad necesaria de solución salina estéril al 0.85% para ajustarlas a una densidad óptica de 0.6, medida a 600 nm en un

espectrofotómetro (Varian 50 Tablet, Palo Alto, California). Este fue el inóculo del cultivo no pigmentado de *Serratia*.

6.3.5 Producción de un cultivo de *Shewanella oneidensis*

Con el objetivo de contar con un punto de comparación del desempeño reductor de Fe(III) de ambos fenotipos (pigmentado y no pigmentado) de *Serratia* con un organismo ampliamente identificado como reductor de Fe(III), se desarrolló un inóculo de la bacteria exoelectrogénica y reconocida en la literatura como reductora de Fe(III) *Shewanella oneidensis*. Para esto, se utilizó una asada de un cultivo en agar inclinado de *S. oneidensis*, la cual se inoculó en 5 mL de medio LB estéril. Posteriormente se incubó por 24 horas a 30 °C. A partir de este cultivo se tomaron de manera aséptica 1.5 mL y se inocularon en 15 mL de caldo LB estéril, posteriormente se incubó por 24 horas a una temperatura de 30 °C y 150 rpm. Después del período de incubación se tomaron 10 mL del cultivo y se inocularon en 100 mL de medio LB estéril contenido en un matraz Erlenmeyer, este cultivo se incubó por 20 horas a 30 °C y 150 rpm. Después de este último período de incubación, se tomaron 10 mL y se centrifugaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL de volumen por 20 minutos a 4 °C y 4,600 rpm. Posteriormente, se decantó el contenido del tubo Falcon y se agregaron 10 mL de solución salina

al 0.85 % y se sometió a vortex por 1 minuto con el objetivo de lavar las células. Después de esto, se realizó un nuevo período de centrifugación por 20 minutos a 4 °C y 150 rpm, se decantó el contenido del tubo Falcon y se re suspendieron con la cantidad necesaria de solución salina al 0.85% para ajustar la densidad óptica a 0.6, medida a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (Varian 50 Tablet, Palo Alto, California). Este fue el inóculo de *S. oneidensis*.

6.3.6 Reducción de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *Serratia*

Para determinar si la cepa pigmentada de *Serratia* lleva a cabo la reducción de Fe(III), se utilizó el medio de cultivo denominado agua residual sintética (SDW, por sus siglas en inglés) desarrollado por Venkata Mohan (2007); el cual posee la siguiente composición (por litro de agua desionizada): [KH₂PO₄- 0.25, NH₄Cl - 0.5, K₂HPO₄ - 0.25, MgCl₂.6H₂O - 0.3, FeCl₃ - 0.025, NiCl₄ - 0.016, CoCl₂ - 0.025, ZnCl₂ - 0.0115, CuCl₂ - 0.0105, CaCl₂ - 0.005, MnCl₂ - 0.015, acetato de sodio (20 mM) como donador de electrones, y 20 mM de citrato de Fe(III) (forma soluble) o de Fe₂O₃ (forma insoluble) como aceptor de electrones]. El pH del medio se ajustó a 7 y se depositaron 60 mL del medio en frascos de volumen de 80 mL.

El medio se calentó a ebullición en baño de agua por 30 minutos y se burbujeó N₂ gas por 30 minutos. Posteriormente los viales se sellaron y se esterilizaron por autoclave a 121 °C, 15 lbs pulg⁻² por 15 minutos. Este medio fue inoculado con el 10 % v/v de células del cultivo pigmentado de *Serratia* preparadas como se indica en el punto 6.3.3. Los viales se incubaron a la oscuridad en condiciones anaerobias a una temperatura de 28 °C y se tomó muestra periódicamente de ellos utilizando jeringas mediante técnicas microbiológicas asépticas y se analizó el contenido de Fe(II) por medio del método de la ferrozina de acuerdo con la metodología descrita por Lovley y Philips en 1986. En este método el Fe(II) fue cuantificado disolviendo 0.5 mL de muestra en 2 mL de HCl 0.5 N por 1 hora. Posteriormente se hizo reaccionar con la ferrozina (Sigma) por 10 minutos y la absorbancia a 562 nm se determinó en un espectrofotómetro (Varian 50 Tablet, Palo Alto, California). El tratamiento y análisis anteriormente descrito se llevó a cabo por triplicado y se corrió un blanco.

El porcentaje y la tasa de reducción de Fe(III) fue calculada por medio de la fórmula desarrollada por Huang *et al.* (2018) y adaptada a las 144 horas de incubación. Con respecto al porcentaje de reducción, este fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de Fe(III) (\%)} = \frac{[\text{Fe(II)final}] - [\text{Fe(II)inicial}]}{[\text{Fe(III)total}]} \times 100 \quad (1)$$

La tasa de reducción de Fe(III) fue determinada por medio de la siguiente ecuación:

$$Tasa\ de\ reduction = \frac{[Fe(II)final] - [Fe(II)inicial](mM)}{20\ mM(aceptor\ de\ electrones) \times 144\ (h)} \quad (2)$$

6.3.7 Reducción de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *Serratia*

Para determinar el grado de reducción de las formas soluble y no soluble de Fe(III) realizada por el cultivo no pigmentado de *Serratia* y así evaluar el efecto de la ausencia/presencia de prodigiosina en el proceso reductivo, se llevó a cabo una serie de experimentos a las mismas condiciones mencionadas en el punto 6.3.6. El porcentaje y la tasa de reducción fue calculada por medio de las ecuaciones 1 y 2 mencionadas anteriormente.

6.3.8 Reducción de Fe(III) por *Shewanella oneidensis*

Para determinar el grado de reducción de las formas soluble y no soluble de Fe(III) por parte de un organismo reconocido como exoelectrogénico, se estudió a *S. oneidensis* en una serie de experimentos a las mismas condiciones mencionadas en el punto 6.3.5. El porcentaje y la tasa de reducción fue calculada por medio de las ecuaciones 1 y 2 mencionadas anteriormente.

6.3.9 Extracción, purificación y caracterización química de la prodigiosina

Con el objetivo de llevar a cabo la producción, extracción y purificación de prodigiosina y evaluar su desempeño como posible mediador redox exógeno, se desarrolló un inóculo como lo indica el punto 6.3.3. Después del período de incubación del cultivo pigmentado de *Serratia* en 100 mL de caldo cacahuate, se tomaron 5 mL y se depositaron en tubo Falcon estéril y se centrifugaron a 4,600 rpm, 8 °C por 10 minutos. Después de esto, se desechó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 3 mL de cloroformo y se sometió a 3 series de tratamiento con ultrasonido por 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó a 4,600 rpm, 8 °C por

10 minutos y se tomó la prodigiosina de la fase inferior. Este procedimiento se repitió hasta terminar con los 100 mL de cultivo que contenía el matraz Erlenmeyer mencionado. La purificación de este extracto se realizó mediante columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil cloroformo: metanol en una proporción 9:1 según lo determinado en previos estudios realizados en nuestro grupo de investigación (Ávila, 2016). Posteriormente, la prodigiosina purificada se secó a 60 °C por 6 h. Finalmente la prodigiosina seca se caracterizó por medio de Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). En el caso de la espectroscopia de FTIR, esta se llevó a cabo en un equipo de la marca Testscan Shimadzu, modelo FTIR 8400. Los parámetros utilizados para el análisis de la prodigiosina fueron: rango de análisis espectral 4,000 a 400 cm^{-1} . La cromatografía de HPLC se llevó a cabo en un equipo Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), usando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 X 150 mm, 5 μm) con un volumen de inyección de 20 μl , un tiempo de corrida de 10 min, a 535 nm, la detección se llevó a cabo a 535 nm con un detector de fotodiodos (PDA). La fase móvil consistió en agua ácida a pH 3 (fase A) y metanol (fase B).

6.3.10 Reducción de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *Serratia* en presencia de prodigiosina exógena

Para determinar si la cepa no pigmentada de *Serratia* utiliza prodigiosina exógena como mediador redox, y de esta forma lleva a cabo la reducción de las formas soluble y no soluble de Fe(III) con mayor eficiencia que la llevada a cabo por el cultivo descrito en el punto 6.3.7, se utilizó el mismo medio de cultivo utilizado en el punto 6.3.6. Este medio fue adicionado con 50 mM de prodigiosina exógena extraída de un cultivo de *Serratia* pigmentada (punto 6.3.9). El pH del medio se ajustó a 7 y se depositaron 60 mL de este medio de cultivo en frascos de 80 mL de volumen.

El medio se calentó a ebullición en baño de agua por 30 minutos y se burbujeó N₂ gas por 30 minutos. Posteriormente los viales se sellaron y se esterilizaron por autoclave a 121 °C, 15 lbs pulg⁻² por 15 minutos. Este medio fue inoculado con el 10 % v/v del cultivo no pigmentado de *Serratia* preparado como indica el punto 6.3.4. Los viales se incubaron a la oscuridad en condiciones anaerobias a una temperatura de 30 °C y se tomó muestra periódicamente de ellos utilizando jeringas y por medio de técnicas microbiológicas asépticas y se analizó el contenido de Fe(II) por medio del método de la ferrozina de acuerdo a la metodología descrita por Lovley y Philips en 1986, descrito anteriormente en el punto 6.3.6. El tratamiento y análisis anteriormente descrito se llevó a cabo por

triplicado y se corrió un blanco. El porcentaje y la tasa de reducción fue calculada por medio de las ecuaciones 1 y 2 mencionadas en el punto 6.3.6.

6.3.11 Reducción de Fe(III) por el cultivo pigmentado y no pigmentado de *Serratia*, *S. oneidensis*, y el cultivo no pigmentado de *Serratia* en presencia de prodigiosina exógena con donadores de electrones alternativos

Con el objetivo de evaluar diversos donadores de electrones diferentes al acetato dentro del proceso de reducción de las formas soluble y no soluble de Fe(III), los medios de cultivo se prepararon como se indicó anteriormente para cada una de las bacterias (6.3.3, 6.3.4, 6.3.5, respectivamente), sustituyendo al acetato por glicerol o glucosa; los cuales fueron agregados a una concentración de 20 mM. Los medios de cultivo fueron inoculados con los cultivos bacterianos correspondientes. Posteriormente, fueron incubados y la cantidad de Fe(II) se analizó por el método de la ferrozina según fue indicado anteriormente para cada cultivo bacteriano. El porcentaje y la tasa de reducción fue calculada por medio de las ecuaciones 1 y 2 mencionadas en el punto 6.3.6

6.3.12 Desarrollo activo de bioánodos

6.3.12.1 Lavado de electrodos de grafito

Los electrodos a ser utilizados para promover la formación activa de una biopelícula del cultivo no pigmentado de *Serratia* y *S. oneidensis* se cortaron con forma de prisma rectangular de altura de 5 cm, largo de 2.5 cm y ancho de 1.5 cm. Estos electrodos se lavaron vigorosamente utilizando agua corriente del grifo, esto con el objetivo de desprender cualquier partícula de superficie suelta. Posteriormente, se colocaron en un vaso de precipitado que contenía agua desionizada y se hirvió por 15 minutos. Finalmente, los electrodos de grafito fueron colocados en HCl 1M por un período de 3 horas, posteriormente fueron lavados de nueva cuenta utilizando agua desionizada hasta que esta agua alcanzó un pH de 7. Por último, se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.3.12.2 Producción de inóculo no pigmentado de *Serratia*

Para el desarrollo del inóculo, se utilizó una asada de un cultivo en agar inclinado de *Serratia* pigmentada y se inoculó en 5 mL de medio LB estéril adicionado con glucosa al 2 %, posteriormente se incubó por 24 horas a 30 °C. A partir de este cultivo se tomaron de manera aséptica 1.5 mL y se inoculó en 15 mL de caldo LB estéril adicionado con glucosa al 2 %, posteriormente se incubó por 24 horas a una temperatura de 30 °C y 150 rpm. Después del período de incubación se tomaron 10 mL del cultivo y se inocularon en 100 mL de medio LB adicionado con glucosa al 2 % estéril contenido en un matraz Erlenmeyer, este cultivo se incubó por 20 horas a 30 °C y 150 rpm. Después de este último período de incubación, se tomaron 10 mL y se centrifugaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL de volumen por 20 minutos a 4 °C y 4,600 rpm. Posteriormente, se decantó el contenido del tubo Falcon y se agregaron 10 mL de solución salina al 0.85 % y se sometió a vortex por 1 minuto con el objetivo de lavar las células. Después de esto, se realizó un nuevo período de centrifugación por 20 minutos a 4 °C y 150 rpm, se decantó el contenido del tubo Falcon y se re suspendieron con la cantidad necesaria de solución salina al 0.85% para ajustar la densidad óptica a 0.6, medida a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (Varian 50 Tablet, Palo Alto, California).

6.3.12.3 Diseño Plackett-Burman para la producción de una biopelícula de un cultivo no pigmentado de *Serratia* en condiciones controladas

Con el objetivo de llevar a cabo la producción de un bioánodo compuesto del cultivo de interés sobre el electrodo de grafito. Se realizó un diseño Plackett-Burman (diseño factorial fraccionado) en donde los parámetros a analizar fueron: la temperatura, pH, concentración de medio de cultivo, agitación, tiempo y concentración de inóculo (ver TABLA III). Para este ensayo se utilizaron 100 mL de medio LB, los cuales se inocularon con la cantidad correspondiente de inóculo y se incubaron según la corrida correspondiente indicada en la misma. El paquete estadístico Minitab (Minitab, Inc., State College, PA, USA) fue utilizado para llevar a cabo el análisis del diseño de experimentos y procesamiento de datos. El factor de respuesta medido fueron las unidades formadoras de colonias crecidas en la placa Petri después del período de incubación correspondiente.

TABLA III.
 MATRIZ DECODIFICADA DEL DISEÑO PLACKETT-BURMAN GENERADO
 EN MINITAB PARA EL CULTIVO NO PIGMENTADO DE *Serratia*

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Concentración de medio (% P/V)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)	Inóculo (%)
1	28	6	1	150	7	10
2	30	7	0.50	150	7	10
3	28	7	0.50	100	5	20
4	28	6	0.50	100	5	10
5	30	7	0.50	150	5	10
6	28	6	0.50	150	7	20
7	30	6	1	150	5	20
8	30	7	1	100	7	20
9	30	6	1	100	5	10
10	28	7	1	150	5	20
11	30	6	0.50	100	7	20
12	28	7	1	100	7	10

6.3.12.4 Determinación de viabilidad celular del cultivo no pigmentado de *Serratia*

La determinación del número de células viables se realizó al final de cada proceso de formación. En este punto, los electrodos se retiraron de manera aséptica y se lavaron con agua destilada estéril utilizando pipeta Pasteur estéril, esto con el objetivo de eliminar todas aquellas células que no estuvieran

adheridas al electrodo. Las células adheridas al electrodo fueron desprendidas de él y colocadas en tubos Falcon de 50 mL de volumen conteniendo 20 mL de solución salina estéril al 0.85 % por medio de sonicador celular por un tiempo de 3 minutos. Las células viables y cultivables fueron enumeradas por medio de la técnica de dilución y siembra en placa utilizando solución salina como diluyente secundario y agar LB. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Los resultados fueron expresados en UFC cm⁻².

6.3.12.5 Producción de inóculo de *S. oneidensis*.

Para el desarrollo del inóculo, se utilizó una asada de un cultivo en agar inclinado de *S. oneidensis* y se inoculó en 5 mL de medio LB estéril, posteriormente se incubó por 24 horas a 30 °C. Posterior a este período de incubación, se procedió de la misma manera en que se menciona en el punto 6.3.12.2

6.3.12.6 Diseño Plackett-Burman para la producción de una biopelícula de *S. oneidensis* en condiciones controladas

Con el objetivo de llevar a cabo la producción de un bioánodo compuesto del cultivo de interés y el electrodo de grafito, se procedió de la misma manera a lo indicado en el punto 6.3.12.3 (Ver TABLA IV).

TABLA IV.
MATRIZ DECODIFICADA DEL DISEÑO PLACKETT-BURMAN GENERADO
EN MINITAB PARA EL CULTIVO DE *S. oneidensis*

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Concentración medio (% P/V)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)	Inóculo (%)
1	28	6	1	150	7	10
2	30	7	0.50	150	7	10
3	28	7	0.50	100	5	20
4	28	6	0.50	100	5	10
5	30	7	0.50	150	5	10
6	28	6	0.50	150	7	20
7	30	6	1	150	5	20
8	30	7	1	100	7	20
9	30	6	1	100	5	10
10	28	7	1	150	5	20
11	30	6	0.50	100	7	20
12	28	7	1	100	7	10

6.3.12.7 Determinación de viabilidad celular de *S. oneidensis*

La determinación del número de células viables se realizó al final de cada proceso de formación de una biopelícula y se procedió de la misma manera que lo indicado en el punto 6.3.12.4.

6.3.13 Desempeño del bioánodo generado en una CCM de doble cámara.

6.3.13.1 Configuración de la CCM

Una celda de combustible microbiana de doble cámara (Scientific glass, Adams y Chittenden, USA) fue construida con frascos de borosilicato de volumen de 250 mL cada uno. Ambos frascos fueron sellados juntos utilizando pinzas. Una membrana de intercambio protónico Nafion 117 (Membranes International, GlenRock, NJ, USA) fue colocada entre la cámara anódica y la cámara catódica. Grafito en barra (Mentor USA) fue utilizado como ánodo y cátodo. El tamaño de

estos electrodos utilizados fue de 5 cm de alto, 2.5 cm de largo y 1.5 cm de ancho. Ambos electrodos fueron lavados como se indica en el punto 6.3.12.4. El ánodo y cátodo fueron conectados con cable de cobre en modo de circuito abierto. La cámara anódica fue mantenida bajo condiciones de anaerobiosis por medio de la inyección de N₂ cada 24 h. Por otro lado, la cámara catódica fue llenada con agua y mantenida bajo condiciones aerobias inyectando un caudal de aire de 21.2 pies³ min⁻¹ de manera continua mediante una bomba de pecera.

6.3.13.2 Biocatalizador y agua residual sintética

Un inóculo de 100 mL del cultivo no pigmentado de *Serratia* fue utilizado como biocatalizador. En la cámara anódica se agregó como líquido anódico el medio de cultivo denominado agua residual sintética (DSW) [KH₂PO₄- 0.25, NH₄Cl - 0.5, K₂HPO₄ - 0.25, MgCl₂.6H₂O - 0.3, FeCl₃ - 0.025, NiCl₄ - 0.016, CoCl₂ - 0.025, ZnCl₂ - 0.0115, CuCl₂ - 0.0105, CaCl₂ - 0.005, MnCl₂ - 0.015] y se adicionó glucosa (3.0 g/L). La operación de la CCM fue en modo fed batch a temperatura ambiente (28-32 °C). La cámara anódica fue inoculada con 20 mL de biomasa del cultivo no pigmentado de *Serratia*. Este cultivo fue preparado de la siguiente forma: 100 mL de un inóculo del cultivo crecido en medio LB adicionado con glucosa al 2 % fue concentrado por medio de centrifugación en tubos Falcon de 50 mL de volumen a 4,000 rpm por un período de 10 minutos. El sedimento se

recolectó en una bureta de 100 mL estéril hasta completar 20 mL de biomasa del cultivo no pigmentado de *Serratia*.

6.3.13.3 Operación de la CCM

La CCM fue operada por un período total de 440 horas. El voltaje y la corriente fue medida cada 4 horas, una caída en la lectura de voltaje fue interpretado como el momento en que había que hacer un cambio en líquido anódico. Para esto, 180 mL del medio agua residual sintética fue remplazada con medio agua residual sintética recién preparada. Con el objetivo de asegurar el microambiente anaeróbico, al momento de hacer el cambio de agua residual sintética se inyectó con N₂ gas por 20 minutos. El sistema fue evaluado a una carga de materia orgánica de 3000 mg L⁻¹ (glucosa).

6.3.13.4 Análisis

El desempeño de la CCM fue evaluado en base a la lectura del diferencial de potencial leído por el multímetro. Mediante él se obtuvieron los datos del voltaje (mV) y corriente (mA) en modo de circuito abierto. La determinación de mV y mA se llevó a cabo cada 4 h hasta completar 444 h, utilizando el lenguaje de programación gráfica LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench. National Instruments. Austin, Texas). Para esto, se desarrolló el panel frontal y se programó el diagrama de bloque en el cual se indicó la periodicidad de la determinación de mV y mA. Posteriormente, se desarrollaron las terminales de entrada y salida de datos. Los valores de las mediciones se registraron directamente en un documento de Microsoft Excel (Redmond, Washington, EE.UU.). Finalmente, se hicieron cálculos de densidad de potencia en función del área superficial del electrodo. Cada análisis experimental fue llevado a cabo por duplicado y el resultado refleja un promedio de ellos.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos durante el proyecto.

7.3.1 Identificación del cultivo bacteriano por medio de pruebas bioquímicas

Se confirmó que el cultivo bacteriano productor de prodigiosina y que pertenece al cepario del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León se trata de una bacteria

perteneciente al género *Serratia* aunque no fue posible llevar a cabo la identificación de la especie ya que muchas pruebas mostraban interferencia causada por la excesiva producción de prodigiosina con lo cual era imposible dar una resolución entre un resultado positivo o negativo (ver TABLA V). Debido a esto se decidió continuar con la identificación molecular de la bacteria. A continuación, se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas (ver Figura 5).

TABLA V
RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA	Aislado bacteriano	Ψ <i>Serratia marcescens</i>
Tinción de Gram	-	-
Producción de pigmento	Rosa-Rojo	Rojo o rosa
Indol	*	-
Rojo de metilo	*	-
VP	*	+
Citratos	+	+
H ₂ S	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+
Motilidad	+	+
Gelatinasa	+	+
Fermentación de glucosa	+	D
Fermentación de sacarosa	+	-
Fermentación de lactosa	+	-
Producción de gas	-	+

*Interferencia de la prodigiosina

D: Débil respuesta

Ψ: Datos obtenidos del manual de Bergey de bacteriología sistemática para *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880 (Bergey, 2005).

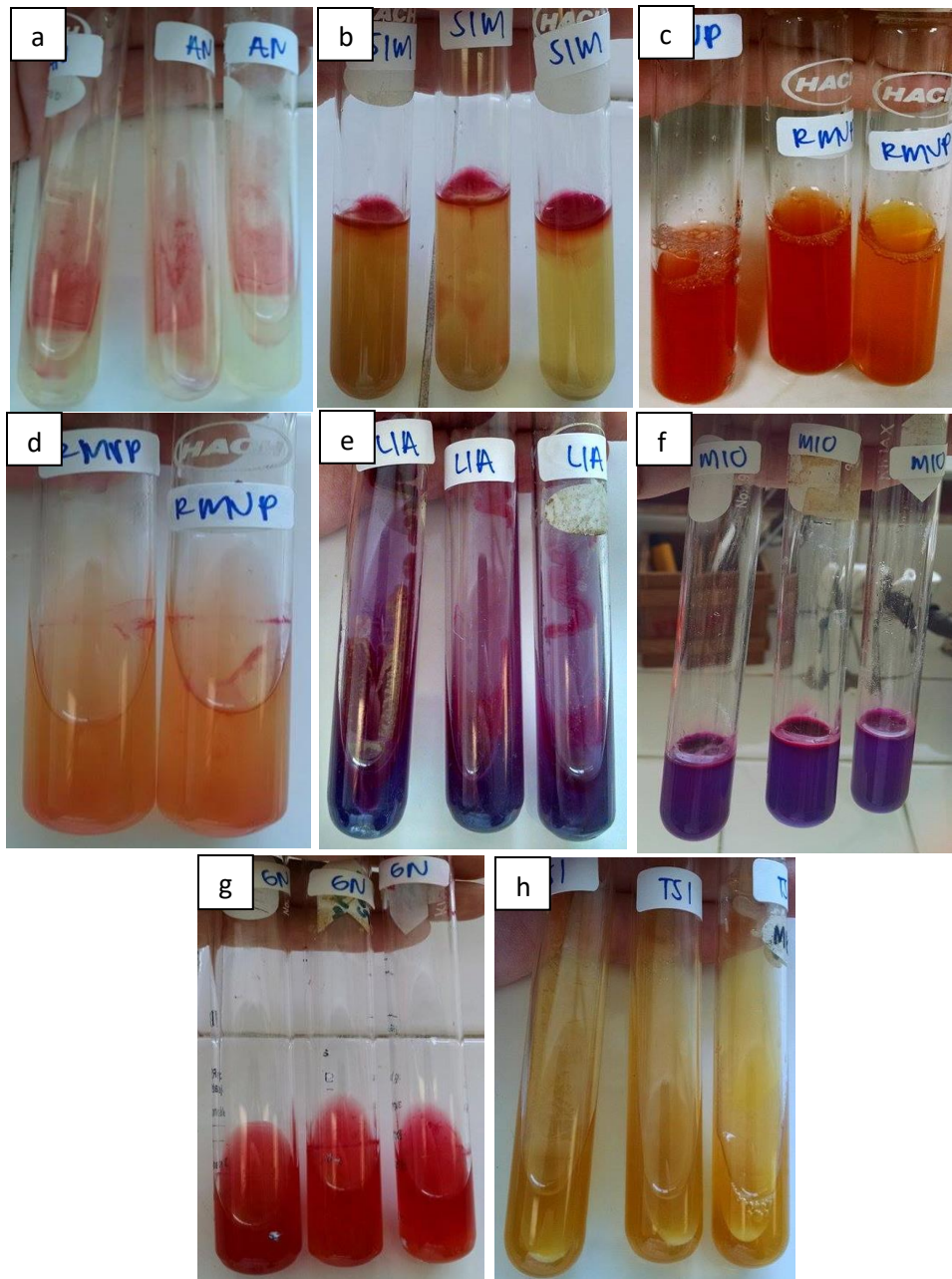


Figura 5. Pruebas bioquímicas. a) producción de pigmento; b) movilidad e indol; c) rojo de metilo y VP; d) lisina descarboxilasa; e) ornitina descarboxilasa; f) gelatinasa; g) fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa; h) triple azúcar hierro.

7.3.2 Análisis de ADN del aislado bacteriano

El ADN aislado del cultivo bacteriano se analizó por electroforesis en gel de agarosa para evaluar su integridad y pureza (ver Figura 6).

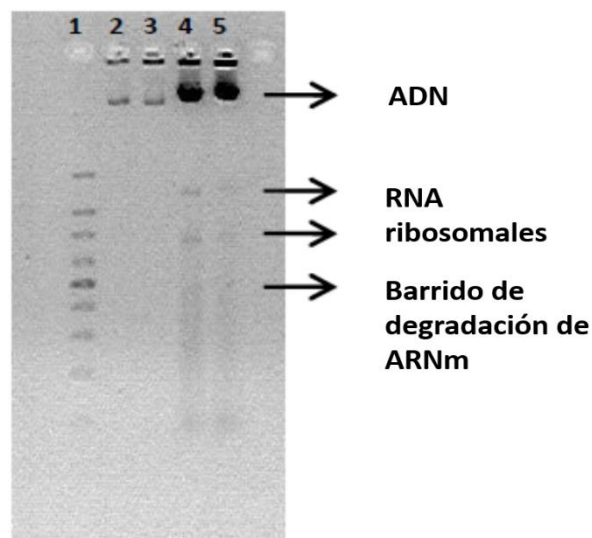


Figura 6. Electroforesis del ADN aislado. (1) marcador de peso molecular, (2 y 3) extracciones digeridas con RNAsaH, (4 y 5) extracción sin digerir con RNAsaH y concentradas.

Se logró amplificar la región de interés correspondiente a la subunidad 16 S rRNA y fue posible ver la banda intensa en aproximadamente 1000 pb (ver Figura 7).

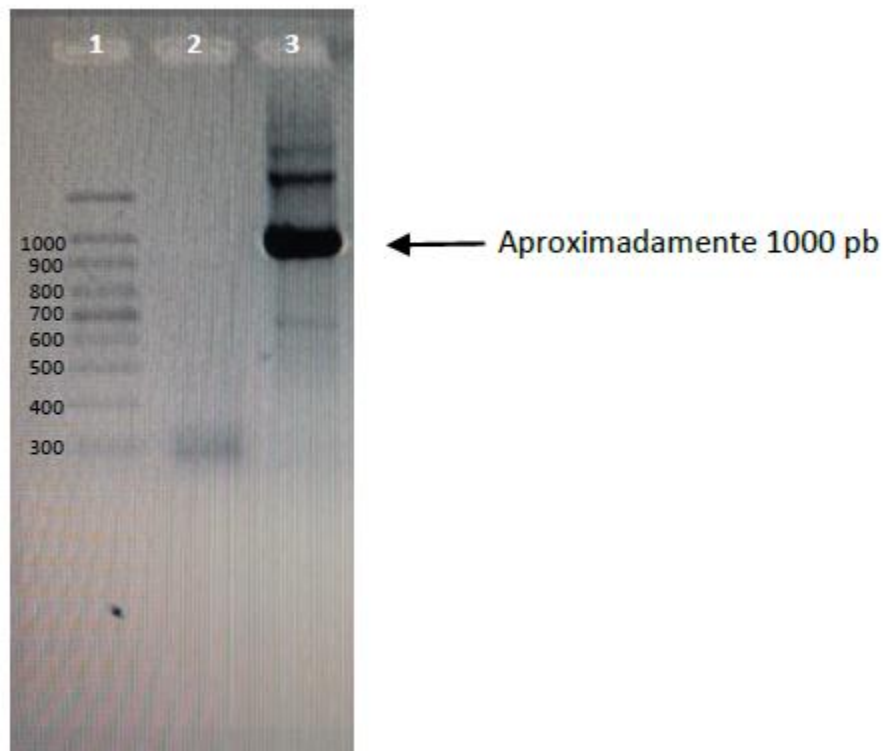


Figura 7. Electroforesis de los amplicones. (1) Marcador de peso molecular, (2) Blanco, (3) Muestra.

Del gel de la electroforesis preparativa mostrado en la anterior se cortó la banda de aproximadamente 1000 pb y se sometió a un proceso de purificación ver Figura 8).

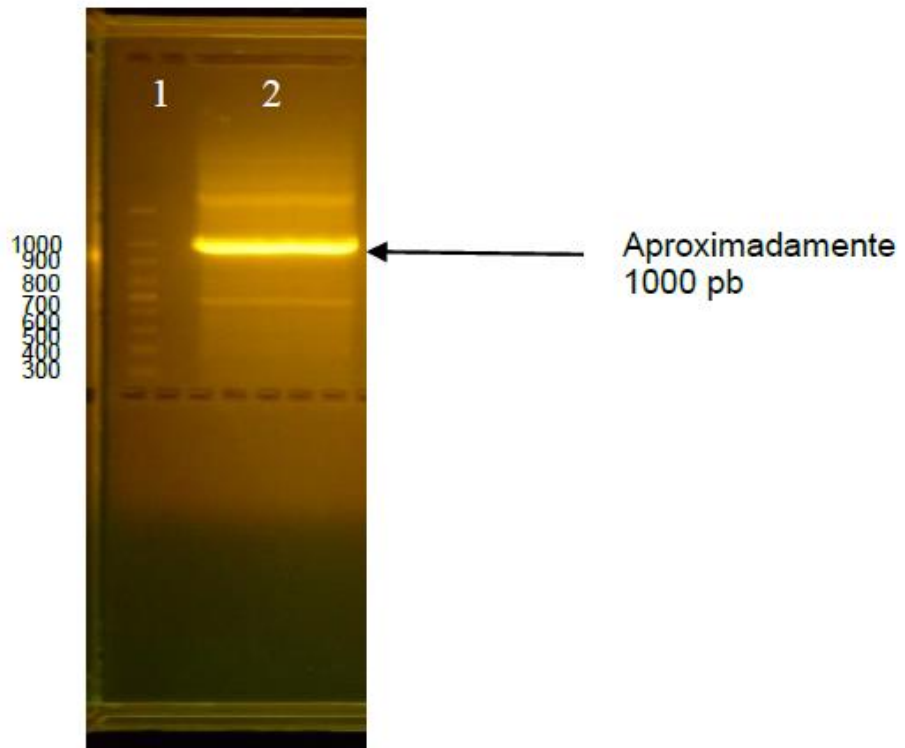


Figura 8. Electroforesis preparativa para purificación. (1) Marcador de peso molecular, (2) Muestra.

Finalmente se comprobó por medio de electroforesis la pureza del fragmento amplificado (ver Figura 9).



Figura 9. Electroforesis del fragmento amplificado después de la purificación. (1) Marcador de peso molecular, (2) Muestra.

El análisis de homología de ADN utilizando Blast dio como resultado que 952 bases nucleotídicas son confiables en un 99 % con *Serratia marcescens*. El árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining ordena el aislado bacteriano junto a otras cepas filogenéticamente relacionadas (ver Figura 10). La secuencia de la cepa en estudio fue registrada en el Centro Nacional de

Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos Americanos como *Serratia marcescens* 11E con el número de acceso MK598756.

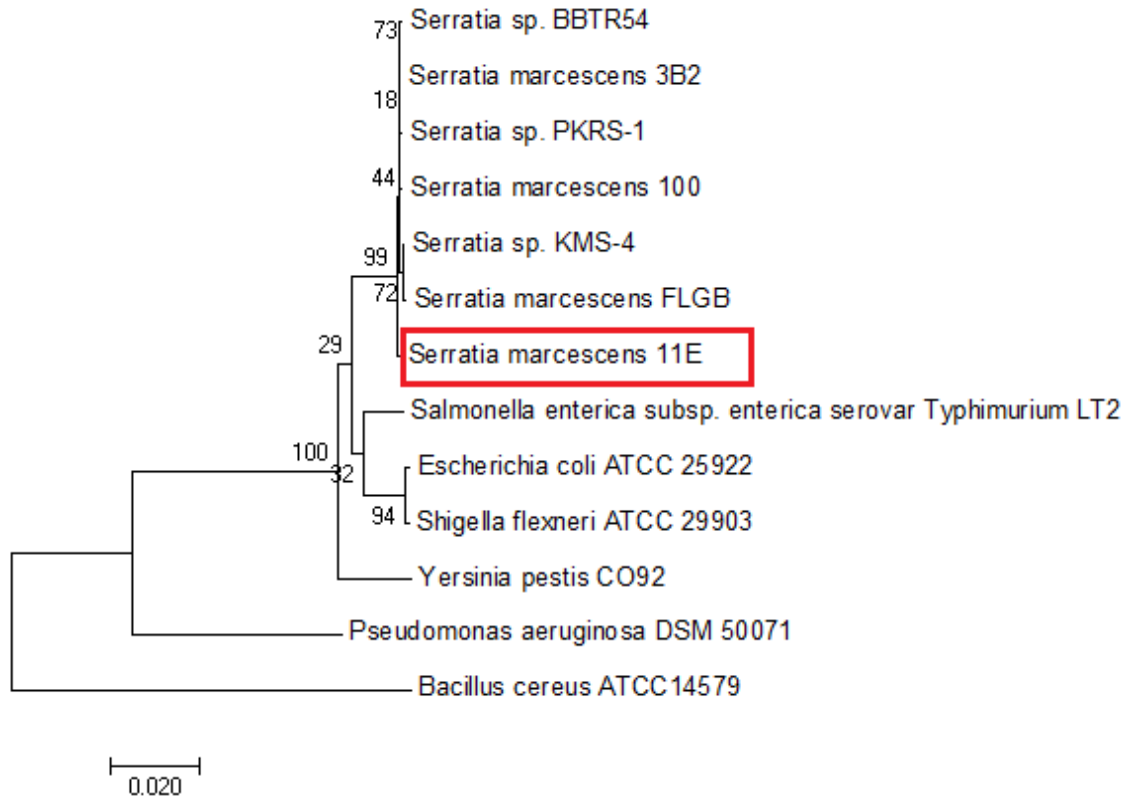


Figura 10. Relaciones evolutivas de los taxones. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7.

7.3.3 Producción de un cultivo pigmentado de *Serratia marcescens* 11E

Se desarrolló el inóculo pigmentado de *Serratia marcescens* 11E y se ajustó su densidad óptica en 0.6 medida a 600 nm. Esta lectura de absorbancia representó una cantidad celular de 20×10^6 UFC mL⁻¹.

7.3.4 Producción de un cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E

La evaluación de la cantidad de glucosa necesaria para inhibir la producción de prodigiosina en el cultivo de *S. marcescens* 11E fue de 2 % p/v. Esta es la cantidad mínima de esta fuente de carbono que lleva a cabo la represión del metabolito secundario, produciendo por lo tanto un cultivo no pigmentado (ver Figura 11). Posteriormente, y como se realizó anteriormente para el cultivo pigmentado, se llevó a cabo el ajuste en la densidad celular hasta obtener una absorbancia medida a 600 nm de 0.6 (ver Figura 12).

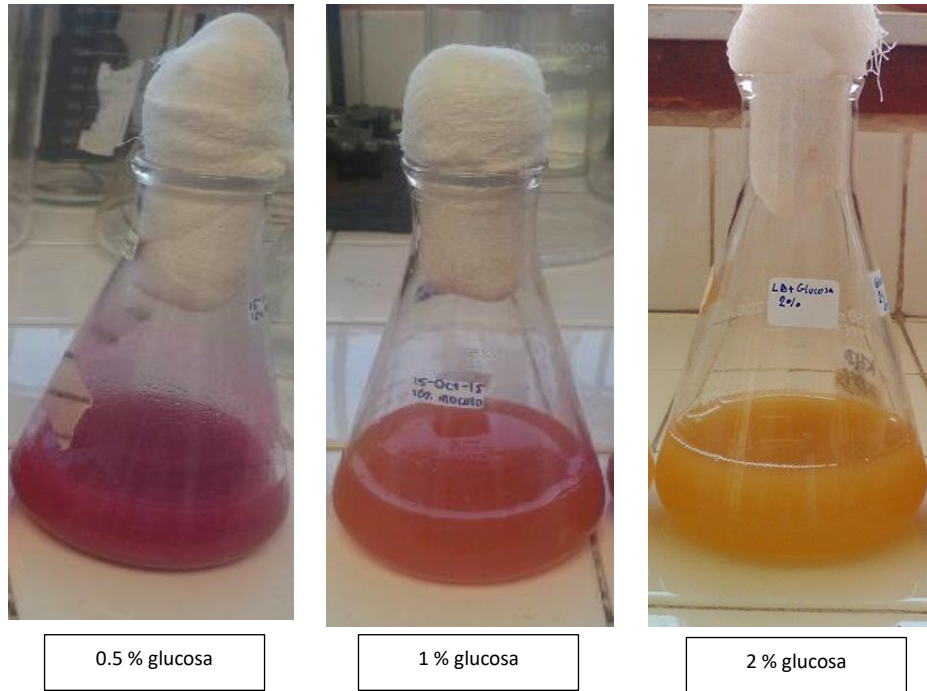


Figura 11. Efecto de la glucosa sobre la producción del metabolito secundario prodigiosina.

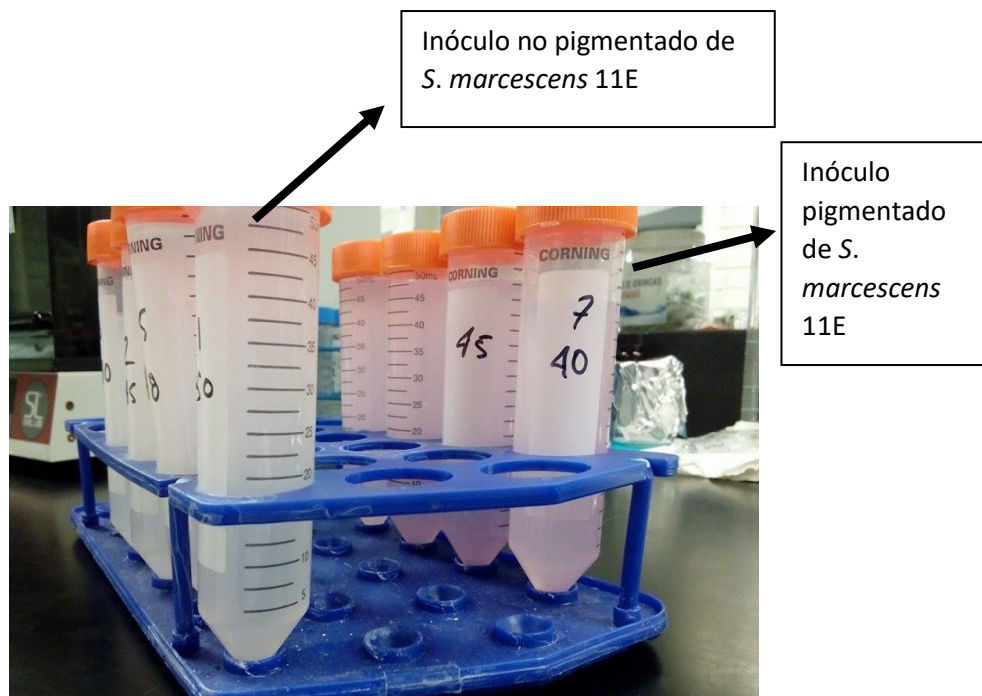


Figura 12. Inóculos de los cultivos no pigmentados y pigmentados de *S. marcescens* 11E

7.3.5 Producción de un cultivo de *Shewanella oneidensis*

De manera similar a los cultivos de *S. marcescens* 11E (pigmentado y no pigmentado), se desarrolló el inóculo de *S. oneidensis* hasta obtener una densidad celular de 20×10^6 UFC mL⁻¹.

7.3.6 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E

La producción de Fe(II) como consecuencia de la reducción de Fe(III) en medio de cultivo agua residual sintética (DSW) adicionado con acetato como donador de electrones fue evaluada (ver Figura 13). Durante las primeras 10 h ocurre una producción rápida de 3.14 mM de Fe(II). Posteriormente y hasta las 48 h se lleva a cabo un aumento ligero y constante en su producción (2.04 mM). Después, una fase estacionaria aparece y se extiende hasta las 96 h. Finalmente, ocurre un ligero aumento de 1 mM de Fe(II) a las 144 h de incubación.

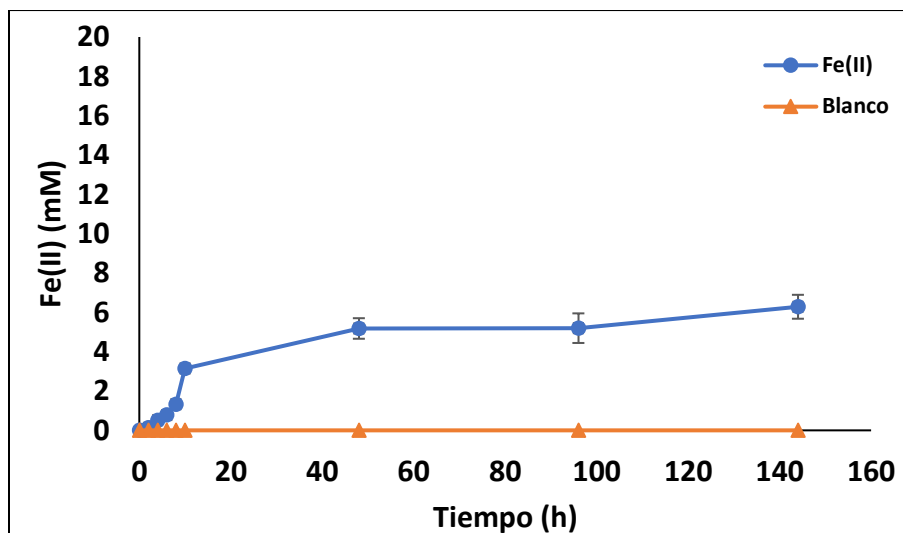


Figura 13. Producción de Fe(II) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.7 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E

La producción de Fe(II) en el medio de cultivo DSW adicionado con acetato realizada por la bacteria no pigmentada de *S. marcescens* 11E es mostrada abajo (ver Figura 14). Este microorganismo mostró un patrón continuo en la reducción de Fe(III) a partir de las primeras 6 h de incubación y hasta las 144 h; período en el cual ocurrió una producción de 9.72 mM de Fe(II).

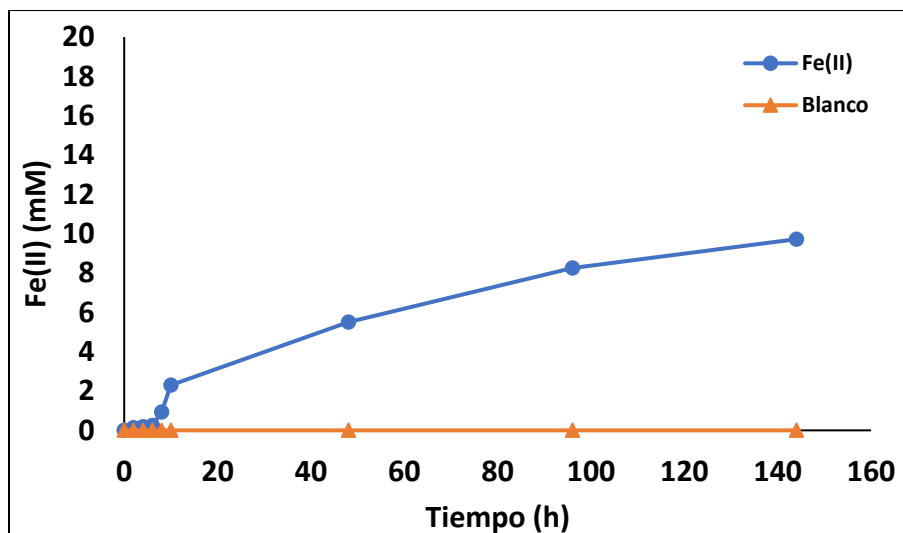


Figura 14. Producción de Fe(II) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.8 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo de *S. oneidensis*

La producción de Fe(II) a partir de la reducción de Fe(III) efectuada por el cultivo de *S. oneidensis* es mostrada abajo (ver Figura 15). En este caso, se observó una intensa reducción durante las primeras 10 h de incubación (6.9 mM). Posteriormente, la reducción de Fe(III) siguió pero de una forma menos activa a lo mostrado durante las primeras horas generando 11.21 mM adicionales en un lapso de 134 h.

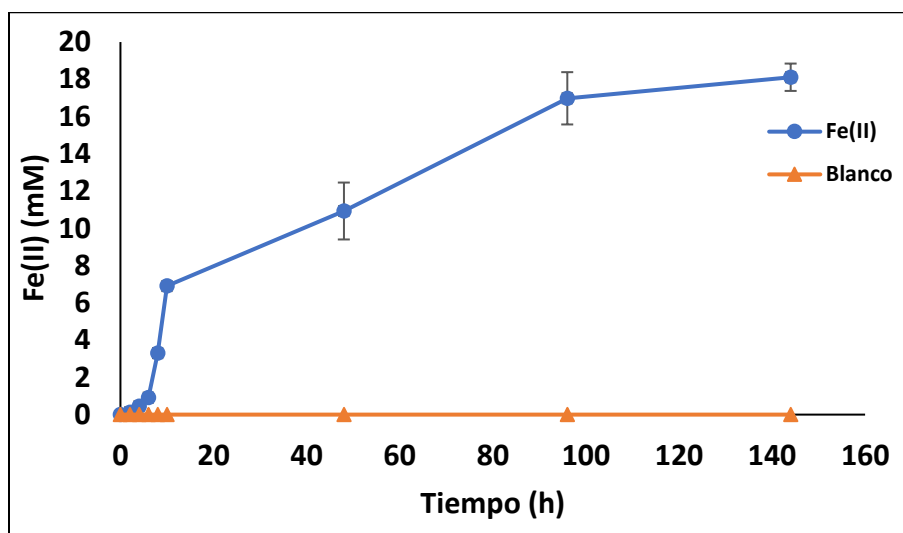


Figura 15. Producción de Fe(II) por el cultivo de *S. oneidensis*. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.9 Caracterización química de la prodigiosina extraída

La prodigiosina extraída se analizó por medio de FTIR y HPLC. Los espectros obtenidos que demuestran su pureza se presentan en seguida (ver Figura 16a-b).

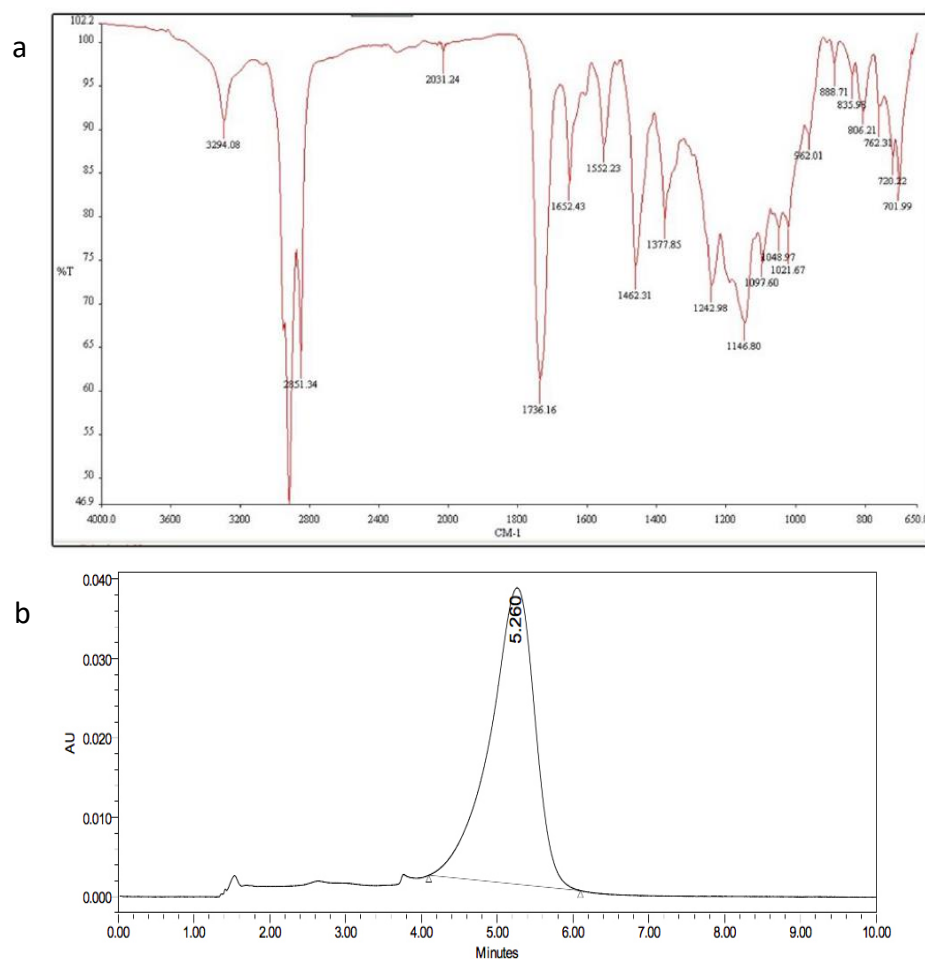


Figura 16. Espectro de FTIR (a) y cromatograma de HPLC de prodigiosina purificada (b).

En el espectro mostrado en la figura 16a se presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 3294 cm^{-1} (O-H estiramiento), otro a 2851 cm^{-1} (C-H y C=O estiramientos) y uno más a 1552 cm^{-1} (C=C aromático, NO_2 estiramiento). Estas bandas de absorción representan diversos enlaces presentes en la molécula de la prodigiosina. Además, son apreciables las bandas de absorción a

1652 cm^{-1} (C=O aromáticos), La banda de absorción a 1,242 cm^{-1} podría deberse a enlace C-O (carboxílicos estiramiento), 1146 cm^{-1} (C-N aminas), mientras que a longitudes de onda de 888 cm^{-1} y 701 cm^{-1} se observan bandas de absorción pertenecientes a C-H de anillos fenólicos, de la misma manera a 1462 cm^{-1} se observa absorción de C-H.

La imagen 16b muestra el cromatograma obtenido a las condiciones descritas en la sección 6.3.9. En ella se observa la aparición de un solo pico con un tiempo de retención de 5.26 min.

7.3.10 Evaluación de la reducción de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena

La producción de Fe(II) generada por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en el medio de cultivo DSW adicionado con acetato como donador de electrones y prodigiosina exógena extraída del cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E es mostrada debajo (ver Figura 17). En ella se muestra que a partir de las primeras 4 h y hasta las 48 h el cultivo produce 6.34 mM de Fe(II). Esto de manera constante. A partir de este punto y hasta las 96 h no existe cambio en la concentración de Fe(II). Finalmente, de las 96 h y hasta las 144 h el cultivo produce 1.24 mM de Fe(II). En la Figura 17 se muestra el perfil de

reducción de Fe(III) en la forma soluble (Citrato de Fe(III)) llevado a cabo por los cultivos bacterianos en estudio. En este perfil comparativo se puede observar que *S. oneidensis* lleva a cabo una mayor producción de Fe(II) a las 144 h de incubación, cumpliendo este resultado con lo esperado. Por otro lado, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E lleva a cabo una mayor reducción que la generada por el cultivo pigmentado y por el cultivo en el cual se adicionó prodigiosina extracelular. Por medio de este resultado se reconoce que la prodigiosina extracelular no lleva a cabo una función de mediador redox en las condiciones ensayadas y descritas.

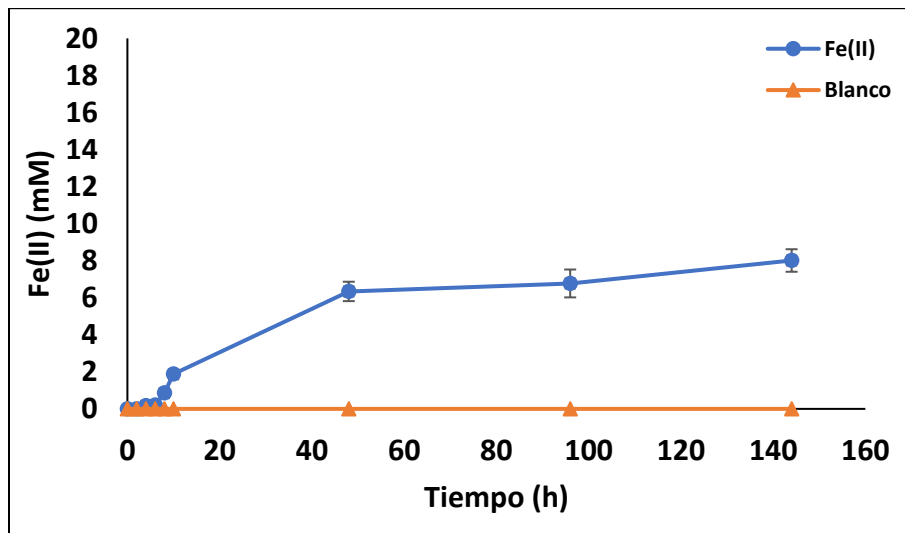


Figura 17. Producción de Fe(II) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

La bacteria Fe(III)-reductora de referencia *S. oneidensis* lleva a cabo la producción de 18.11 mM de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) (forma soluble) (ver Figura 18). En comparación con los demás cultivos en estudio esta concentración es significativamente mayor ($p < 0.05$). Así mismo, *S. marcescens* 11E no pigmentada reduce una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) de Fe(III) (9.72 mM) que el cultivo de *S. marcescens* 11E no pigmentada en presencia de PG exógena, el cual produjo 8.11 mM de Fe(II) y que el cultivo pigmentado de *S. marcescens* que fue capaz de producir 6.28 mM. Este resultado indica que, de los cultivos en evaluación, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* presenta mayor capacidad exoelectrogénica. Esto reflejado en el porcentaje de reducción y tasa de reducción de la forma soluble de Fe(III) presentado (ver TABLA VI).

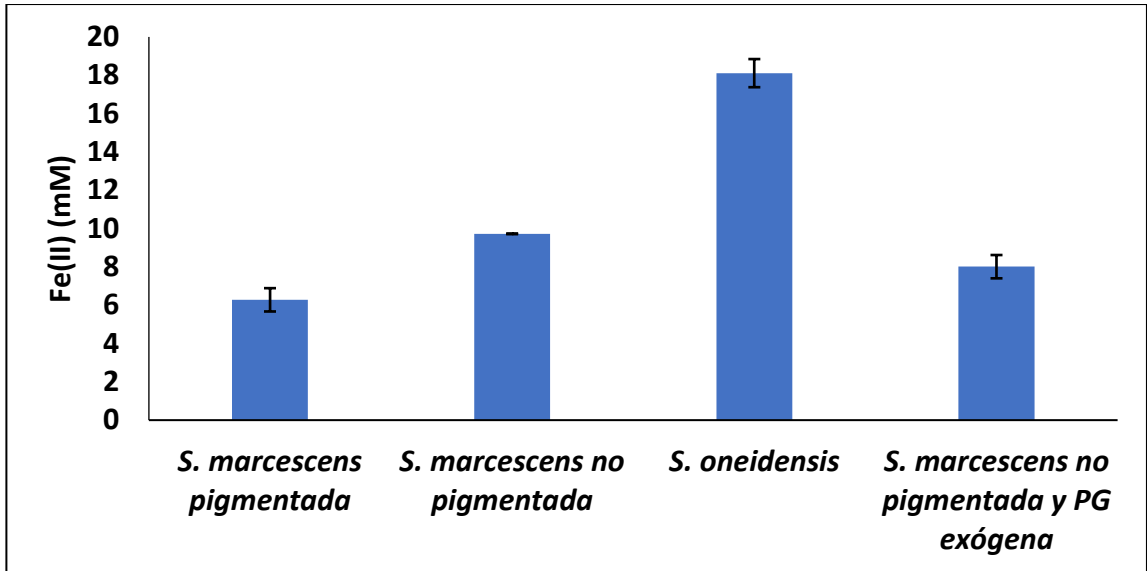


Figura 18. Producción de Fe(II) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.11 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E

La producción de Fe(II) por parte de la bacteria pigmentada de *S. marcescens* a partir del donador de electrones acetato y usando la forma de hierro insoluble Fe₂O₃ como aceptor de electrones es mostrado debajo (ver Figura 19). En ella se observa la incapacidad del microorganismo para llevar a cabo la reducción de Fe(III). Desde el inicio del experimento y después de 144 h de incubación la concentración de Fe(II) se mantiene en 0 mM.

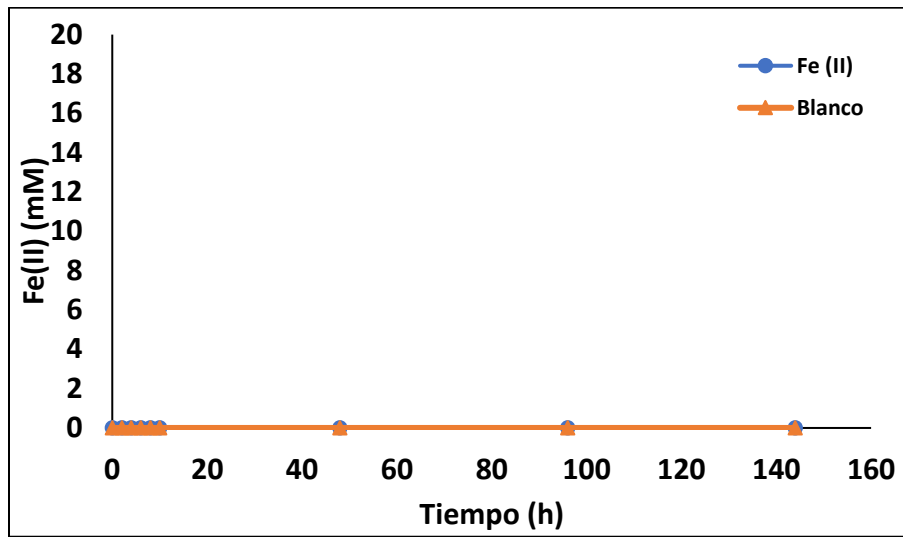


Figura 19. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.12 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E

La producción de Fe(II) usando como aceptor de electrones al Fe_2O_3 es mostrada a continuación (ver Figura 20). En esta imagen se observa que de la reducción de Fe(III) se generan 4.56 mM de Fe(II) en tan solo 10 h de incubación. Después de este período y hasta las 96 h de experimentación, la producción de Fe(II) se llevó a cabo de forma ligera pero constante (3.11 mM). En las últimas 48 h de incubación (96-144 h) se observó una fase estacionaria en donde la concentración de Fe(II) fue constante.

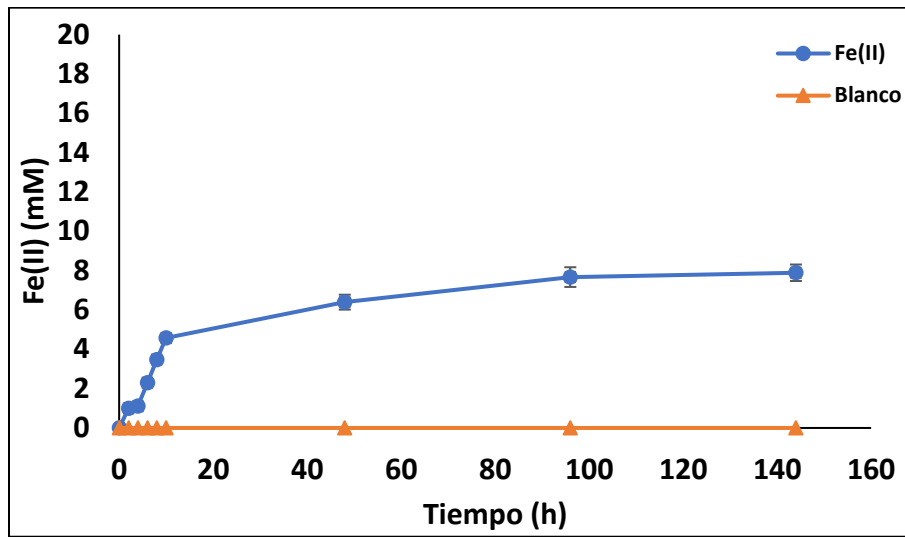


Figura 20. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.13 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(II) por *S. oneidensis*

La reducción de Fe(III) llevada a cabo por la bacteria *S. oneidensis* se observa a continuación (ver Figura 21). En esta imagen se evidencia la capacidad reductora de este microorganismo. Esta bacteria lleva a cabo la reducción de Fe_2O_3 de forma constante e intensa desde el inicio del periodo de incubación y hasta las primeras 48 h de incubación, generando 15 mM de Fe(II). A partir de este punto y hasta las 96 h, la concentración de Fe(II) producido es de 1 mM.

Finalmente, dentro de las últimas 48 h de incubación, *S. oneidensis* muestra un período estacionario en el cual no hubo generación significativa de Fe(II).

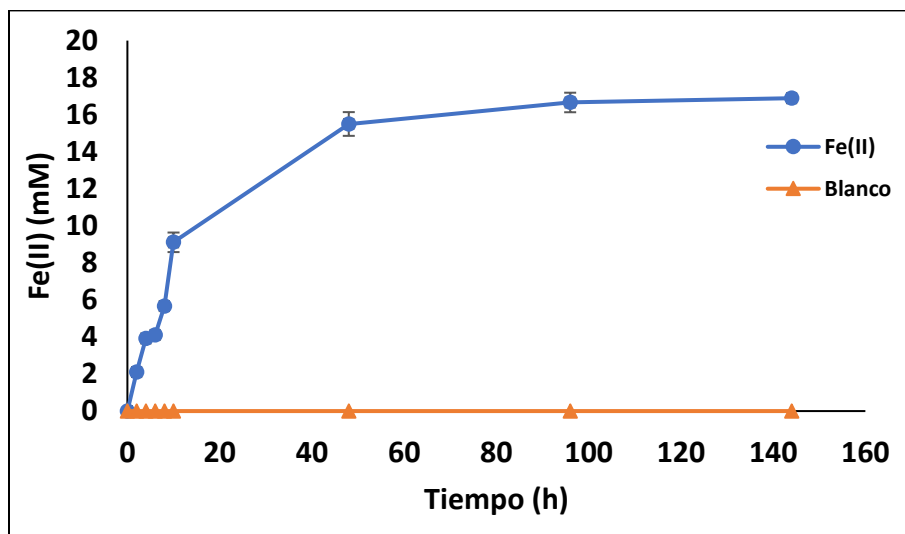


Figura 21. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo de *S. oneidensis*. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.14 Evaluación de la reducción de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena

La reducción de Fe(III) realizada por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en medio de cultivo DSW adicionado con acetato como donador de electrones y prodigiosina exógena es mostrada a continuación (ver Figura 22). En esta imagen se aprecia que la reducción de Fe(III) es de manera constante e intensa durante las primeras 10 h de incubación (4 mM). Posteriormente, se generan 2 mM en un período de 38 h. Finalmente, durante las últimas 96 h de incubación del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E generó 0.73 mM de Fe(II).

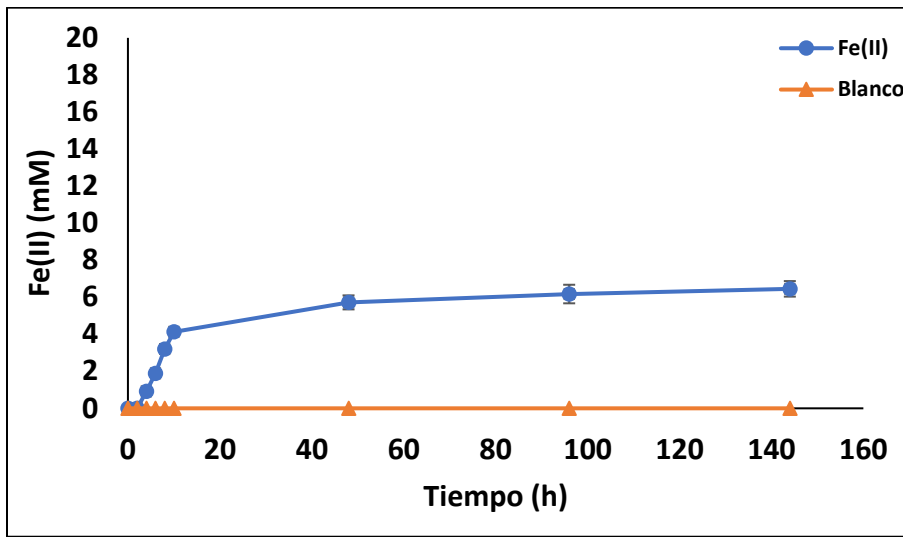


Figura 22. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

La reducción de Fe(III) insoluble (óxido de Fe(III)) llevado a cabo por los cultivos bacterianos en estudio es mostrada a continuación (ver Figura 23). En este perfil comparativo se puede observar que el microorganismo reductor de Fe(III) de referencia *S. oneidensis* lleva a cabo una mayor producción de Fe(II) a las 144 h de incubación (16.89 mM). Por otro lado, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E lleva a cabo la producción de 7.89 mM de Fe(II), la cual es significativamente superior a la obtenida por el cultivo no pigmentado en presencia de PG exógena (6.45 mM) y por el cultivo pigmentado (0 mM) ($p < 0.05$). De nueva cuenta, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E presenta el mayor poder exoelectrogénico (ver TABLA VII).

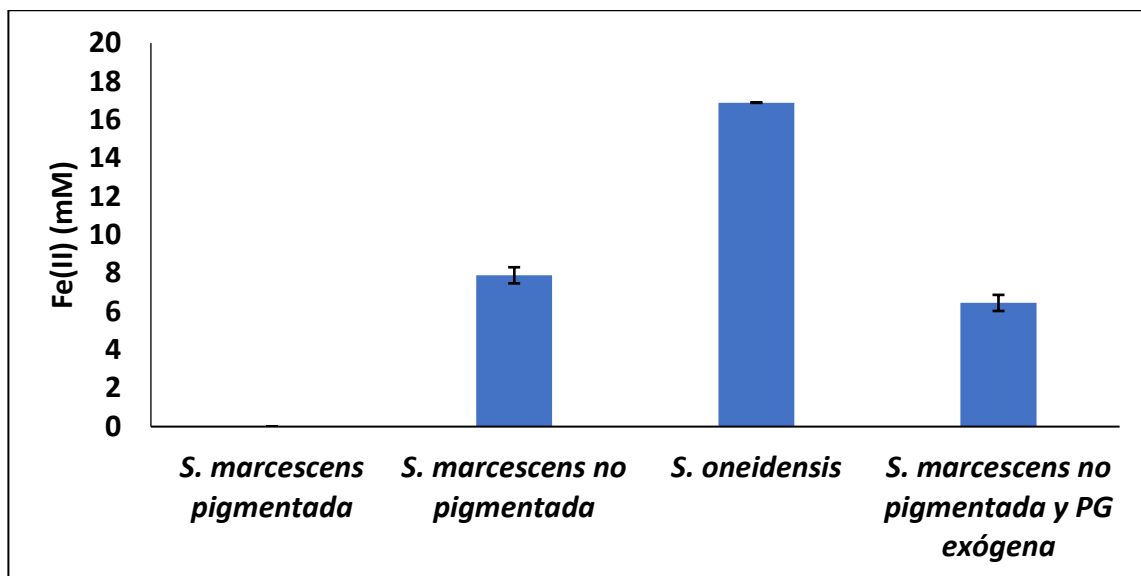


Figura 23. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15 Efecto de donadores de electrones alternativos en la reducción de citrato de Fe(III) y óxido de Fe(III) por los cultivos en evaluación

La producción de Fe(II) como consecuencia de la reducción de Fe(III) llevada a cabo por la bacteria pigmentada *S. marcescens* 11E utilizando glicerol (a) y glucosa (b) como donadores de electrones es mostrada a continuación (ver Figura 24a-b). Cuando el glicerol es el donador de electrones, la generación de

Fe(II) es ligera y constante a partir de las primeras 10 h y hasta las 144 h de incubación (2.7 mM). Por el contrario, la glucosa muestra que acopla en mejor medida su oxidación con la reducción de Fe(III) ya que durante las primeras 10 h de incubación se producen 7.49 mM de Fe(II). Posteriormente, a las 48 h de incubación la concentración de Fe(II) aumenta 1.03 mM. Finalmente, a las 144 h la concentración de Fe(II) se mantiene sin cambio significativo.

7.3.15.1 Cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E y citrato de Fe(III)

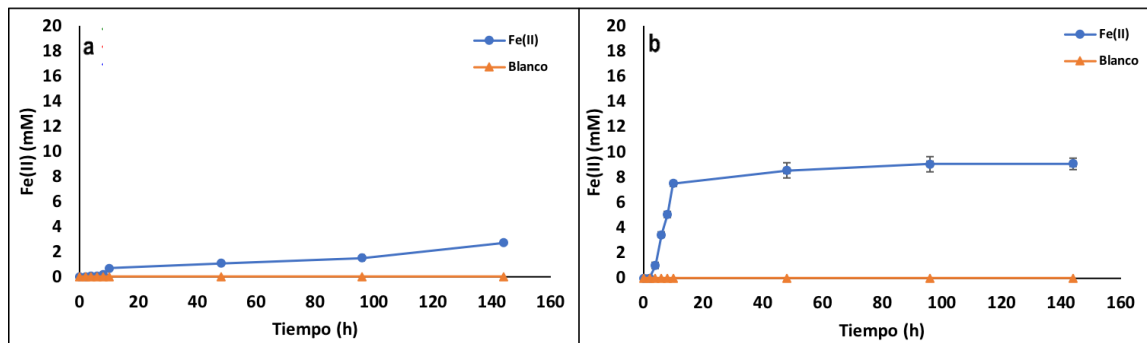


Figura 24. Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.2 Cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E y citrato de Fe(III)

En la Figura 25a-b se observa la reducción realizada por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* utilizando como donador de electrones glicerol y glucosa. En el caso de glicerol, la reducción de Fe(III) ocurre de manera constante desde el inicio del período de incubación, alcanzando 4.5 mM de Fe(II) a las 144 h de incubación (ver Figura 25a). Por otro lado, al utilizar glucosa como donador de electrones, ocurre una generación intensa de Fe(II). Durante las primeras 10 h de incubación se producen 8 mM de Fe(II). Posteriormente, ocurre una paulatina generación de Fe(II); alcanzando a las 144 h de incubación una concentración de 11.46 mM (ver Figura 25b).

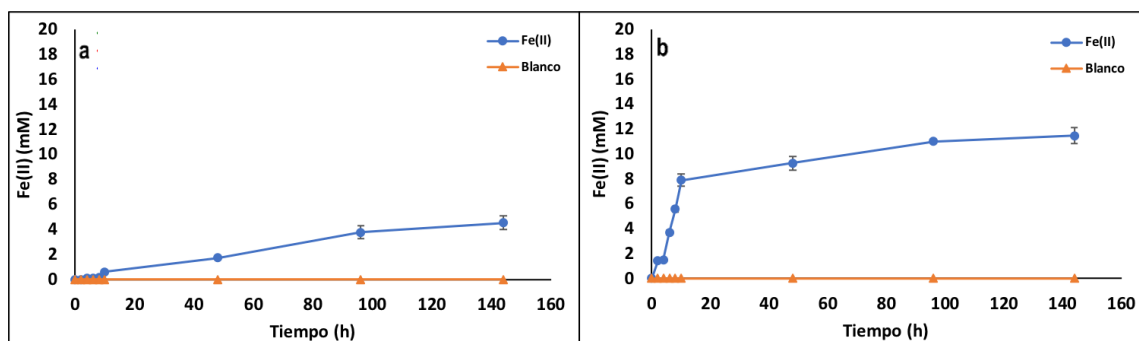


Figura 25. Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.3 Cultivo de *Shewanella oneidensis* y citrato de Fe(III)

La generación de Fe(II) por *S. oneidensis* presentó una producción máxima de 7.9 mM cuando se utiliza glicerol como donador de electrones (ver Figura 26a). Por otra parte, cuando la glucosa es utilizada como donador de electrones la producción máxima Fe(II) alcanza una concentración de 18.71 mM (ver Figura 26b). En ambos casos, la generación de Fe(II) fue superior a lo producido por cualquier otro cultivo en experimentación en el presente trabajo.

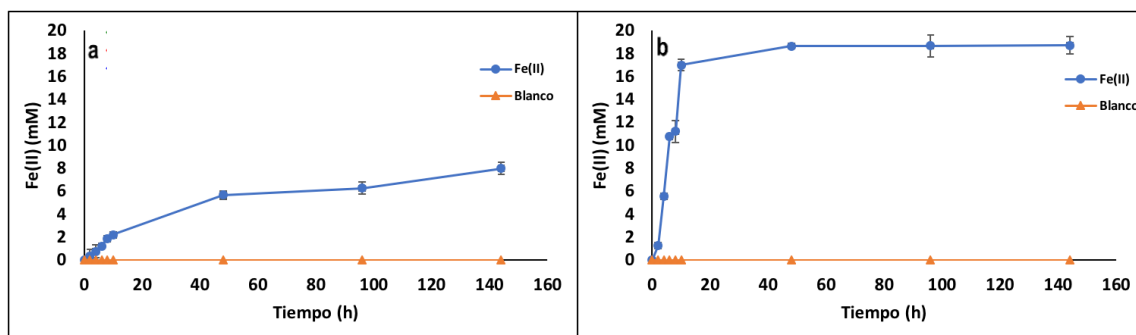


Figura 26. Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) por el cultivo de *S. oneidensis* a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.4 Cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E con citrato de Fe(III) y adicionado con prodigiosina exógena

La reducción de Fe(III) llevada a cabo por *S. marcescens* 11E (no pigmentada) con glicerol como donador de electrones en presencia de prodigiosina exógena es observada a continuación (ver Figura 27a-b). En este caso, la máxima concentración de Fe(II) producido cuando se utiliza glicerol como donador de electrones fue de 3.21 mM (ver Figura 27a). Por otro lado cuando la glucosa se utilizó como donador de electrones, la máxima producción de Fe(II) fue de 9.1 mM a las 144 h de incubación (ver Figura 27b). Estos valores son menores a los presentados por el mismo cultivo en ausencia de prodigiosina exógena (glicerol, 4.5 mM y glucosa, 11.4 mM).

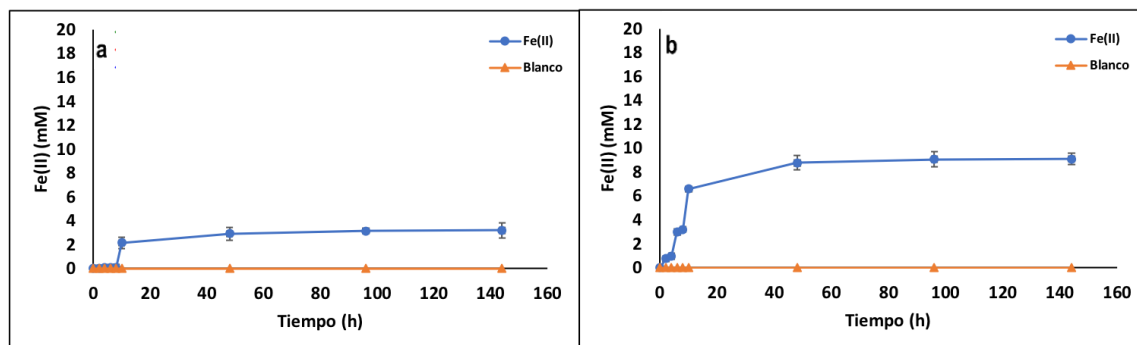


Figura 27. Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

El perfil de reducción de Fe(III) en la forma soluble (citrato de Fe(III)) acoplado a la oxidación de los donadores de electrones alternativos glicerol y glucosa es mostrado a continuación (ver Figura 28). Nuevamente el microorganismo de referencia *S. oneidensis* lleva a cabo la mayor reducción de Fe(III) al utilizar glicerol y glucosa como donadores de electrones. Este perfil es el esperado para este microorganismo. Por otro lado, *S. marcescens* 11E no pigmentada es el microorganismo que le sigue en cuanto al poder reductor al oxidar glicerol y glucosa. En el caso de *S. marcescens* 11E no pigmentada en presencia de prodigiosina exógena, se observa una reducción menor a la llevada a cabo por el cultivo anteriormente mencionado. Por último, *S. marcescens* 11E pigmentada es el microorganismo que lleva a cabo la producción de menor cantidad de Fe(II) utilizando ambos donadores de electrones. En base a estos resultados, es evidente que el cultivo no pigmentado *S. marcescens* 11E produce

una mayor cantidad de Fe(II) a partir de la reducción de Fe(III) soluble, al oxidar el donador de electrones glucosa.

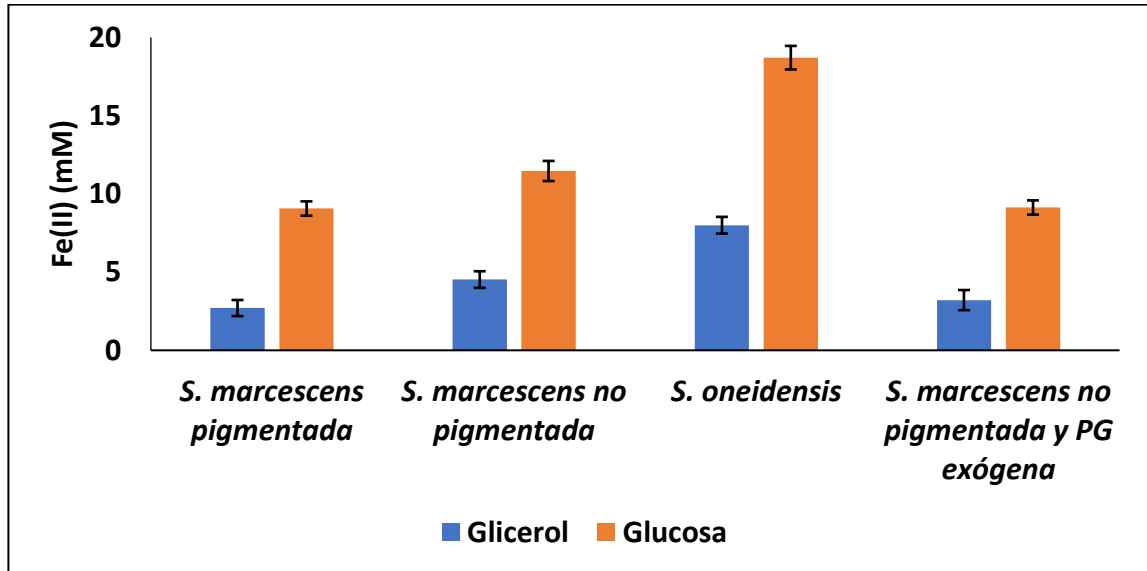


Figura 28. Producción de Fe(II) a partir de citrato de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.5 Cultivo pigmentado de *Serratia marcescens* 11E y óxido de Fe(III)

La producción de Fe(II) es observada a continuación (ver Figura 29a-b). En ella se aprecia que el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E no es capaz

de llevar a cabo la reducción de Fe(III) cuando el glicerol (ver Figura 29a) y glucosa (ver Figura 29b) son utilizados como donadores de electrones.

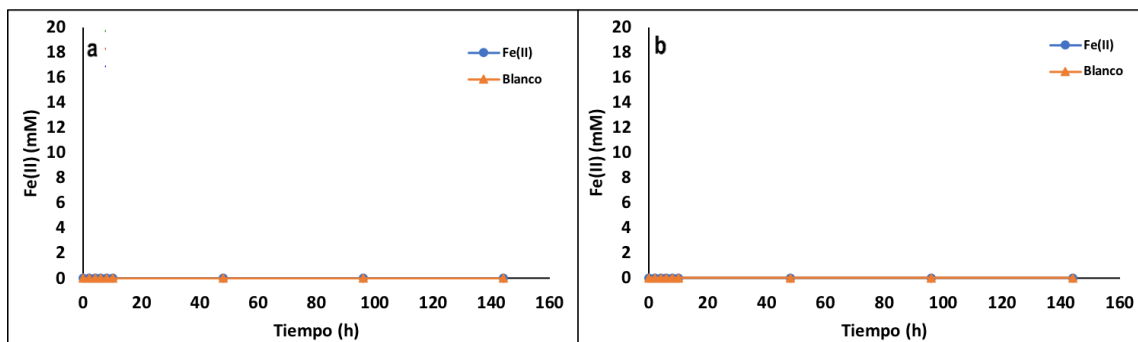


Figura 29. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.6 Cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* y óxido de Fe(III)

La reducción de Fe(III) llevada a cabo por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* es mostrada debajo (ver Figura 30a-b). En ella se visualiza que el glicerol como donador de electrones provoca que durante las primeras 10 horas ocurra de forma intensa la producción de 2.5 mM de Fe(II) (ver Figura 30a). Posteriormente, el proceso reductivo llevado a cabo por el microorganismo entra en una fase estacionaria en donde la producción de Fe(II) aumenta solamente

1.46 mM en un período de tiempo de 134 h. Por otro lado, cuando la glucosa es utilizada como donador de electrones, la reducción de Fe(III) llevada a cabo por el microorganismo ocurre de manera mas intensa y de forma estable desde el inicio del período de incubación. La concentración final de Fe(II) producida a las 144 h fue de 9.82 mM (ver Figura 30b).

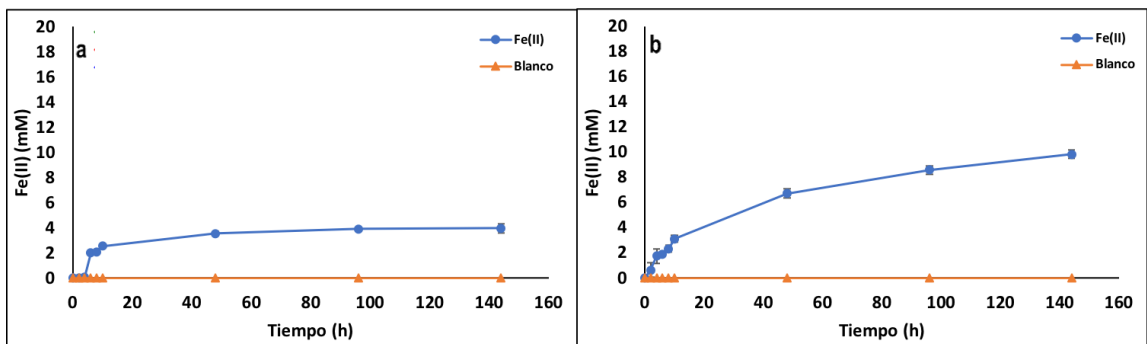


Figura 30. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.7 *Shewanella oneidensis* y óxido de Fe(III)

La producción de Fe(II) a partir de la reducción de Fe(III) por acción de *S. oneidensis* es observada a continuación (ver Figura 31a-b). En ella se observa que, al utilizar glicerol como donador de electrones, solamente se obtienen 6.66 mM de Fe(II) a las 144 h de incubación (ver Figura 31a). Por el contrario, cuando se utiliza glucosa como donador de electrones *S. oneidensis* lleva a cabo una mayor producción de Fe(II), alcanzando una máxima concentración de 19.06 mM a las 144 h de incubación (ver Figura 31b).

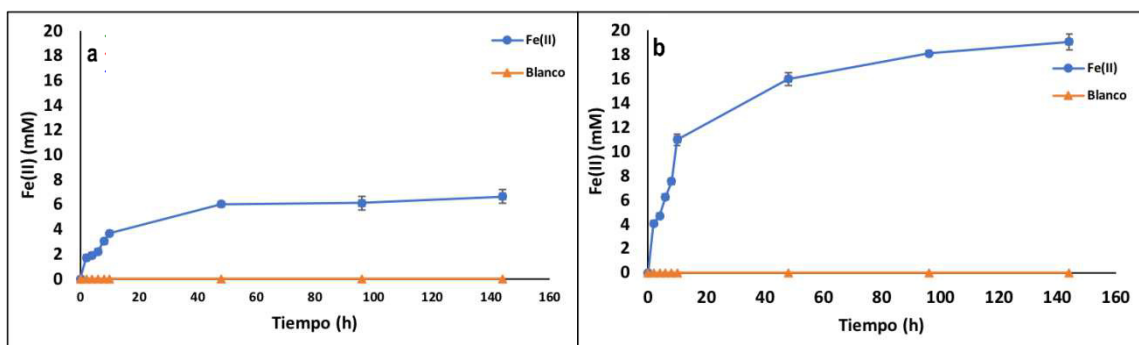


Figura 31. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por *S. oneidensis*. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.15.8 Cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* con óxido de Fe(III) y adicionado con prodigiosina exógena

La generación de Fe(II) a partir de la reducción de óxido de Fe(III) insoluble como aceptor de electrones y el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E como biocatalizador es mostrada a continuación (ver Figura 32a-b). En esta imagen se observa de nueva cuenta que el glicerol como donador de electrones no es lo suficientemente adecuado para generar una producción considerable de Fe(II). A las 144 h de incubación la concentración generada fue de 2.21 mM de Fe(II) (ver Figura 32a). Por el contrario, la utilización de glucosa como donador de electrones generó una concentración de 8.46 mM a las 144 h (ver Figura 32b).

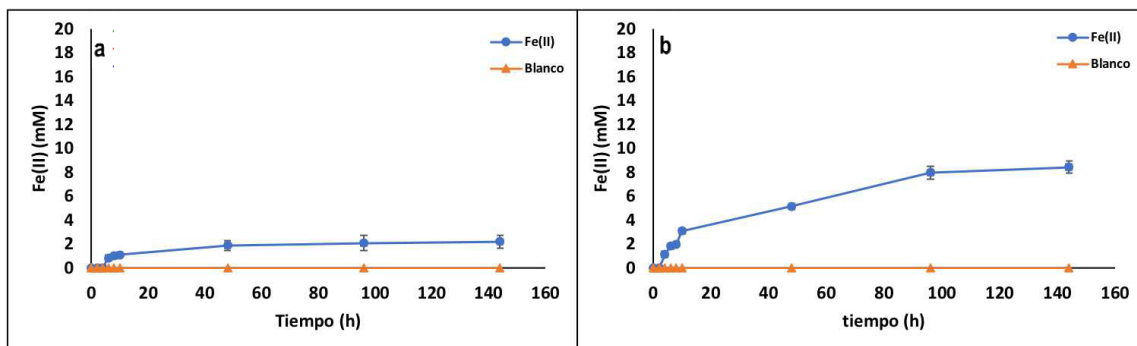


Figura 32. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) por cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en presencia de prodigiosina exógena. a) glicerol como donador de electrones; b) glucosa como donador de electrones. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

La reducción de Fe(III) insoluble (óxido de Fe(III)) llevado a cabo por los cultivos bacterianos en estudio utilizando como donadores de electrones glicerol y glucosa es mostrada a continuación (ver Figura 33). En este perfil comparativo se puede observar que de nueva cuenta el microorganismo de referencia *S. oneidensis* lleva a cabo una mayor producción de Fe(II) a las 144 h de incubación. Por otro lado, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E lleva a cabo una mayor reducción que la generada por el cultivo no pigmentado en el cual se adicionó prodigiosina extracelular. Para el caso de *S. marcescens* 11E pigmentada, no llevó a cabo producción de Fe(II) al utilizar glicerol y glucosa como donadores de electrones.

En este caso, de nueva cuenta es evidente que el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E lleva a cabo la mayor producción de Fe(II) a partir de Fe(III) insoluble cuando utiliza a la glucosa como donador de electrones.

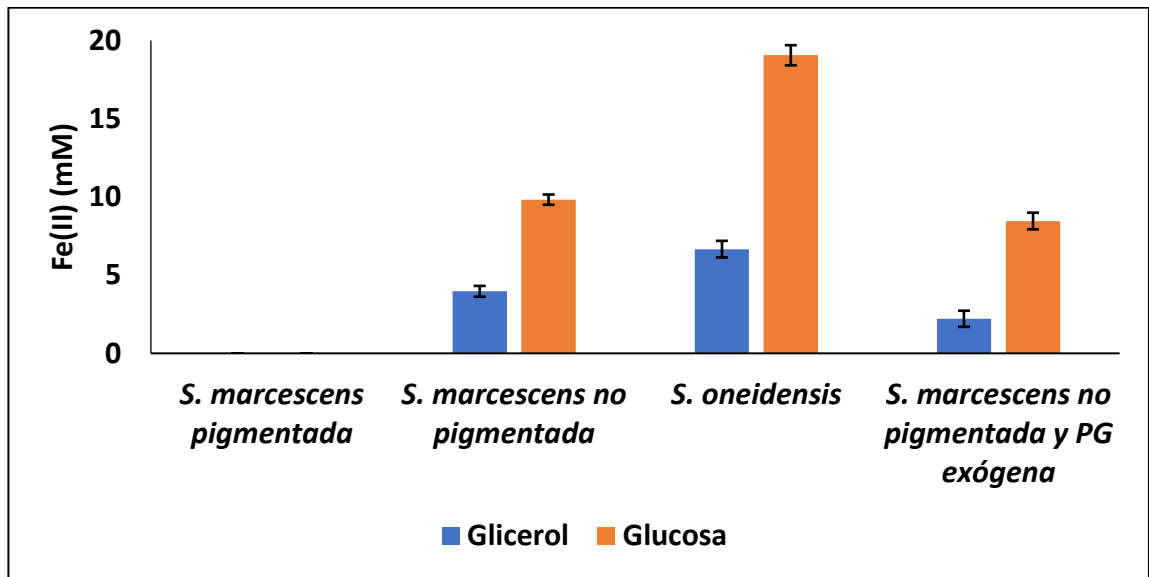


Figura 33. Producción de Fe(II) a partir de óxido de Fe(III) a las 144 h de incubación por los 4 cultivos bacterianos. La barra de error indica la desviación estándar de 3 réplicas.

En el presente capítulo se reportan también los porcentajes y la tasa de reducción para cada una de las bacterias en estudio (Ver TABLAS VI, VII, VIII y IX). En ellas se observa que aparte del cultivo reductor de Fe(III) de referencia *S. oneidensis*, el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E es el que muestra un mayor poder exoelectrogénico cuando utiliza glucosa como donador de electrones.

TABLA VI.

RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN, PORCENTAJE Y TASA DE REDUCCIÓN DE Fe(III) A LAS 144 h DE INCUBACIÓN POR EL CULTIVO PIGMENTADO DE *S. marcescens* 11E.

Condición experimental ¹	Fe(II) (mM)	Porcentaje de reducción (%)	Tasa de reducción (mM Fe(II)/mMFe(III)/h)
A + C-Fe(III)	6.3	31.4	0.00218
Gli + C-Fe(III)	2.7	13.5	0.00093
Glu + C-Fe(III)	9.1	45.3	0.00314
A + Fe ₂ O ₃	0	0	0
Gli + Fe ₂ O ₃	0	0	0
Glu + Fe ₂ O ₃	0	0	0

¹Abreviación de la condición experimental: A: acetato, C-Fe(III): Citrato de Fe(III), Gli: Glicerol, Glu: Glucosa

TABLA VII.

RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN, PORCENTAJE Y TASA DE REDUCCIÓN DE Fe(III) A LAS 144 h DE INCUBACIÓN POR EL CULTIVO NO PIGMENTADO DE *S. marcescens* 11E.

Condición experimental ¹	Fe(II) (mM)	Porcentaje de reducción (%)	Tasa de reducción (mM Fe(II)/mMFe(III)/h)
A + C-Fe(III)	9.7	48.6	0.00337
Gli + C-Fe(III)	2.7	22.5	0.00156
Glu + C-Fe(III)	11.5	57.3	0.00397
A + Fe ₂ O ₃	7.9	39.5	0.00274
Gli + Fe ₂ O ₃	4.0	19.8	0.00137
Glu + Fe ₂ O ₃	9.8	49.1	0.00341

¹Abreviación de la condición experimental: A: acetato, C-Fe(III): Citrato de Fe(III), Gli: Glicerol, Glu: Glucosa

TABLA VIII.

RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN, PORCENTAJE Y TASA DE REDUCCIÓN DE Fe(III) A LAS 144 h DE INCUBACIÓN POR EL CULTIVO DE *S. oneidensis*.

Condición experimental ¹	Fe(II) (mM)	Porcentaje de reducción (%)	Tasa de reducción (mM Fe(II)/mMFe(III)/h)
A + C-Fe(III)	18.1	90.5	0.00628
Gli + C-Fe(III)	7.9	39.0	0.00273
Glu + C-Fe(III)	18.7	93.5	0.00640
A + Fe ₂ O ₃	16.8	84.4	0.00586
Gli + Fe ₂ O ₃	6.6	33.3	0.00231
Glu + Fe ₂ O ₃	19.0	95.3	0.00661

¹Abreviación de la condición experimental: A: acetato, C-Fe(III): Citrato de Fe(III), Gli: Glicerol, Glu: Glucosa

TABLA IX.

RESUMEN DE LA PRODUCCIÓN, PORCENTAJE Y TASA DE REDUCCIÓN DE Fe(III) A LAS 144 h DE INCUBACIÓN POR EL CULTIVO NO PIGMENTADO DE *S. marcescens* 11E EN PRESENCIA DE PG EXÓGENA.

Condición experimental ¹	Fe(II) (mM)	Porcentaje de reducción (%)	Tasa de reducción (mM Fe(II)/mMFe(III)/h)
A + C-Fe(III)	8.01	40.0	0.00278
Gli + C-Fe(III)	3.21	16.0	0.00111
Glu + C-Fe(III)	9.13	45.6	0.00317
A + Fe ₂ O ₃	6.45	32.2	0.00220
Gli + Fe ₂ O ₃	2.21	11.0	0.00076
Glu + Fe ₂ O ₃	8.46	42.3	0.00293

¹Abreviación de la condición experimental: A: acetato, C-Fe(III): Citrato de Fe(III), Gli: Glicerol, Glu: Glucosa

7.3.16.1 Biopelícula del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E y determinación de su viabilidad celular

Los factores y los niveles alto y bajo del diseño Plackett-Burman desarrollado se presentan a continuación (ver TABLA X). Así mismo, se muestran los resultados que se obtuvieron al llevar a cabo la determinación de UFC cm⁻² del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E por el método de dilución y siembra en superficie siguiendo los lineamientos indicados en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. La generación de una biopelícula sobre el ánodo de grafito con un mayor número de UFC cm⁻² se logró para la corrida 7, en la cual se utilizó un inóculo de 20%, 30 °C, pH 6, concentración de medio de cultivo LB al 1%, 150 rpm por 5 días. Las micrografías de MEB muestran una alta concentración de células en la superficie del electrodo para esta corrida (ver Figura 34).

TABLA X.

DISEÑO PLACKET-BURMAN (FACTORIAL FRACCIONADO) CON UFC DE *S. marcescens* 11E NO PIGMENTADA COMO VALOR DE RESPUESTA

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Concentración medio LB (%)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)	% inóculo	UFC cm ⁻² (x 10 ³)
1	28	6	1	150	7	10	0
2	30	7	0.50	150	7	10	6
3	28	7	0.50	100	5	20	0
4	28	6	0.50	100	5	10	1.1
5	30	7	0.50	150	5	10	1
6	28	6	0.50	150	7	20	0
7	30	6	1	150	5	20	100
8	30	7	1	100	7	20	25
9	30	6	1	100	5	10	60
10	28	7	1	150	5	20	0
11	30	6	0.50	100	7	20	9
12	28	7	1	100	7	10	90 ⁴

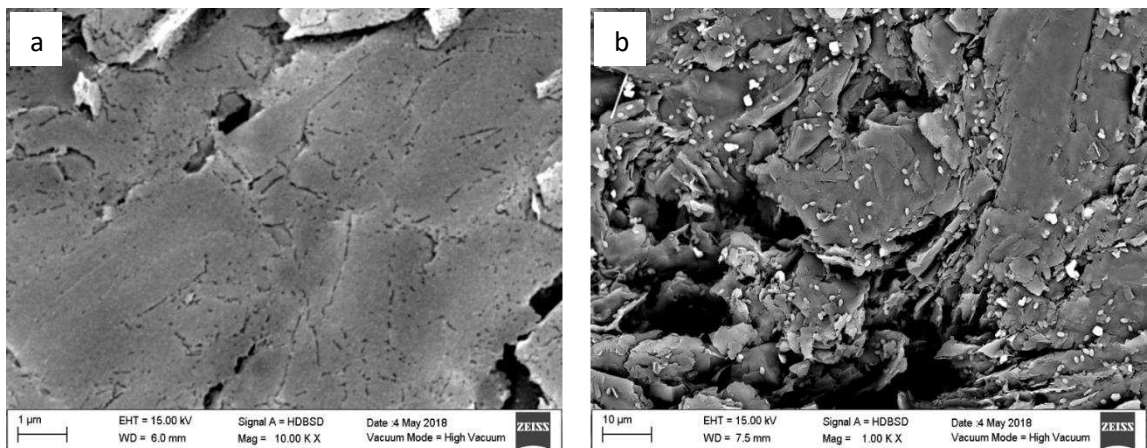


Figura 34. Micrografía de MEB del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E.

7.3.16.2 Biopelícula del cultivo de *S. oneidensis* y determinación de su viabilidad celular

Los factores y los niveles alto y bajo del diseño Plackett-Burman desarrollado se presentan a continuación (ver Tabla XI). Así mismo, se muestran los resultados obtenidos al llevar a cabo la determinación de UFC cm⁻² de *S. oneidensis* por el método de dilución y siembra en superficie siguiendo los lineamientos indicados en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. Al igual que para el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E, la generación de una biopelícula sobre el ánodo de grafito con un mayor número de UFC cm⁻² se logró con la corrida 7, en la cual se utilizó un inóculo de 20%, 30 °C, pH 6, concentración de medio de cultivo LB al 1%, 150 rpm por 5 días. Así mismo, las imágenes de MEB para la corrida 7 muestran una alta concentración de células en la superficie del electrodo (ver Figura 35).

TABLA XI.

DISEÑO PLACKET-BURMAN (FACTORIAL FRACCIONADO) CON UFC DE *S. oneidensis* COMO VALOR DE RESPUESTA

Corrida	Temperatura (°C)	pH	Concentración medio LB (%)	Agitación (rpm)	Tiempo (días)	% inóculo	UFC cm ⁻² (x 10 ³)
1	28	6	1	150	7	10	0
2	30	7	0.50	150	7	10	6
3	28	7	0.50	100	5	20	0
4	28	6	0.50	100	5	10	0.99
5	30	7	0.50	150	5	10	1.8
6	28	6	0.50	150	7	20	0
7	30	6	1	150	5	20	180
8	30	7	1	100	7	20	140
9	30	6	1	100	5	10	45
10	28	7	1	150	5	20	0
11	30	6	0.50	100	7	20	7
12	28	7	1	100	7	10	76

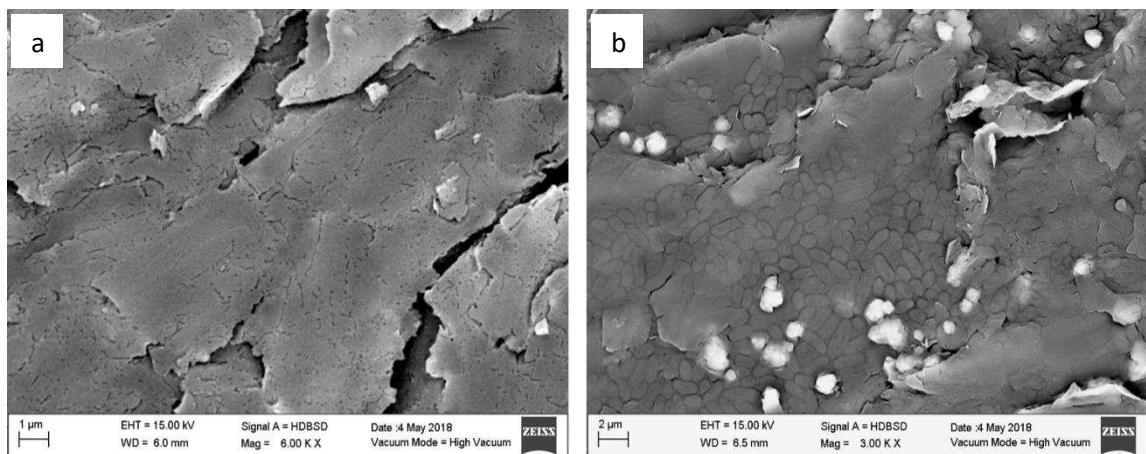


Figura 35. Micrografía electrónica de barrido del cultivo de *S. oneidensis*

7.3.17 Desempeño del bioánodo generado en una CCM de doble cámara

7.3.17.1 Configuración y operación de la CCM

A continuación, se muestra la configuración de la CCM diseñada para ser utilizada en el presente estudio.

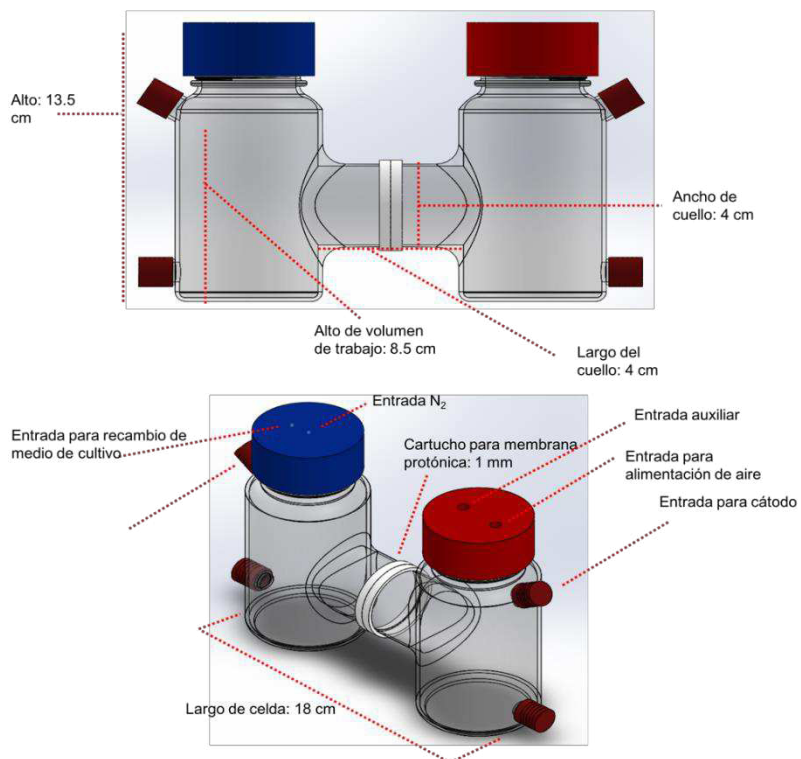


Figura 36. Celda de combustible microbiana diseñada en el programa Solidworks.

El panel frontal y el diagrama de bloque desarrollado en LabVIEW para la medición automática de mV y mA es mostrada a continuación (ver Figura 37). En el panel frontal se programaron los muestreos de mV y mA para la CCM.

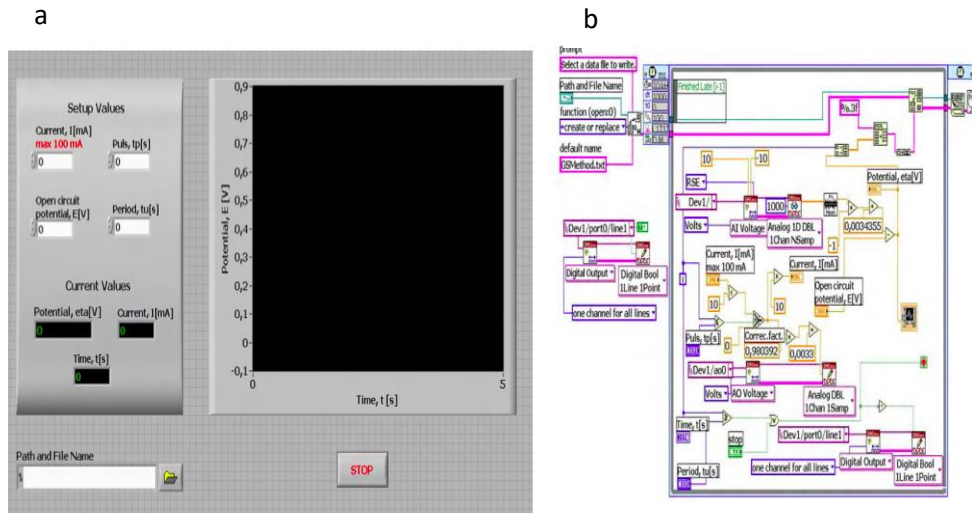


Figura 37. a) Panel frontal, b) Diagrama de bloque programado en LabVIEW

7.3.17.2 Bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E

La Figura 38 muestra la CCM acoplada al sistema de monitoreo vía interface LabVIEW. Los datos experimentales muestran la actividad bioelectrogénica basada en el voltaje y en la corriente en modo de circuito abierto

y utilizando como biocatalizador el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E obtenido en la sección 7.3.15.9.

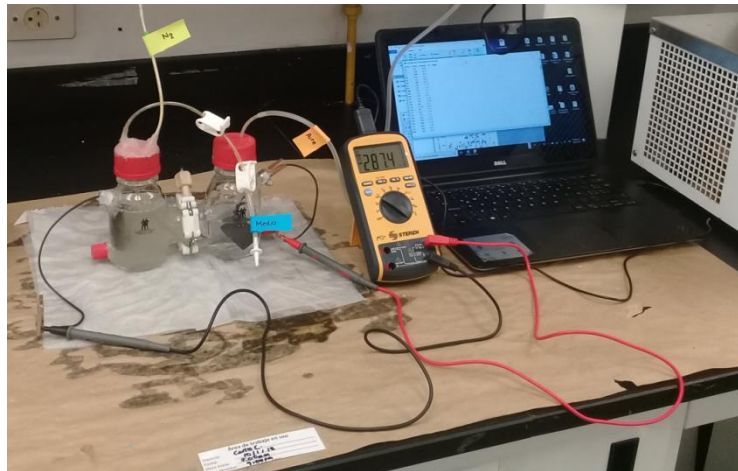


Figura 38. Sistema de monitoreo de mV-mA de CCM con *S. marcescens* 11E no pigmentada como biocatalizador

La Figura 39 muestra la actividad bioelectrogénica que genera la CCM a través de 8 ciclos de operación que se identificaron dentro de las 444 h de estudio. En esta imagen se apreció que desde el primer ciclo es detectable un voltaje de circuito abierto estable (340 mV). Posteriormente, los siguientes ciclos muestran esta misma tendencia en cuanto a la máxima cantidad de voltaje detectado (340-350 mV). Respecto a la generación de corriente, en principio durante los ciclos 1 y 2 la máxima cantidad de corriente generada fue de 3.5 mA. Posteriormente, el resto de los ciclos (ciclo 3 al ciclo 8) mostraron un incremento

hasta alcanzar 4.5 mA. Es importante mencionar que la diferencia de corriente entre los 3.5 mA generados en los ciclos 1 y 2 y los 4.5 mA generados en el resto de los ciclos muestran diferencia significativa ($p < 0.005$).

Con los datos anteriores, fue posible calcular la densidad de potencia generada por la CCM. Un aspecto importante mostrado por esta CCM es que el voltaje de circuito abierto (medido en mV) y la corriente (medida en mA) muestran una recuperación en cuanto a la lectura generada al momento de que se hizo el recambio de líquido anódico. El recambio es representado por cada ciclo (ver Figura 39).

En la Figura 40 se observa la densidad de potencia generada por la CCM con el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens*. En el ciclo 1 y 2 se presentó una densidad de potencia de alrededor de 23 mW cm⁻². Posteriormente en los ciclos restantes (ciclo 3-8) se observó una densidad de potencia estable entre los 28 y 30 mW cm⁻². En esta imagen es evidente que la densidad de potencia aumenta rápidamente después de hacer el recambio del líquido anódico (representado por cada aparición de ciclos).

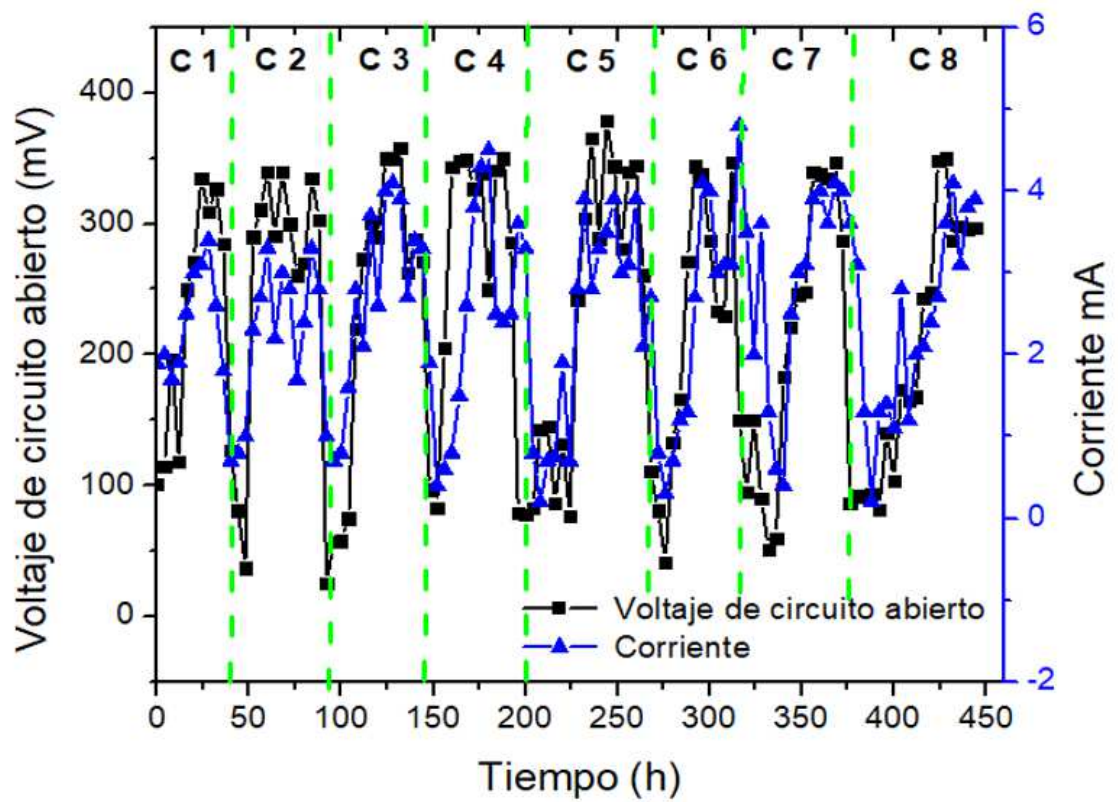


Figura 39. Actividad bioelectrogénica de la CCM con bioánodo pre-acondicionado de *S. marcescens* 11E no pigmentada como biocatalizador

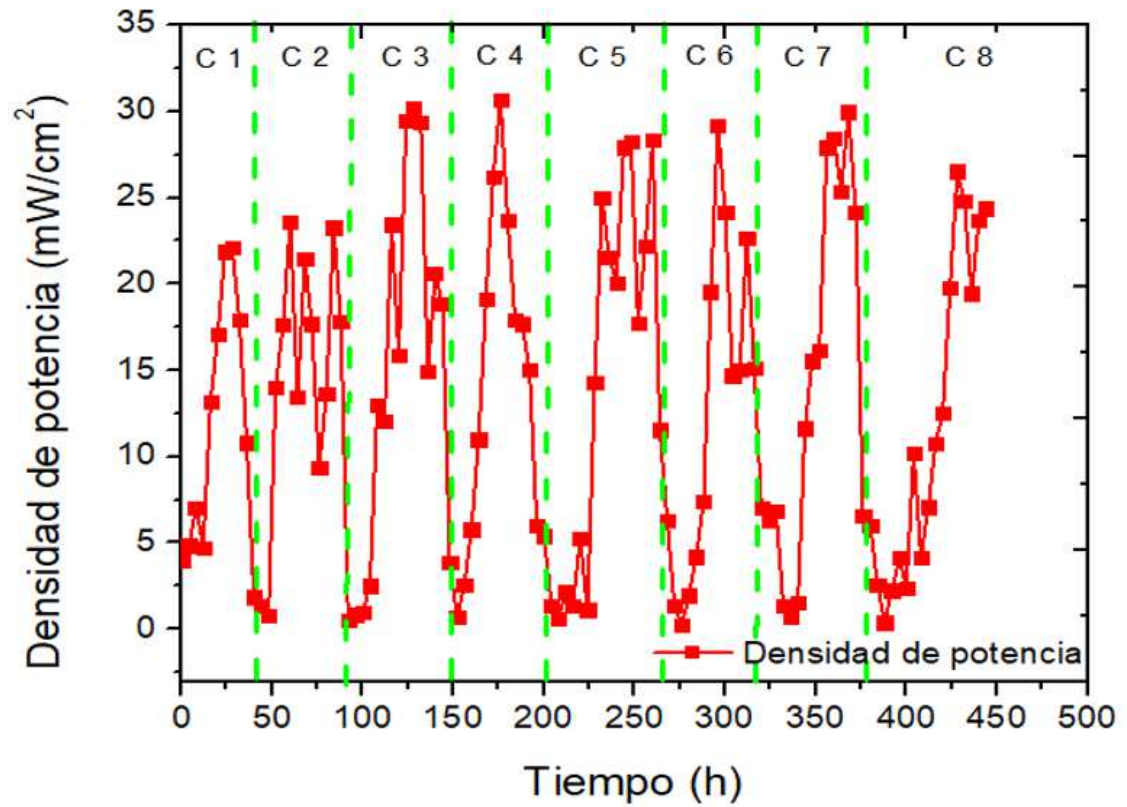


Figura 40. Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM con bioánodo pre-acondicionado de *S. marcescens* 11E no pigmentada como biocatalizador.

7.3.17.3 Bioánodo pre-acondicionado de *Shewanella oneidensis*

La Figura 41 muestra la CCM acoplada al sistema de monitoreo vía la interface generada mediante LabVIEW. Los datos experimentales muestran la actividad bioelectrogénica basada en el voltaje y la corriente producida en modo de circuito abierto utilizando como biocatalizador el bioánodo pre-acondicionado del cultivo de *S. oneidensis* obtenido en la sección 7.3.15.10.

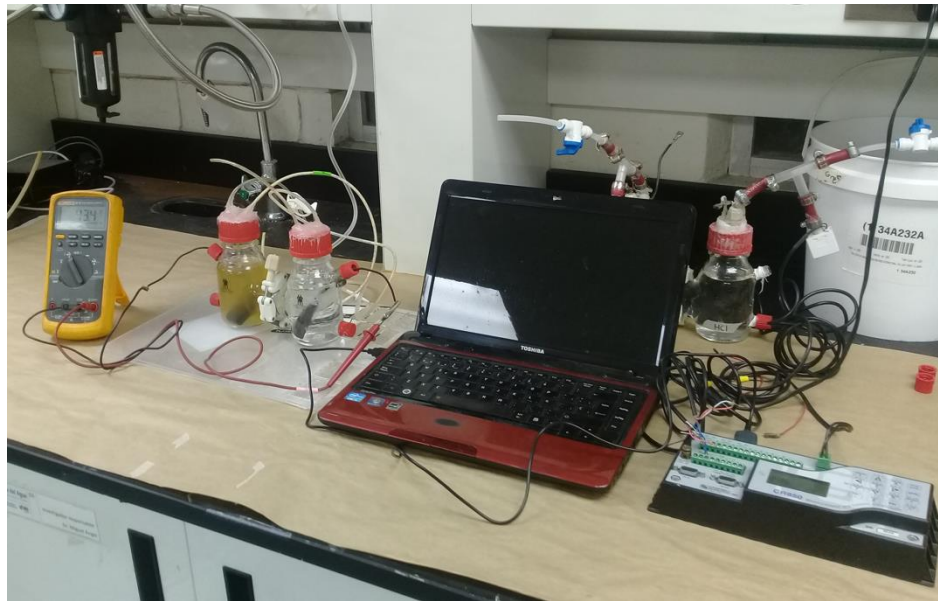


Figura 41. Sistema de monitoreo de mV-mA de CCM con *S. oneidensis* como biocatalizador

La Figura 42 muestra la actividad bioelectrogénica que genera la CCM a través de los 8 ciclos que fueron identificados durante las 444 h de duración del análisis. En esta imagen se observó que desde el ciclo 1 se presenta una constante generación de mV (alrededor de 700 mV). De la misma manera, la corriente generada se mantiene constante (alrededor de 14 mA). Para ambos casos no se observó la aparición de algún período de adaptación ya que como es evidente la estabilización de los mV y de los mA ocurre desde el primer ciclo. Se observó también que cada 14 horas ocurre una disminución pronunciada de estos parámetros y que al momento de hacer el recambio de líquido anódico se produjo una recuperación en la generación de mV y mA hasta el nivel de 700 mV y 14 mA.

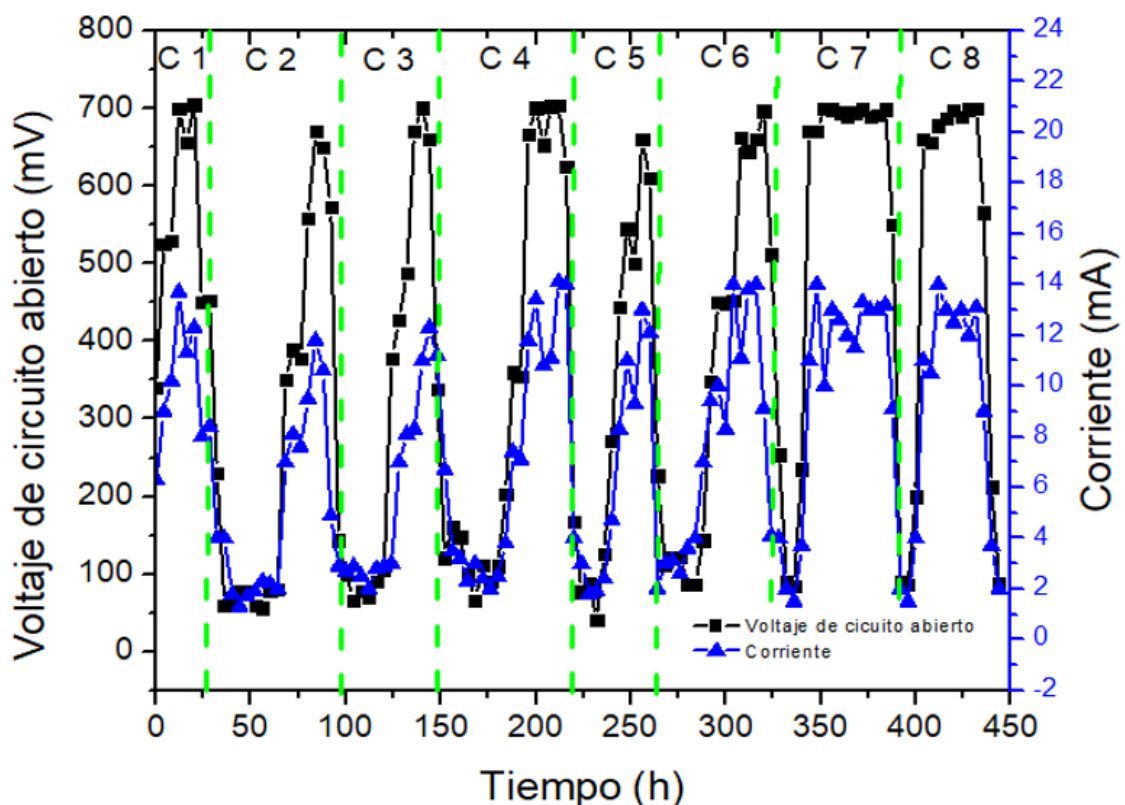


Figura 42. Actividad bioelectrogénica de CCM con bioánodo pre-acondicionado de *S. oneidensis* como biocatalizador

La densidad de potencia generada por esta misma CCM fue calculada y graficada (ver Figura 43). En esta figura es posible observar que la densidad de potencia del ciclo 1 es de 200 mW cm^{-2} . Por otro lado, la densidad de potencia mostrada en el ciclo 2 y 3 es de 170 mW cm^{-2} . Es importante destacar, que el ciclo 4 presentó una lectura de mW cm^{-2} de 235, el cual es superior al resto de los ciclos (1,2,5,6,7 y 8). Por último, los ciclos (5 al 8) muestran una densidad de potencia de $179\text{-}182 \text{ mW cm}^{-2}$. Esta CCM mostró fluctuaciones de densidad de

potencia a lo largo de las 444 h de estudio, sin embargo, son valores muy uniformes y no muy distantes entre ellos. Aun así, el ciclo 1 muestra diferencia significativa comparado con los valores de los ciclos 2, 3 y 4. Por el contrario, este mismo ciclo no muestra diferencia significativa con los ciclos 5 al 8 ($p < 0.005$).

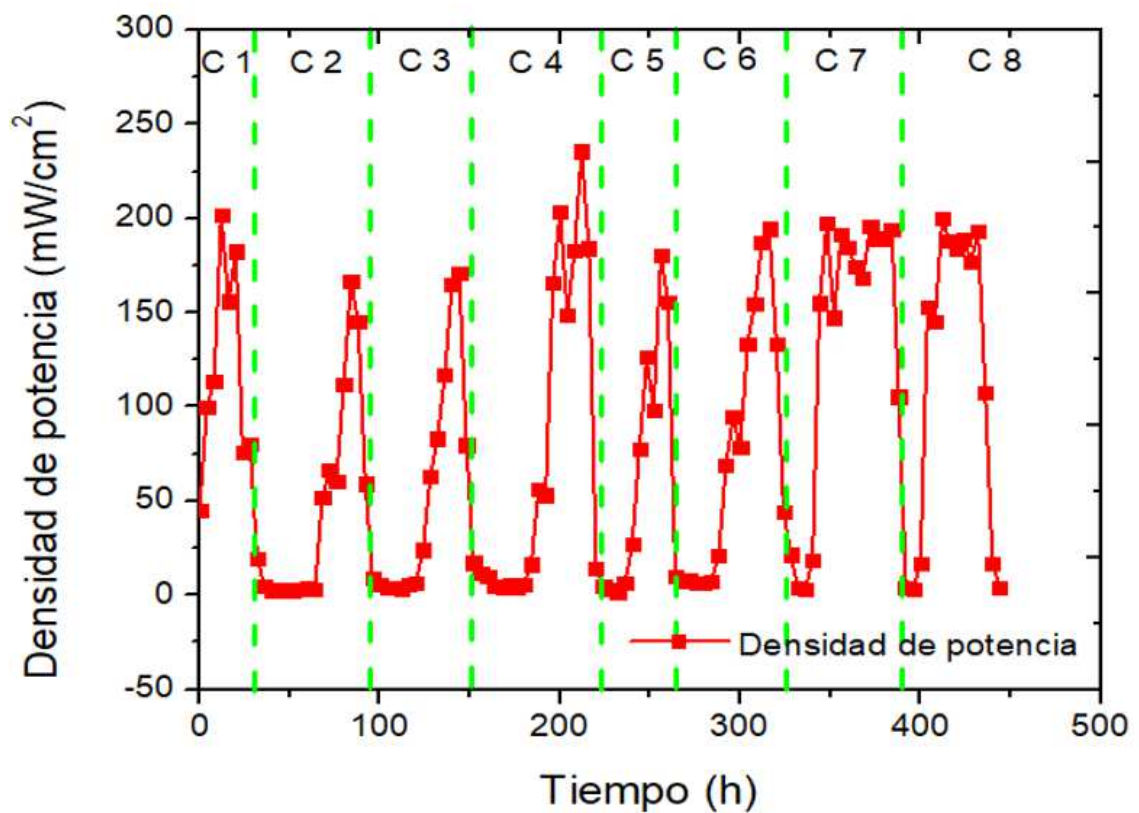


Figura 43. Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM con bioánodo pre-acondicionado de *S. oneidensis* como biocatalizador

7.3.17.4 Cultivo planktónico y no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E

El monitoreo y registro de datos para esta CCM se llevó a cabo por medio del mismo sistema vía interface LAbVIEW mostrado en la Figura 38. La Figura 44 muestra la actividad bioelectrogénica que genera la CCM que utilizó un cultivo planktónico y no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E como biocatalizador a través de 7 ciclos de operación que se identificaron dentro de las 444 h de estudio. Durante el primer ciclo se percibe un voltaje de circuito abierto de 225 mV. Posteriormente, en el ciclo 2 hay una pequeña disminución de 55 mV. Posteriormente, ocurrió un aumento hasta alcanzar 237 mV en el ciclo 3. En el ciclo 4, 5, 6 y 7 se observó un aumento en el voltaje de circuito abierto en donde la generación máxima alcanzada fue de 275-280 mV. Así mismo, la generación de corriente durante los primeros 3 ciclos siguió un patrón similar al del voltaje de circuito abierto. Una corriente máxima de 2.3 mA fue detectada durante el primer ciclo, posteriormente en el segundo ciclo se detectó una corriente de 1.8 mA y 2.2 mA en el tercer ciclo. Durante los ciclos 4, 5, 6 y 7 se presentó una estabilización de la corriente generada (3.7 mA).

La densidad de potencia generada por la CCM fue calculada y graficada. Esta densidad de potencia mostró correlación directa con el voltaje de circuito abierto y el perfil de corriente generado (ver Figura 45). La densidad de potencia máxima del ciclo 1 fue de 7.5 mW cm^{-2} , de 6.3 mW cm^{-2} en el ciclo 2 y 7.8 mW cm^{-2} en el 3. Posteriormente, se observó una estabilización en los siguientes

ciclos (4-7) en donde 22.7 mW cm^{-2} fue la máxima densidad de potencia alcanzada.

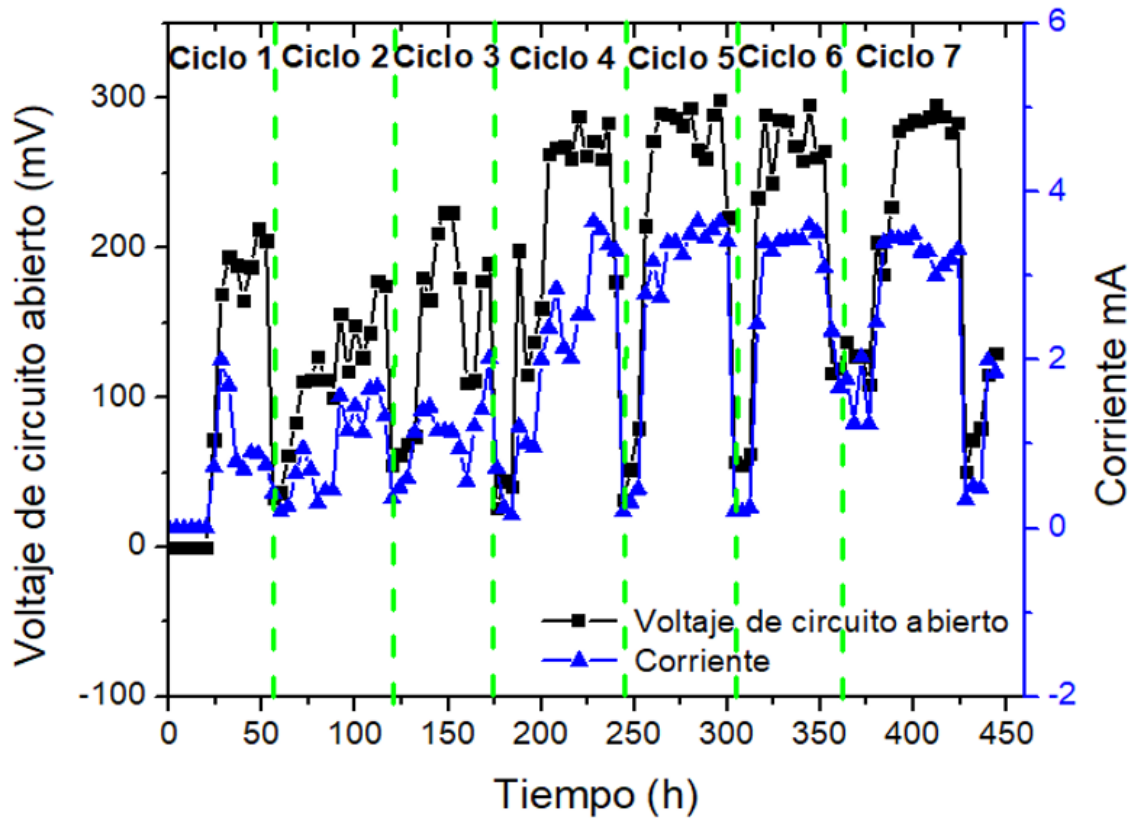


Figura 44. Actividad bioelectrogénica de la CCM con cultivo planktónico y no pigmentado de *S. marcescens* 11E como biocatalizador

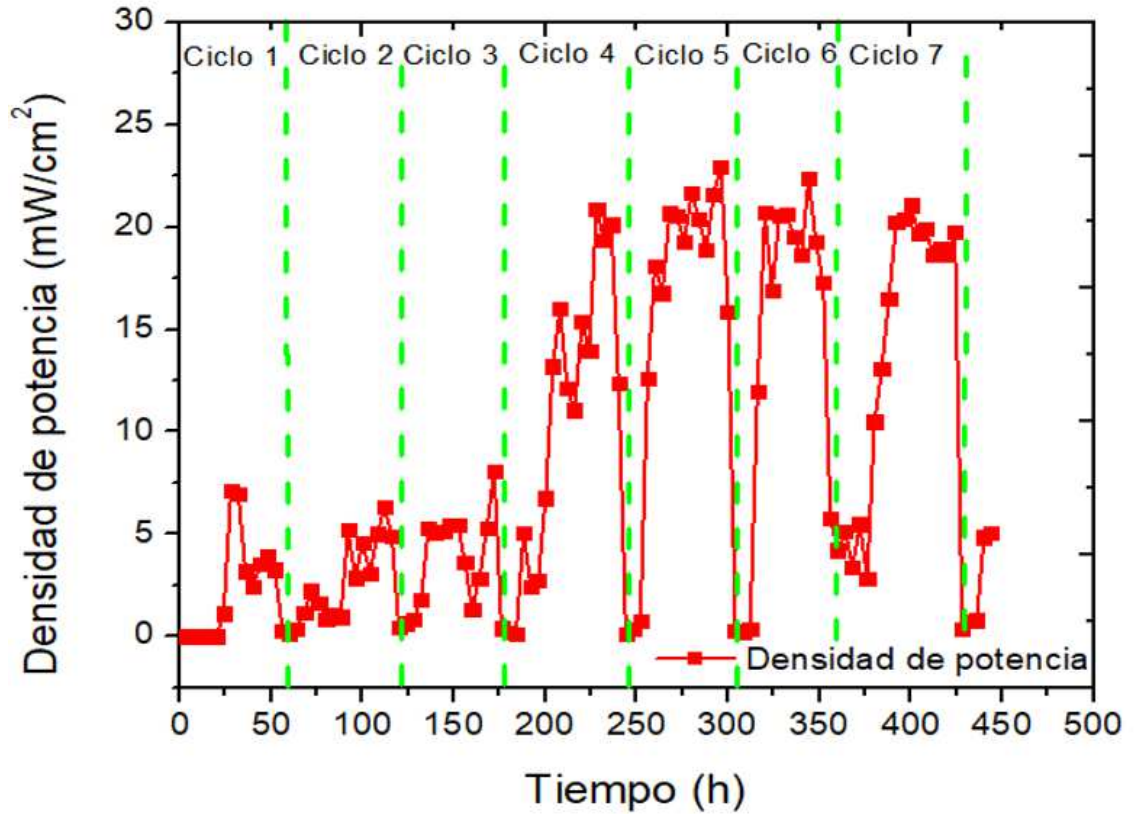


Figura 45. Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM con cultivo planktónico y no pigmentado de *S. marcescens* 11E como biocatalizador

7.3.17.5 Cultivo planktónico de *Shewanella oneidensis*

El sistema de monitoreo de esta CCM se llevó a cabo vía interface generada mediante LabVIEW mostrado en la Figura 41. La Figura 46 muestra los resultados experimentales obtenidos del análisis bioelectrogénico de la CCM que

utilizó un cultivo planktónico de *S. oneidensis* como biocatalizador. En esta imagen se observó un rápido período de adaptación a la CCM, ya que solo ocupó de 2 ciclos en los cuales el voltaje de circuito abierto y la corriente generada tienen valores muy estables de alrededor de 380 mV y 7.5 mA, respectivamente. Posteriormente, en los ciclos 3 al 10 se observó una estabilización del voltaje de circuito abierto y de corriente, en los cuales los valores máximos fueron de 500 mV y 8.5 mA, respectivamente. Es importante destacar, que en esta CCM la estabilización del cultivo planktónico sobre el ánodo (generación de la biopelícula activa) ocurre de manera muy rápida. Este aspecto es evidente también después de cada ciclo de recambio de líquido anódico.

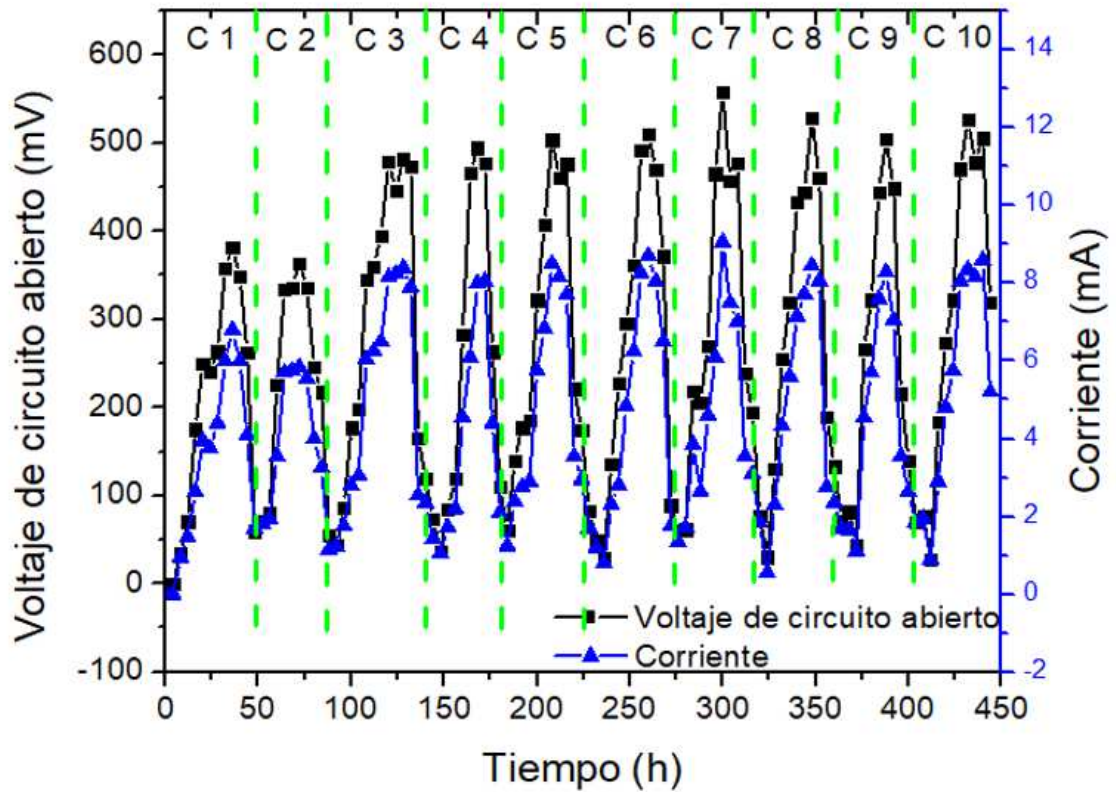


Figura 46. Actividad bioelectrogénica de la CCM con cultivo planktónico de *S. oneidensis* como biocatalizador

La densidad de potencia generada por esta misma CCM fue calculada (ver Figura 47). En esta figura se observó que la densidad de potencia del ciclo 1 es de 55.5 mW cm^{-2} y en el ciclo 2 de 48.8 mW cm^{-2} . Posteriormente, durante los ciclos 3 al 6, la máxima densidad de potencia alcanzada es de 90 mW cm^{-2} , en el ciclo 7, se observó una densidad de potencia de 110 mW cm^{-2} . Finalmente, en los ciclos 8, 9 y 10 la densidad de potencia es de 90 mW cm^{-2} .

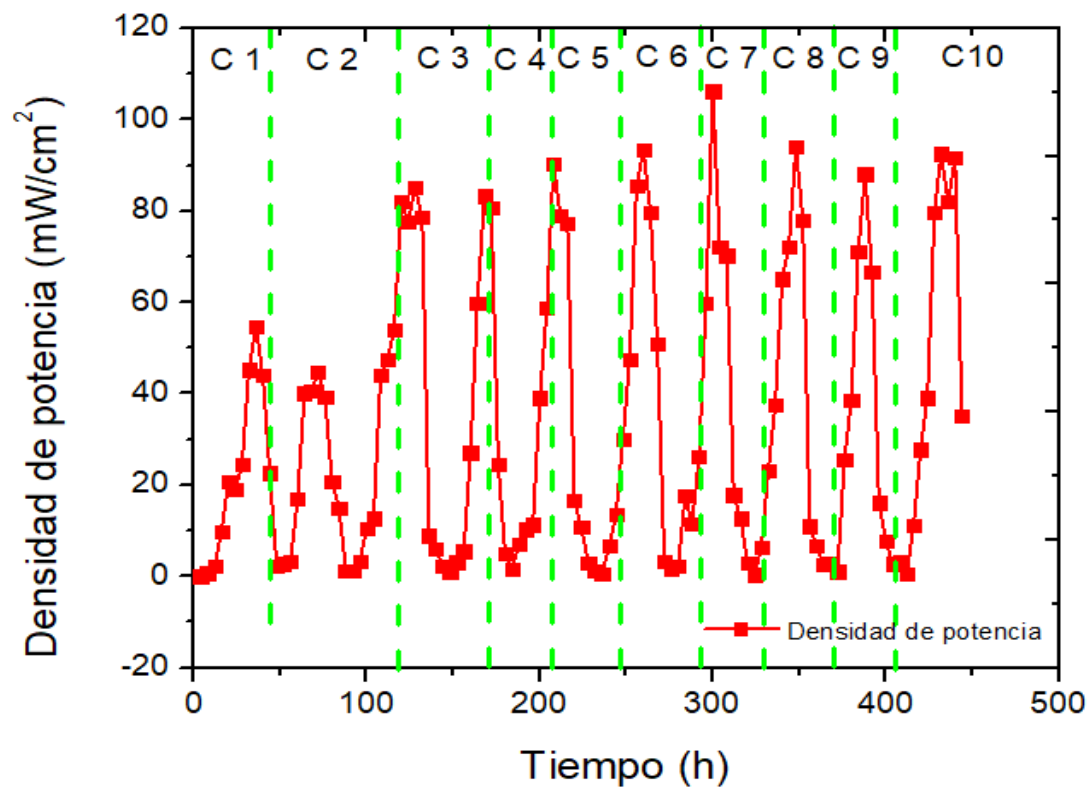


Figura 47. Densidad de potencia en función de cada ciclo de la CCM con cultivo planktónico de *S. oneidensis* como biocatalizador

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

En este estudio fue imposible llevar a cabo la identificación de la especie del cultivo parcialmente catalogado como *Serratia* utilizando pruebas bioquímicas convencionales. Esto debido a que la prodigiosina producida por este microorganismo interfirió con el color generado en algunas pruebas bioquímicas como lo fueron la prueba de indol, rojo de metilo y VP. En cuanto a las pruebas de citratos, ornitina descaroxilasa, motilidad y gelatinasa coinciden con lo reportado por Hejazi y Falkiner (1997) y Grimont y Grimont (2006) para cepas de *Serratia marcescens*. La complicación en la identificación de cepas altamente pigmentadas es un problema comúnmente presentado en la literatura y en la cual se recomienda llevar a cabo la identificación por técnicas moleculares (1).

El análisis molecular del rRNA 16S identificó a la cepa bacteriana como la Gammaproteobacteria *Serratia marcescens* con un 99 % de similitud con *Serratia marcescens* JQ308604. Posteriormente, la construcción del árbol filogenético

generado por el método Neighbor-Joining estableció a la bacteria aislada junto con algunas otras especies de *Serratia* (ver Figura 10). Este resultado coincide con anteriores estudios en los que se ha llevado a cabo el aislamiento de bacterias de la familia de las Gammaproteobacterias en sitios con altas concentraciones de Fe(III). Algunas de estas bacterias son *Shewanella oneidensis* y *Acidobacter ferrireducens* (Ziegler *et al.*, 2013).

Serratia marcescens es una bacteria que se encuentra generalmente en ambientes bióticos como abióticos y en general 2 biotipos de esta bacteria se describe en la literatura (*S. marcescens* pigmentada y no pigmentada) (Carbonell *et al.*, 2000). Sin embargo, en el medio ambiente, una cepa puede cambiar fenotípicamente dependiendo de los nutrientes que tenga a su disposición y como un mecanismo de protección contra otras bacterias (Danevcic *et al.*, 2016). De manera similar en este estudio, *S. marcescens* 11E fue capaz de cambiar fenotípicamente del estado pigmentado al no pigmentado por medio del bloqueo de metabolitos secundarios usando una gran concentración de glucosa. Esta táctica se muestra en varios estudios en los que este sustrato se consume activamente para producir células, pero poco para producir metabolitos secundarios (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2010).

Una amplia gama de bacterias utilizan donadores de electrones como acetato, glicerol, lactato, extracto de levadura y etanol para reducir las formas solubles y no solubles de Fe(III). En general, varias bacterias pertenecientes a Alphaproteobacteria (*Ochrobactrum anthropi*), Betaproteobacteria (*Rhodoferax ferrireducens*) y Deltaproteobacteria (*Geobacter sulfurreducens*) muestran esta capacidad. Es importante destacar que los donantes de electrones mencionados anteriormente se encuentran comúnmente en el medio ambiente, algunos de ellos como resultado del proceso de fermentación anterior realizado por otros microorganismos (Glombitza *et al.*, 2015).

En el contexto relacionado con el donante de electrones que mostró un mayor acoplamiento con la reducción de citrato de Fe(III), el presente estudio muestra que tanto el cultivo pigmentado y no pigmentado de *S. marcescens* 11E son capaces de oxidar la glucosa activamente y realizar una mejor reducción de Fe(III). Además, el acetato fue el segundo mejor donante de electrones preferido por ambos fenotipos de *S. marcescens* 11E para llevar a cabo la reducción de Fe(III). Es importante destacar que los primeros estudios muestran que el glicerol es un excelente donante de electrones, que puede ser oxidado por cultivos de *S. marcescens* con una gran tasa de producción de Fe(II) en un ambiente extremadamente ácido (Adams *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente estudio, la oxidación del glicerol por *S. marcescens* 11E fue menos eficiente en comparación con el acetato y la glucosa. Por lo tanto, la presente investigación no apoya estudios previos que muestren que el glicerol es un excelente donante de electrones para llevar a cabo la reducción de Fe(III) por bacterias pertenecientes al género *Serratia*. Una razón importante para esto es que nuestro

experimento se realizó a pH neutro, mientras que el estudio anterior se realizó utilizando una cepa de la bacteria *Serratia* aislada de ambientes extremos, como drenaje de mina ácida en donde los microorganismos prefieren no usar acetato como donador de electrones debido a la toxicidad de este ácido protonado (Chun *et al.*, 2014; Harrison, 1984). En el caso de la reducción llevada a cabo en presencia de Fe_2O_3 (forma no soluble de Fe(III)) como aceptador de electrones, el donante de electrones más eficiente utilizado por *S. marcescens* 11E es glucosa > acetato > glicerol. Este resultado es debido a la capacidad fermentativa de la bacteria en estudio. Este comportamiento coincide con estudios previos que describen algunas cepas fermentativas que realizan el metabolismo de la glucosa con la producción concomitante de equivalentes reductores los cuales impactan directamente la producción de Fe(II) (Degelmann *et al.*, 2009).

Ambos fenotipos de *S. marcescens* 11E fueron capaces de realizar reducción de citrato de Fe(III) de hasta el 57% con tasas de reducción de 0.31 a 0.39 mM Fe(II) mM^{-1} Fe(III) h^{-1} a pH neutro. De manera similar, para Fe_2O_3 el porcentaje de reducción fue de 49.5% con una tasa de reducción de 0.34 mM Fe (II) mM^{-1} de Fe(III) h^{-1} usando glucosa como donante de electrones. Estos resultados son superiores a los límites de reducción presentados por las cepas bacterianas *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* Z-7952 (21%), *Desulfonatronum lacustre* Z-7951 (17.7%), *Dethiobacter alkaliphilus* Z-1002 (31%) y *Desulfurispira natronophila* AH11 (2 %) en un estudio reciente (Zavarzina *et al.* 2018).

En el presente estudio, *S. marcescens* 11E realizó una reducción de Fe(III) en presencia y ausencia de prodigiosina. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre la bacteria pigmentada y la no pigmentada ($p < 0.05$). Notablemente, la forma no pigmentada redujo una cantidad superior de ambas formas de Fe(III) que el fenotipo pigmentado. En cuanto a la forma de Fe(III) no soluble, el fenotipo pigmentado genera un porcentaje de reducción es nula. Esta incapacidad de reducción de Fe(III) es interpretada como consecuencia de la presencia de prodigiosina. Es posible que este pigmento en la célula bacteriana (*S. marcescens* 11E pigmentada) actúe como una barrera que impida el flujo de los electrones desde la superficie bacteriana hacia el aceptor de electrones.

Diferentes estudios han descrito a la prodigiosina y algunos otros productos bacterianos como barreras físicas/químicas utilizadas para evitar el contacto con microorganismos depredadores y metales pesados (Gupta y Diwan, 2017; Stubbendieck y Straight, 2016).

Además observamos que el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E lleva a cabo la reducción de la forma no soluble de Fe(III). Por el contrario, el cultivo pigmentado no realizó reducción alguna de esta forma de Fe(III). Este resultado indica que para el fenotipo no pigmentado, la reducción de Fe(III) se realiza preferiblemente por contacto directo de la superficie celular con la forma de Fe(III) no soluble. En base a estos resultados se propone que la prodigiosina en la superficie bacteriana de *S. marcescens* 11E no permite la transferencia de electrones al aceptor de electrones final no soluble. La imposibilidad de reducir la forma no soluble de Fe(III) en presencia de prodigiosina en la superficie

bacteriana, contradice algunos estudios iniciales que mencionan el comportamiento catalítico y la posible actividad redox de los grupos pirrólicos de la prodigiosina (Manderville, 2001; Tomat, 2016).

En el presente estudio, se utilizó un cultivo de *S. oneidensis* como control positivo de reducción de Fe(III), comparado este cultivo con los cultivos de *S. marcescens* (pigmentada y no pigmentada) la reducción que lleva a cabo el primero es mucho mayor a la llevada a cabo por las bacterias del género *Serratia* esto coincide con diversas investigaciones en las cuales se estudia la reducción llevada a cabo por *S. oneidensis* (Fu *et al.*, 2016).

En este trabajo de investigación, también se estudió la capacidad de la prodigiosina extraída del cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E para actuar en un cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E como mediador redox exógeno. Como es mostrado en los datos presentados en la sección de resultados, la adición de prodigiosina en el medio no mejora la producción de Fe(II) generado por el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E (ver Tablas VII y IX).

En el caso de la reducción de óxido de Fe(III), el cual es una forma insoluble de este metal, se ensayó para los 3 cultivos en estudio, *S. marcescens* 11E (pigmentada), *S. marcescens* 11E (no pigmentada) y *S. oneidensis* (como cultivo de referencia); además para el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E en el cual se agrega prodigiosina exógena. El principal hallazgo encontrado es que el cultivo pigmentado de *S. marcescens* 11E no lleva a cabo la reducción

de Fe(III) (ver Figura 19) cuando se encuentra en su forma insoluble. La principal razón de esto se debe a la acción de la prodigiosina que se encuentra en la superficie bacteriana y que actúa como una barrera para que el microorganismo lleve a cabo un contacto directo con la superficie del óxido de Fe(III) insoluble. Por el contrario, en el caso del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E (ver Figura 20), este microorganismo si lleva a cabo una reducción de Fe(III) cuando la forma insoluble se encuentra en el medio como aceptor de electrones. Por tanto, de entre los cultivos de *Serratia*, es posible que el fenotipo no pigmentado de este microorganismo si lleve a cabo la reducción de un ánodo de grafito en una CCM (transferencia de electrones al ánodo).

De nueva cuenta en estos ensayos, el cultivo de referencia *S. oneidensis* llevó a cabo la mayor reducción de Fe(III), lo cual coincide con estudios realizados previamente en este microorganismo por diversos investigadores (Bücking *et al.*, 2010; Coursolle *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2016).

En el caso del desarrollo activo de bioánodos, la metodología y el diseño de Plackett-Bruman seguido propiciaron una correcta generación de una biopelícula de cada uno de los cultivos sobre el ánodo de grafito. Esto fue evidente al momento de revelar el ensayo de UFC ml⁻¹ generadas a partir de cada bioánodo realizado (ver Tablas X y XI). Diversos estudios han usado esta técnica de generación de la biopelícula por medio de cultivos en matraz Erlen Meyer, variando diversas condiciones de incubación (Guzun *et al.*, 2014; Ouis *et al.*, 2017; Thakkar y Saraf, 2014). La adherencia de bacterias a superficies sólidas ha sido vinculada a diversos factores físicos-mecánicos como lo son el número de células en el inóculo y presencia de superficies sólidas (Herten *et al.*, 2017).

Por otra parte, los factores normales de incubación como lo son la concentración de sustrato, temperatura y pH han sido identificados como factores claves que promueven la formación de la biopelícula (Doll *et al.*, 2016). En el presente estudio se encontró que una concentración alta de inóculo, pH menor a 7 y agitación alta promueve la formación de la biopelícula, lo cual concuerda con estudios previos que utilizan bacterias miembros de la familia de las Gammaproteobacterias (Veerachamy *et al.*, 2014). Visualmente, las imágenes de MEB muestran la presencia de células que corresponden con la morfología descrita en la literatura para *Serratia marcescens* (Behkam y Sitti, 2006) y *Shewanella oneidensis* (Durán y Seabra, 2012). Es importante el destacar que el número de células observadas en cada imagen está en concordancia con el número de UFC determinadas para cada uno de los cultivos (mayor para *S. oneidensis* y menor para cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E). La producción de la biopelícula abundante por parte de bacterias pertenecientes al género *Shewanella* está ampliamente reportado en diversas investigaciones (Cooper y DiChristina, 2019; Pinto *et al.*, 2018), lo cual es apoyado de igual manera por el presente trabajo ya que el cultivo de *S. oneidensis* en comparación con *S. marcescens* produjo una biopelícula mucho más abundante. Esto es reflejado en el número de UFC contabilizadas después de la desorción generado por el proceso de sonicación a la cual se sometió.

La actividad electrogénica mostrada por el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E se observa estable y en su punto máximo desde las primeras 25 h de estudio. Esta rápida respuesta en la generación de mV y mA coincide con lo mostrado en la literatura, en donde la

generación estable de voltaje y corriente ocurre hasta que la biopelícula se ha desarrollado abundantemente sobre el ánodo (Kalathil *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2017). Con respecto al desempeño evaluado en función de la densidad de potencia, esta no fue muy alta en comparación con lo presentado en estudios anteriores (Li *et al.*, 2018; Santoro *et al.*, 2018). Sin embargo, es importante el recalcar que las condiciones de estudio en ellas no son las mismas que las llevadas a cabo en el presente estudio. Las diferencias radican en la composición del líquido anódico, el material del cual están hechos los electrodos, el tamaño de ellos, la distancia entre ánodo y cátodo, entre otras (Gajda *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2018). Lo anteriormente mencionado hace que sea difícil el hacer una comparación de la evaluación del desempeño de esta CCM con otras experimentadas en la literatura. Esto es algo que diversos investigadores han plasmado en estudios anteriores (Heidrich *et al.*, 2018; Hsieh *et al.*, 2015).

En el presente estudio la CCM con el bioánodo pre-acondicionado de *S. oneidensis* fue utilizado como celda de referencia para comparar su desempeño con el de la CCM con el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. Esta comparación se hizo debido a que *S. oneidensis* es un cultivo que ha sido ampliamente comprobado como organismo exoelectrogénico en CCM (Wu *et al.*, 2018). En comparación directa entre ambas CCM, estas presentaron el mismo comportamiento en cuanto a generar una respuesta máxima estable en el primer ciclo de alimentación de líquido anódico. De nueva cuenta, este es un comportamiento mostrado por biopelícula maduras y con alto número de células en el ánodo (Pasternak *et al.*, 2018). En cuanto al desempeño presentado por estas CCM, la que contenía el bioánodo

acondicionado de *S. oneidensis*, mostró un mejor desempeño en cuanto a la densidad de potencia generada. Esto tiene concordancia con lo mostrado en otros estudios, lo cuales indican que el potencial exoelectrogénico de este microorganismo es alto (Logan, 2009). Esta capacidad exoelectrogénica, es relacionada en la literatura con los pilis que posee esta bacteria, los cuales se ha mostrado intervienen directamente en la generación de una biopelícula y en la transferencia de electrones (Xiao *et al.*, 2018). Para la CCM con el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E no se ha reportado posea pilis, sin embargo, este estudio es el primero que muestra su capacidad exoelectrogénica a las condiciones estudiadas.

Las CCMs con los cultivos planktónicos de *S. oneidensis* y de *S. marcescens* 11E no pigmentada mostraron en las primeras horas de estudio una generación inestable de voltaje y corriente. Esto se relaciona a lo reportado en la literatura, en donde en las primeras horas hay fluctuaciones muy grandes de mV y mA debido a que no ha ocurrido el establecimiento de una biopelícula sobre el ánodo. Una vez que se ha desarrollado una biopelícula madura sobre el ánodo, ocurre la estabilización del voltaje y corriente detectados (Kadivarian *et al.*, 2019).

En comparación directa del desempeño obtenido de la CCM con cultivo planktónico de *S. oneidensis* y de la CCM con cultivo planktónico de *S. marcescens* 11E no pigmentada, se observó que *S. oneidensis* lleva a cabo un establecimiento de una biopelícula sobre el ánodo mucho más rápido que el cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. Esto es evidente al observar que la estabilización de voltaje y corriente se lleva a cabo en el ciclo 3 (90 h) en el caso de *S. oneidensis* mientras que para *S. marcescens* 11E no pigmentada, la

estabilización de voltaje y corriente ocurrió en el ciclo 4 (175 h). Como anteriormente se mencionó, esto está relacionado directamente con la fisiología de *S. oneidensis* (Subramanian *et al.*, 2018).

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se llevó a cabo la identificación del aislado bacteriano por medio de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Los resultados mostraron que se trata de la bacteria *Serratia marcescens*. La secuencia de esta bacteria fue registrada en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos Americanos e identificada como *Serratia marcescens* 11E y registrada con el número de acceso MK598756. En el caso de la evaluación de la capacidad de reducción de diferentes especies de Fe(III), los resultados mostraron, que tal como se esperaba de la bacteria reductora de referencia, *Shewanella oneidensis* fue el microorganismo con mayor capacidad reductiva. Seguida de ella, y cuando se utilizó acetato, glicerol o glucosa como donadores de electrones y citrato de Fe(III) como donador de electrones, el cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E generó una mayor producción de Fe(II). De la misma manera, cuando se utilizó óxido de

Fe(III) como aceptor de electrones, el cultivo no pigmentado de *Serratia marcescens* 11E destacó en cuanto a la generación de Fe(II). De la misma manera, también se demostró que la prodigiosina exógena no se desempeña como mediador redox cuando se agregó a un cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E. En estos experimentos se mostró que, de los cultivos en evaluación, *S. marcescens* 11E no pigmentada posee la mayor capacidad exoelectrogénica se posiciono como la mejor opción para utilizar como biocatalizador en una CCM.

En cuanto a la generación de bioánodos del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E y del cultivo de referencia *S. oneidensis*, las condiciones ideales para ambos fueron con un inóculo de 20%, 30 °C, pH 6, concentración de medio de cultivo LB al 1%, 150 rpm por 5 días. Estos bioánodos pre-acondicionados se utilizaron en CCMs de doble cámara en donde mostraron una rápida estabilización en la generación de voltaje y corriente. En el caso de la CCM con el bioánodo pre-acondicionado del cultivo no pigmentado de *S. marcescens*, la máxima densidad de potencia generada fue de 30 mW cm⁻². Esta cantidad fue mucho menor comparada con los 235 mW cm⁻² generados por la CCM con el bioánodo pre-acondicionado de *S. oneidensis*.

Finalmente, la evaluación del desempeño de la CCM con cultivos planktónicos del cultivo no pigmentado de *S. marcescens* 11E y de *S. oneidensis* mostraron que para ambos casos la estabilización en la producción de voltaje y corriente ocurre hasta que se forma una biopelícula madura en el ánodo. Para el caso de *S. marcescens* 11E no pigmentada, la estabilización ocurrió hasta las 175 h, mientras que para *S. oneidensis* la estabilización del voltaje y corriente

ocurrió a las 90 h. Por otro lado, la densidad de potencia que se generó por parte de la CCM con el cultivo planktónico no pigmentado de *S. marcescens* 11E fue de 22.7 mW cm⁻² y para la CCM con el cultivo planktónico de *S. oneidensis* fue de 110 mW cm⁻². Estos resultados indican que *S. marcescens* 11E tiene capacidad para transferir electrones a un material carbonáceo a partir de la oxidación de glucosa en una celda de combustible microbiana.

CAPÍTULO 10

FUTURAS PRESPECTIVAS

El presente trabajo mostró la aplicación del cultivo autóctono de *Serratia marcescens* 11E como bioánodo en una CCM y su desempeño se comparó contra el mostrado por una biopelícula del cultivo exoelectrogénico de referencia *S. oneidensis*. El desempeño obtenido es destacable, pero no superior a lo obtenido en diversos estudios publicados o por el mismo cultivo de referencia utilizado en el presente estudio. Sin embargo, los estudios en CCMs es un área que aun se encuentra en desarrollo. Siendo así, la mejora del desempeño bioelectrogénico es el principal objetivo a ser alcanzado en un futuro. Para lograr esto se propone: (i) cambiar la configuración de la celda, (ii) probar diferentes materiales que sirvan como electrodo, (iii) funcionalización de los electrodos por métodos químicos, (iv) utilizar diversos microorganismos en cámara anódica y (v)

probar la presencia de un microorganismo metabólicamente activo en cámara catódica.

Por último, un tópico interesante y cobrará interés en un futuro cercano es la bio-electrosíntesis. Mediante este tipo de síntesis es posible llevar a cabo la generación de compuestos carbonados, como combustibles, por ejemplo, esto mediante la participación de microorganismos que se desarrollen en el cátodo.

CAPÍTULO 11

REFERENCIAS

- Adams, L.K., Boothman, C., Lloyd, J.R., 2007. Identification and characterization of a novel acidotolerant Fe(III)-reducing bacterium from a 3000-year-old acidic rock drainage site. *FEMS Microbiol. Lett.* 268, 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00635.x>
- Babanova, S., Hubenova, Y., Mitov, M., 2011. Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.06.008>
- Barrozo, A., El-Naggar, M.Y., Krylov, A.I., 2018. Distinct Electron Conductance Regimes in Bacterial Decaheme Cytochromes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57, 6805–6809. <https://doi.org/10.1002/anie.201800294>
- Behkam, B., Sitti, M., 2006. Towards hybrid swimming microrobots: Bacteria

- assisted propulsion of polystyrene beads. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.* 2421–2424. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259841>
- Biresselioglu, M.E., Nilsen, M., Demir, M.H., Røyrvik, J., Koksvik, G., 2018. Examining the barriers and motivators affecting European decision-makers in the development of smart and green energy technologies. *J. Clean. Prod.* 198, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.308>
- Breheny, M., Bowman, K., Farahmand, N., Gomaa, O., Keshavarz, T., Kyazze, G., 2019. Biocatalytic electrode improvement strategies in microbial fuel cell systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/jctb.5916>
- Bücking, C., Popp, F., Kerzenmacher, S., Gescher, J., 2010. Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 144–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01949.x>
- Burke, M.J., Stephens, J.C., 2018. Political power and renewable energy futures: A critical review. *Energy Res. Soc. Sci.* 35, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.erss.2017.10.018>
- Cao, X., Song, H. liang, Yu, C. yan, Li, X. ning, 2015. Simultaneous degradation of toxic refractory organic pesticide and bioelectricity generation using a soil microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.148>
- Carbonell, G. V., Della Colleta, H.H.M., Yano, T., Darini, A.L.C., Levy, C.E., Fonseca, B.A.L., 2000. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28, 143–149.

[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(00\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(00)00146-2)

Chaijak, P., Sukkasem, C., Lertworapreecha, M., Boonsawang, P., Wijasika, S., Sato, C., 2018. Enhancing electricity generation using a laccase-based microbial fuel cell with yeast *Galactomyces reessii* on the cathode s. J. Microbiol. Biotechnol. 28, 1360–1366.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1803.03015>

Chen, J., Hu, Y., Huang, W., Zhang, L., 2017a. Enhanced electricity generation for biocathode microbial fuel cell by in situ microbial-induced reduction of graphene oxide and polarity reversion. Int. J. Hydrogen Energy. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.012>

Chen, J., Hu, Y., Zhang, L., Huang, W., Sun, J., 2017b. Bacterial community shift and improved performance induced by in situ preparing dual graphene modified bioelectrode in microbial fuel cell. Bioresour. Technol. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.044>

Chen, S., Patil, S.A., Schröder, U., 2018. A high-performance rotating graphite fiber brush air-cathode for microbial fuel cells. Appl. Energy 211, 1089–1094. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.12.013>

Cheng, S., Liu, W., Sun, D., Huang, H., 2017. Enhanced power production of microbial fuel cells by reducing the oxygen and nitrogen functional groups of carbon cloth anode. Surf. Interface Anal. 49, 410–418. <https://doi.org/10.1002/sia.6173>

Christwardana, M., Frattini, D., Accardo, G., Yoon, S.P., Kwon, Y., 2018a. Optimization of glucose concentration and glucose/yeast ratio in yeast microbial fuel cell using response surface methodology approach. J. Power

- Sources 402, 402–412. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.09.068>
- Christwardana, M., Frattini, D., Accardo, G., Yoon, S.P., Kwon, Y., 2018b. Effects of methylene blue and methyl red mediators on performance of yeast based microbial fuel cells adopting polyethylenimine coated carbon felt as anode. *J. Power Sources* 396, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.06.005>
- Chun, A.Y., Yunxiao, L., Ashok, S., Seol, E., Park, S., 2014. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 858–865. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0420-y>
- Chung, K., Okabe, S., 2009. Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 965–977. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1990-z>
- Cooper, R.E., DiChristina, T.J., 2019. Fe(III) Oxide Reduction by Anaerobic Biofilm Formation-Deficient *S*-Ribosylhomocysteine Lyase (LuxS) Mutant of *Shewanella oneidensis*. *Geomicrobiol. J.* 36, 639–650. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1605428>
- Corbella, C., Puigagut, J., 2018. Improving domestic wastewater treatment efficiency with constructed wetland microbial fuel cells: Influence of anode material and external resistance. *Sci. Total Environ.* 631–632, 1406–1414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.084>
- Costa, M.C., Mota, S., Nascimento, R.F., Dos Santos, A.B., 2010. Anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) as a catalyst to enhance the reductive decolourisation of the azo dyes Reactive Red 2 and Congo Red under anaerobic conditions. *Bioresour. Technol.*

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.015>

Coursolle, D., Baron, D.B., Bond, D.R., Gralnick, J.A., 2010. The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00925-09>

Crist, E., Mora, C., Engelman, R., 2017. and Biodiversity Protection 264, 260–264. <https://doi.org/10.1126/science.aal2011>

Danevcic, T., Vezjak, M.B., Tabor, M., Zorec, M., Stopar, D., 2016. Prodigiosin induces autolysins in actively grown *Bacillus subtilis* cells. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00027>

Dang, T.C., Yin, Y., Yu, Y., Phan, D.T., Yang, C., Cao, B., Song, H., Kang, Y., 2016a. A membrane-free micro-fluidic microbial fuel cell for rapid characterization of exoelectrogenic bacteria. *Microfluid. Nanofluidics* 20. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1811-5>

Dang, T.C., Yin, Y., Yu, Y., Phan, D.T., Yang, C., Cao, B., Song, H., Kang, Y., 2016b. A membrane-free micro-fluidic microbial fuel cell for rapid characterization of exoelectrogenic bacteria. *Microfluid. Nanofluidics* 20, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1811-5>

Dantas, J.M., Ferreira, M.R., Catarino, T., Kokhan, O., Pokkuluri, P.R., Salgueiro, C.A., 2018. Molecular interactions between *Geobacter sulfurreducens* triheme cytochromes and the redox active analogue for humic substances. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1859, 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.007>

Degelmann, D.M., Kolb, S., Dumont, M., Murrell, J.C., Drake, H.L., 2009. Enterobacteriaceae facilitate the anaerobic degradation of glucose by a

forest soil. FEMS Microbiol. Ecol. 68, 312–319.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00681.x>

Deng, L.F., Li, F.B., Zhou, S.G., Huang, D.Y., Ni, J.R., 2010. A study of electron-shuttle mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells. Chinese Sci. Bull. 55, 99–104. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0563-y>

Doll, K., Jongstaphongpun, K.L., Stumpp, N.S., Winkel, A., Stiesch, M., 2016. Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. J. Microbiol. Methods 130, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.016>

Domagala, A., Jarosz, T., Lapkowski, M., 2015. Living on pyrrolic foundations - Advances in natural and artificial bioactive pyrrole derivatives. Eur. J. Med. Chem. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.009>

Dos Santos, A.B., Bisschops, I.A.E., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2004. Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolourisation of textile wastewaters. Chemosphere. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.031>

Du, H., Guo, J., Xu, Y., Wu, Y., Li, F., Wu, H., 2018. Enhancing microbial fuel cell (MFC) performance in treatment of solid potato waste by mixed feeding of boiled potato and waste activated sludge. Water Sci. Technol. 78, 1054–1063. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.371>

Durán, N., Seabra, A.B., 2012. Metallic oxide nanoparticles: State of the art in biogenic syntheses and their mechanisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95, 275–288. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4118-9>

- El-Chakhtoura, J., El-Fadel, M., Rao, H.A., Li, D., Ghanimeh, S., Saikaly, P.E., 2014. Electricity generation and microbial community structure of air-cathode microbial fuel cells powered with the organic fraction of municipal solid waste and inoculated with different seeds. *Biomass and Bioenergy* 67, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.020>
- El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.M., Nealson, K.H., Gorby, Y.A., 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18127–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004880107>
- Fang, Z., Song, H.L., Cang, N., Li, X.N., 2015. Electricity production from Azo dye wastewater using a microbial fuel cell coupled constructed wetland operating under different operating conditions. *Biosens. Bioelectron.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.047>
- Fraiwani, A., Mukherjee, S., Sundermier, S., Lee, H.S., Choi, S., 2013. A paper-based microbial fuel cell: Instant battery for disposable diagnostic devices. *Biosens. Bioelectron.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.001>
- Fu, L., Li, S.W., Ding, Z.W., Ding, J., Lu, Y.Z., Zeng, R.J., 2016. Iron reduction in the DAMO/*Shewanella oneidensis* MR-1 coculture system and the fate of Fe(II). *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.011>
- Fuller, S.J., McMillan, D.G.G., Renz, M.B., Schmidt, M., Burke, I.T., Stewart, D.I., 2014. Extracellular electron transport-mediated Fe(III) reduction by a community of alkaliphilic bacteria that use flavins as electron shuttles. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02282-13>
- Gajda, I., Greenman, J., Santoro, C., Serov, A., Melhuish, C., Atanassov, P.,

- Ieropoulos, I.A., 2018. Improved power and long term performance of microbial fuel cell with Fe-N-C catalyst in air-breathing cathode. *Energy* 144, 1073–1079. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.11.135>
- Gajda, I., Stinchcombe, A., Greenman, J., Melhuish, C., Ieropoulos, I., 2017. Microbial fuel cell – A novel self-powered wastewater electrolyser for electrocoagulation of heavy metals. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.161>
- Ge, Z., He, Z., 2016. Long-term performance of a 200 liter modularized microbial fuel cell system treating municipal wastewater: treatment, energy, and cost. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* <https://doi.org/10.1039/C6EW00020G>
- Ge, Z., Wu, L., Zhang, F., He, Z., 2015. Energy extraction from a large-scale microbial fuel cell system treating municipal wastewater. *J. Power Sources*. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.07.105>
- Glombitza, C., Jaussi, M., Røy, H., Seidenkrantz, M.S., Lomstein, B.A., Jørgensen, B.B., 2015. Formate, acetate, and propionate as substrates for sulfate reduction in sub-arctic sediments of Southwest Greenland. *Front. Microbiol.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00846>
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11358–11363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604517103>

- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Guzun, A.S., Stroescu, M., Jinga, S.I., Voicu, G., Grumezescu, A.M., Holban, A.M., 2014. Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis. *Mater. Sci. Eng. C* 42, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.031>
- Harnisch, F., Aulenta, F., Schröder, U., 2011. *Microbial Fuel Cells and Bioelectrochemical Systems: Industrial and Environmental Biotechnologies Based on Extracellular Electron Transfer*, Second Edition, ed, Comprehensive Biotechnology, Second Edition. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00462-1>
- Harrison, A., 1984. THE ACIDOPHILIC AND OTHER ACIDOPHILIC BACTERIA THAT SHARE THEIR HABITAT. *Annu. Rev. Microbiol.* 38, 265–292.
- He, W., Goodkind, D., Kowal, P., 2016. An Aging World: 2015 International Population Reports. *Aging (Albany, NY)*. 165. <https://doi.org/P95/09-1>
- Heidrich, E.S., Dolfing, J., Wade, M.J., Sloan, W.T., Quince, C., Curtis, T.P., 2018. Temperature, inocula and substrate: Contrasting electroactive consortia, diversity and performance in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 119, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.006>
- Herten, M., Bisdas, T., Knaack, D., Becker, K., Osada, N., Torsello, G.B., Idevich, E.A., 2017. Rapid in vitro quantification of *S. aureus* biofilms on vascular graft surfaces. *Front. Microbiol.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02333>

- Holmes, D.E., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and Graphite Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1234. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1234>
- Hori, T., Aoyagi, T., Itoh, H., Narihiro, T., Oikawa, A., Suzuki, K., Ogata, A., Friedrich, M.W., Conrad, R., Kamagata, Y., 2015. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00386>
- Hsieh, M.C., Cheng, C.Y., Liu, M.H., Chung, Y.C., 2015. Effects of operating parameters on measurements of biochemical oxygen demand using a mediatorless microbial fuel cell biosensor. *Sensors (Switzerland)* 16, 1–10. <https://doi.org/10.3390/s16010035>
- Huang, L., Feng, C., Jiang, H., Dong, H., Liu, Z., Zeng, Q., Wang, X., Zhang, L., 2018. Reduction of structural Fe(III) in nontronite by thermophilic microbial consortia enriched from hot springs in Tengchong, Yunnan Province, China. *Chem. Geol.* 479, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.12.028>
- Huang, L., Li, X., Ren, Y., Wang, X., 2016. In-situ modified carbon cloth with polyaniline/graphene as anode to enhance performance of microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.048>
- Huang, W., Chen, Junfeng, Hu, Y., Chen, Jie, Sun, J., Zhang, L., 2017. Enhanced simultaneous decolorization of azo dye and electricity generation in microbial fuel cell (MFC) with redox mediator modified anode. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.216>
- Huggins, T., Wang, H., Kearns, J., Jenkins, P., Ren, Z.J., 2014. Biochar as a sustainable electrode material for electricity production in microbial fuel cells.

- Bioresour. Technol. 157, 114–119.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.058>
- Ieropoulos, I.A., Stinchcombe, A., Gajda, I., Forbes, S., Merino-Jimenez, I., Pasternak, G., Sanchez-Herranz, D., Greenman, J., 2016. Pee power urinal – microbial fuel cell technology field trials in the context of sanitation. Environ. Sci. Water Res. Technol. <https://doi.org/10.1039/C5EW00270B>
- In Ho, P., Gnana Kumar, G., Kim, A.R., Kim, P., Suk Nahm, K., 2011. Microbial electricity generation of diversified carbonaceous electrodes under variable mediators. Bioelectrochemistry 80, 99–104.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.06.007>
- Jiang, C., Yang, Q., Wang, D., Zhong, Y., Chen, F., Li, Xin, Zeng, G., Li, Xiaoming, Shang, M., 2017. Simultaneous perchlorate and nitrate removal coupled with electricity generation in autotrophic denitrifying biocathode microbial fuel cell. Chem. Eng. J. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.121>
- Jiang, D., Li, B., 2009. Novel electrode materials to enhance the bacterial adhesion and increase the power generation in microbial fuel cells (MFCs). Water Sci. Technol. 59, 557–563. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.007>
- Jiang, Y., Liang, P., Zhang, C., Bian, Y., Yang, X., Huang, X., Girguis, P.R., 2015. Enhancing the response of microbial fuel cell based toxicity sensors to Cu(II) with the applying of flow-through electrodes and controlled anode potentials. Bioresour. Technol. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.127>
- Jung, S.P., Pandit, S., 2018. Important Factors Influencing Microbial Fuel Cell Performance, Microbial Electrochemical Technology. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00015-7>

- Kadivarian, M., Dadkhah, A.A., Esfahany, M.N., 2019. Effect of cell structure and heat pretreating of the microorganisms on performance of a microbial fuel cell. *Water Sci. Technol.* 1–9. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.174>
- Kalathil, S., Patil, S.A., Pant, D., 2018. *Microbial Fuel Cells: Electrode Materials*, Encyclopedia of Interfacial Chemistry. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.13459-6>
- Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2010. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 371–380. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2757-2>
- Kim, B.H., Park, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Chang, I.S., Lee, J., Phung, N.T., 2004. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 672–681. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1412-6>
- Kodali, M., Gokhale, R., Santoro, C., Serov, A., Artyushkova, K., Atanassov, P., 2017. High Performance Platinum Group Metal-Free Cathode Catalysts for Microbial Fuel Cell (MFC). *J. Electrochem. Soc.* <https://doi.org/10.1149/2.0061703jes>
- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., Hai, F.I., 2018. Microbial fuel cell is emerging as a versatile technology: a review on its possible applications, challenges and strategies to improve the performances. *Int. J. Energy Res.* 42, 369–394. <https://doi.org/10.1002/er.3780>
- Lay, C.H., Kokko, M.E., Puhakka, J.A., 2015. Power generation in fed-batch and continuous up-flow microbial fuel cell from synthetic wastewater. *Energy.*

<https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.08.029>

Li, H., Tian, Y., Qu, Y., Qiu, Y., Liu, J., Feng, Y., 2017. A Pilot-scale Benthic Microbial Electrochemical System (BMES) for Enhanced Organic Removal in Sediment Restoration. *Sci. Rep.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep39802>

Li, M., Zhou, M., Tian, X., Tan, C., McDaniel, C.T., Hassett, D.J., Gu, T., 2018. Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity. *Biotechnol. Adv.* 36, 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.010>

Liang, P., Duan, R., Jiang, Y., Zhang, X., Qiu, Y., Huang, X., 2018. One-year operation of 1000-L modularized microbial fuel cell for municipal wastewater treatment. *Water Res.* 141, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.066>

Liang, Y., Feng, H., Shen, D., Li, N., Guo, K., Zhou, Y., Xu, J., Chen, W., Jia, Y., Huang, B., 2017. Enhancement of anodic biofilm formation and current output in microbial fuel cells by composite modification of stainless steel electrodes. *J. Power Sources* 342, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.12.020>

Lin, S.-Y., Hsu, W.-H., Lin, C.-L., Lin, C.-C., Lin, C.-H., Wang, I.-K., Hsu, C.-Y., Kao, C.-H., 2018. Association of Exposure to Fine-Particulate Air Pollution and Acidic Gases with Incidence of Nephrotic Syndrome. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 2860. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122860>

Liu Hong, L.E.B., 2004. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4040–4046.

<https://doi.org/10.1021/es0499344>

- Liu, L., Lee, D.J., Wang, A., Ren, N., Su, A., Lai, J.Y., 2016. Isolation of Fe(III)-reducing bacterium, *Citrobacter* sp. LAR-1, for startup of microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.072>
- Liu, T., Li, X., Zhang, W., Hu, M., Li, F., 2014. Fe(III) oxides accelerate microbial nitrate reduction and electricity generation by *Klebsiella pneumoniae* L17. *J. Colloid Interface Sci.* 423, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.02.026>
- Liu, W., Liu, L., Liu, C., Hao, Y., Yang, H., Yuan, B., Jiang, J., 2016. Methylene blue enhances the anaerobic decolorization and detoxication of azo dye by *Shewanella onediensis* MR-1. *Biochem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.012>
- Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G., 2007. Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3341–3346. <https://doi.org/10.1021/es062644y>
- Logan, B.E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 375–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E., 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Logan, B.E., Wallack, M.J., Kim, K.Y., He, W., Feng, Y., Saikaly, P.E., 2015.

- Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities. Environ. Sci. Technol. Lett. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00180>
- Logan, B.E., Zikmund, E., Yang, W., Rossi, R., Kim, K.Y., Saikaly, P.E., Zhang, F., 2018. Impact of Ohmic Resistance on Measured Electrode Potentials and Maximum Power Production in Microbial Fuel Cells. Environ. Sci. Technol. 52, 8977–8985. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02055>
- Lovley, D.R., 2012. Electromicrobiology. Annu. Rev. Microbiol. 66, 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. Lett. to Nat. 382, 445–448. <https://doi.org/10.1038/382445a0>
- Lu, H.D., Pearson, E., Ristroph, K.D., Duncan, G.A., Ensign, L.M., Suk, J.S., Hanes, J., Prud'homme, R.K., 2018. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin production reduced by quorum-sensing inhibiting nanocarriers. Int. J. Pharm. 544, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.058>
- Ludin, N.A., Mustafa, N.I., Hanafiah, M.M., Ibrahim, M.A., Asri Mat Teridi, M., Sepeai, S., Zaharim, A., Sopian, K., 2018. Prospects of life cycle assessment of renewable energy from solar photovoltaic technologies: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 96, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.048>
- Lv, Z., Chen, Y., Wei, H., Li, F., Hu, Y., Wei, C., Feng, C., 2013. One-step electrosynthesis of polypyrrole/graphene oxide composites for microbial fuel cell application. Electrochim. Acta. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.022>
- Ma, J., Ni, H., Su, D., Meng, X., 2016. Bioelectricity generation from pig farm

- wastewater in microbial fuel cell using carbon brush as electrode. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.255>
- Makhtar, M.M.Z., Don, M.M., Tajarudin, H.A., 2018. *Microbial Fuel Cell (MFC) Development from Anaerobic Digestion system, Bioremediation and Sustainability: Research and Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1002/9781118371220.ch3>
- Manderville, R.A., 2001. Synthesis , Proton-Affinity and Anti-Cancer Properties of the Prodigiosin- Group Natural Products. *Synthesis (Stuttg)*. 195–218.
- Mardiana, U., Innocent, C., Jarrar, H., Cretin, M., Buchari, Gandasasmita, S., 2015. Electropolymerized neutral red as redox mediator for yeast fuel cell. *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 8886–8898.
- Marone, A., Carmona-Martínez, A.A., Sire, Y., Meudec, E., Steyer, J.P., Bernet, N., Trably, E., 2016. Bioelectrochemical treatment of table olive brine processing wastewater for biogas production and phenolic compounds removal. *Water Res.* 100, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.008>
- Mecheri, B., Iannaci, A., D'Epifanio, A., Mauri, A., Licoccia, S., 2016. Carbon-supported zirconium oxide as a cathode for microbial fuel cell applications. *Chempluschem*. <https://doi.org/10.1002/cplu.201500347>
- Mehta, T., Coppi, M. V, Childers, S.E., Lovley, D.R., 2005. Outer Membrane c - Type Cytochromes Required for Fe (III) and Mn (IV) Oxide Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8634–8641. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8634>
- Melo-Nascimento, A.O. do. S., Treumann, C., Neves, C., Andrade, E., Andrade,

- A.C., Edwards, R., Dinsdale, E., Bruce, T., 2018. Functional characterization of ligninolytic *Klebsiella* spp. strains associated with soil and freshwater. *Arch. Microbiol.* 200, 1267–1278. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1532-0>
- Meng, F., Zhao, Q., Zheng, Z., Wei, L., Wang, K., Jiang, J., Ding, J., Na, X., 2019. Simultaneous sludge degradation, desalination and bioelectricity generation in two-phase microbial desalination cells. *Chem. Eng. J.* 361, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.063>
- Min, B., Logan, B.E., 2004. Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5809–5814. <https://doi.org/10.1021/es0491026>
- Mukherjee, S., Su, S., Panmanee, W., Irvin, R.T., Hassett, D.J., Choi, S., 2013. A microliter-scale microbial fuel cell array for bacterial electrogenic screening. *Sensors Actuators, A Phys.* <https://doi.org/10.1016/j.sna.2012.10.025>
- Nealson, K.H., 2017. Bioelectricity (electromicrobiology) and sustainability. *Microb. Biotechnol.* 10, 1114–1119. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12834>
- Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2000. Lack of Production of Electron-Shuttling Compounds or Solubilization of Fe (III) during Reduction of Insoluble Fe (III) Oxide by *Geobacter metallireducens* Lack of Production of Electron-Shuttling Compounds or Solubilization of Fe (III) during Reduct. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2248–2251. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5>
- Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, A.L., Jia, H., Zhang, M., Lovley, D.R., 2008. Power output and columbic

- efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ. Microbiol.* 10, 2505–2514. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x>
- Nixon, S.L., Telling, J.P., Wadham, J.L., Cockell, C.S., 2017. Viable cold-tolerant iron-reducing microorganisms in geographically diverse subglacial environments. *Biogeosciences*. <https://doi.org/10.5194/bg-14-1445-2017>
- Oliveira, V.B., Simões, M., Melo, L.F., Pinto, A.M.F.R., 2013. Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.012>
- Ortega, P.F.R., de Paula, F.G.F., de Castro, M.C.M., Binatti, I., González, Z., Blanco, C., Santamaría, R., Lavall, R.L., 2018. Mechanism and Stability of a Redox Supercapacitor Based on Methylene Blue: Effects of Degradation of the Redox Shuttle. *ACS Appl. Energy Mater.* 1, 2306–2316. <https://doi.org/10.1021/acsaem.8b00384>
- Ortman, J.M., Guarneri, C.E., 2019. United States population projections: 2000 to 2050. *United States Census Bur.* 1–19.
- Ouis, M., Kameche, M., Innocent, C., Charef, M., Kebaili, H., 2017. Electro-polymerization of pyrrole on graphite electrode: enhancement of electron transfer in bioanode of microbial fuel cell. *Polym. Bull.* 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2048-5>
- Oyiwona, G.E., Ogbonna, J.C., Anyanwu, C.U., Okabe, S., 2018. Electricity generation potential of poultry droppings wastewater in microbial fuel cell using rice husk charcoal electrodes. *Bioresour. Bioprocess.* 5. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0201-0>

- Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Irving Olsen, S., Singh Nigam, P., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2012. Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Adv.* 2, 1248–1263. <https://doi.org/10.1039/C1RA00839K>
- Park, D.H., Zeikus, J.G., 2000. Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore *Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore* 66, 1292–1297. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1292-1297.2000.Updated>
- Passos, V.F., Neto, S.A., Andrade, A.R. de, Reginatto, V., 2016. Energy generation in a Microbial Fuel Cell using anaerobic sludge from a wastewater treatment plant. *Sci. Agric.* 73, 424–428. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0194>
- Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2018. Dynamic evolution of anodic biofilm when maturing under different external resistive loads in microbial fuel cells. *Electrochemical perspective. J. Power Sources* 400, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.08.031>
- Pinto, D., Coradin, T., Laberty-Robert, C., 2018. Effect of anode polarization on biofilm formation and electron transfer in *Shewanella oneidensis*/graphite felt microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 120, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.10.008>
- Population Reference Bureau, 2016. 2016 World Population Data Sheet. 2015 World Popul. Data Sheet 23. <https://doi.org/10.2307/1972177>
- Prakasham, R.S., Kumar, B.S., 2018. *Bacterial Metabolism–Coupled Energetics, Microbial Electrochemical Technology.* Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00009-1>

Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W., 2003. A microbial fuel cell capable of converting. *Biotechnol. Lett.* 25, 1531.

Ringeisen, B.R., Ray, R., Little, B., 2007. A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber. *J. Power Sources* 165, 591–597.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2006.10.026>

Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V.H., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., 2016. Carbon Catabolite Regulation of Secondary Metabolite Formation and Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2158-9>

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Snchez, M., Rocha, D., Snchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Langley, E., 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 146–167.
<https://doi.org/10.3109/10408410903489576>

Santoro, C., Kodali, M., Herrera, S., Serov, A., Ieropoulos, I., Atanassov, P., 2018. Power generation in microbial fuel cells using platinum group metal-free cathode catalyst: Effect of the catalyst loading on performance and costs. *J. Power Sources* 378, 169–175.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.12.017>

Schiermeier, Q., Tollefson, J., Scully, T., Witze, A., Morton, O., 2008. Energy alternatives: Electricity without carbon. *Nature* 454, 816–823.
<https://doi.org/10.1038/454816a>

Shafiee, S., Topal, E., 2009. When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy*

- Policy 37, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2008.08.016>
- Shang, W., Liu, Y., Kim, E., Tsao, C.Y., Payne, G.F., Bentley, W.E., 2018. Selective assembly and functionalization of miniaturized redox capacitor inside microdevices for microbial toxin and mammalian cell cytotoxicity analyses. *Lab Chip* 18, 3578–3587. <https://doi.org/10.1039/c8lc00583d>
- Speers, A.M., Reguera, G., 2012. Electron donors supporting growth and electroactivity of *Geobacter sulfurreducens* anode biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 437–444. <https://doi.org/10.1128/AEM.06782-11>
- Stöckl, M., Teubner, N.C., Holtmann, D., Mangold, K.M., Sand, W., 2019. Extracellular Polymeric Substances from *Geobacter sulfurreducens* Biofilms in Microbial Fuel Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 8961–8968. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14340>
- Stubbendieck, R.M., Straight, P.D., 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *J. Bacteriol.* 198, 2145–2155. <https://doi.org/10.1128/jb.00275-16>
- Subramanian, P., Pirbadian, S., El-Naggar, M.Y., Jensen, G.J., 2018. Ultrastructure of *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E3246–E3255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718810115>
- Tan, Y.C., Kharkwal, S., Chew, K.K.W., Alwi, R., Mak, S.F.W., Ng, H.Y., 2018. Enhancing the robustness of microbial fuel cell sensor for continuous copper(II) detection against organic strength fluctuations by acetate and glucose addition. *Bioresour. Technol.* 259, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.068>

- ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., Saakes, M., Buisman, C.J.N., 2008. Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells. *Electrochim. Acta* 53, 5697–5703. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.032>
- Thakkar, A., Saraf, M., 2014. Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. *Nat. Products Bioprospect.* 4, 341–351. <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0046-y>
- Tomat, E., 2016. Coordination Chemistry of Linear Tripyrroles: Promises and Perils. *Comments Inorg. Chem.* <https://doi.org/10.1080/02603594.2016.1180291>
- Tommasi, T., Lombardelli, G., 2017. Energy sustainability of Microbial Fuel Cell (MFC): A case study. *J. Power Sources.* <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.122>
- Tran, P., Nguyen, L., Nguyen, H., Nguyen, B., Nong, L., Mai, L., Tran, H., Nguyen, T., Pham, H., 2016. Effects of inoculation sources on the enrichment and performance of anode bacterial consortia in sensor typed microbial fuel cells. *AIMS Bioeng.* 3, 60–74. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.1.60>
- Trapero, J.R., Horcajada, L., Linares, J.J., Lobato, J., 2017. Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization. *Appl. Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.109>
- Tsao, Y., Lee, M., Miller, E.C., Gao, G., Park, J., Chen, S., Katsumata, T., Tran, H., Wang, L.W., Toney, M.F., Cui, Y., Bao, Z., 2019. Designing a Quinone-

- Based Redox Mediator to Facilitate Li₂S Oxidation in Li-S Batteries. *Joule* 3, 872–884. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2018.12.018>
- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., Yarlagadda, P.K., 2014. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 228, 1083–1099. <https://doi.org/10.1177/0954411914556137>
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Vamshi Krishna, K., Lenin Babu, M., 2014. Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications. *Bioresour. Technol.* 165, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.048>
- Venkata Mohan, S., Vijaya Bhaskar, Y., Murali Krishna, P., Chandrasekhara Rao, N., Lalit Babu, V., Sarma, P.N., 2007. Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 2286–2295. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.03.015>
- Wahab, K.A.A., Nazri, A.A.A., Azam, A.A.M., Ghazali, N.F., Md Salleh, E., Mahmood, N.A.N., 2018. Development of immobilised bioanode for microbial fuel cell. *Chem. Eng. Trans.* 63, 607–612. <https://doi.org/10.3303/CET1863102>
- Wang, C.-T., Chen, W.-J., Huang, R.-Y., 2010. Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 7217–7223. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.038>
- Wang, X.N., Sun, G.X., Li, X.M., Clarke, T.A., Zhu, Y.G., 2018. Electron shuttle-

- mediated microbial Fe(III) reduction under alkaline conditions. *J. Soils Sediments* 18, 159–168. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1736-y>
- Wang, Y.P., Liu, X.W., Li, W.W., Li, F., Wang, Y.K., Sheng, G.P., Zeng, R.J., Yu, H.Q., 2012. A microbial fuel cell-membrane bioreactor integrated system for cost-effective wastewater treatment. *Appl. Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.029>
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 9335–9344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>
- Wu, D., Sun, F., Chua, F.J.D., Lu, D., Stuckey, D.C., Zhou, Y., 2019. In-situ power generation and nutrients recovery from waste activated sludge – Long-term performance and system optimization. *Chem. Eng. J.* 361, 1207–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.001>
- Wu, S., He, W., Yang, W., Ye, Y., Huang, X., Logan, B.E., 2017. Combined carbon mesh and small graphite fiber brush anodes to enhance and stabilize power generation in microbial fuel cells treating domestic wastewater. *J. Power Sources* 356, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.01.041>
- Wu, T., Griffin, A.M., Gorski, C.A., Shelobolina, E.S., Xu, H., Kukkadapu, R.K., Roden, E.E., 2017. Interactions Between Fe(III)-oxides and Fe(III)-phyllosilicates During Microbial Reduction 2: Natural Subsurface Sediments. *Geomicrobiol. J.* <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1174758>
- Wu, X., Zou, L., Huang, Y., Qiao, Y., Long, Z., Liu, H., Li, C.M., 2018. *Shewanella putrefaciens* CN32 outer membrane cytochromes MtrC and UndA reduce electron shuttles to produce electricity in microbial fuel cells.

Enzyme Microb. Technol. 115, 23–28.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.04.005>

Xiao, K., Shu, C., Sun, X., 2018. Modeling the Structure of Type IV Pili from *Shewanella Oneidensis*. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 170.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/170/3/032145>

Yakar, A., Türe, C., Türker, O.C., Vymazal, J., Saz, Ç., 2018. Impacts of various filtration media on wastewater treatment and bioelectric production in up-flow constructed wetland combined with microbial fuel cell (UCW-MFC). Ecol. Eng. 117, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.03.016>

Yan, Z., Song, N., Cai, H., Tay, J.H., Jiang, H., 2012. Enhanced degradation of phenanthrene and pyrene in freshwater sediments by combined employment of sediment microbial fuel cell and amorphous ferric hydroxide. J. Hazard. Mater. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.087>

Yang, D., Guo, J., Lu, C., Song, Y., Li, H., Chen, Z., Xie, Z., 2018. A quasi-homogeneous catalysis and electron transfer chain for biodecolorization of azo dye by immobilized phenazine redox mediator. Int. Biodeterior. Biodegrad. 126, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.018>

Yano, J., Suzuki, K., Tsutsumi, C., Mabuchi, M., Hayase, N., Kitani, A., 2018. Anodic reactions of NADH model compound by utilizing both light irradiation and riboflavin as a redox mediator. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82, 1849–1854. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1505483>

Yellappa, M., Sravan, J.S., Sarkar, O., Reddy, Y.V.R., Mohan, S.V., 2019. Modified conductive polyaniline-carbon nanotube composite electrodes for bioelectricity generation and waste remediation. Bioresour. Technol. 284,

148–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.085>

Yong, Y.C., Cai, Z., Yu, Y.Y., Chen, P., Jiang, R., Cao, B., Sun, J.Z., Wang, J.Y., Song, H., 2013. Increase of riboflavin biosynthesis underlies enhancement of extracellular electron transfer of *Shewanella* in alkaline microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 130, 763–768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.145>

Yuan, M., Minter, S.D., 2019. Redox Polymers in Electrochemical Systems: From Methods of Mediation to Energy Storage. *Curr. Opin. Electrochem.* <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.03.003>

Zang, G.-L., Sheng, G.-P., Li, W.-W., Tong, Z.-H., Zeng, R.J., Shi, C., Yu, H.-Q., 2012. Nutrient removal and energy production in a urine treatment process using magnesium ammonium phosphate precipitation and a microbial fuel cell technique. *Phys. Chem. Chem. Phys.* <https://doi.org/10.1039/c2cp23402e>

Zhang, C., Liang, P., Jiang, Y., Huang, X., 2015. Enhanced power generation of microbial fuel cell using manganese dioxide-coated anode in flow-through mode. *J. Power Sources*. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.09.129>

Zhang, C., Zhang, D., Xiao, Z., 2018. Application of redox mediators in bioelectrochemical systems, in: *Bioelectrochemistry Stimulated Environmental Remediation*. pp. 1412–1423. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.005>

Zhang, F., Cheng, S., Pant, D., Bogaert, G. Van, Logan, B.E., 2009. Power

- generation using an activated carbon and metal mesh cathode in a microbial fuel cell. *Electrochem. commun.* 11, 2177–2179. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.09.024>
- Zhang, F., He, Z., 2012. Integrated organic and nitrogen removal with electricity generation in a tubular dual-cathode microbial fuel cell. *Process Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.002>
- Zhang, L., Fu, G., Zhang, Z., 2019. Simultaneous nutrient and carbon removal and electricity generation in self-buffered biocathode microbial fuel cell for high-salinity mustard tuber wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 272, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.012>
- Zhang, Y., Min, B., Huang, L., Angelidaki, I., 2011. Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 102, 1166–1173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.044>
- Zhao, F., Rahunen, N., Varcoe, J.R., Chandra, A., Avignone-Rossa, C., Thumser, A.E., Slade, R.C.T., 2008. Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4971–4976. <https://doi.org/10.1021/es8003766>
- Zhu, X., Tokash, J.C., Hong, Y., Logan, B.E., 2013. Controlling the occurrence of power overshoot by adapting microbial fuel cells to high anode potentials. *Bioelectrochemistry* 90, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.10.004>
- Ziegler, S., Waidner, B., Itoh, T., Schumann, P., Spring, S., Gescher, J., 2013. *Metallibacterium scheffleri* gen. nov., sp. nov., an alkalinizing

gammaproteobacterium isolated from an acidic biofilm 1499–1504.

<https://doi.org/10.1099/ijms.0.042986-0>

Zikmund, E., Kim, K.Y., Logan, B.E., 2018. Hydrogen production rates with closely-spaced felt anodes and cathodes compared to brush anodes in two-chamber microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 9599–9606.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.059>

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Carlos Jesús Castillo Zacarías

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología
Aplicada**

Título de Tesis:

**EMPLEO DE UNA BIOPELÍCULA DE *Serratia* EN LA CONSTRUCCIÓN DE UN
BIOÁNODO CON POSIBLE APLICACIÓN EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE
MICROBIANA**

Carlos Jesús Castillo Zacarías nació en Monterrey, Nuevo León, México el 30 de noviembre de 1983. En el año 2000 inició sus estudios de educación superior y en el año 2005 recibió el título de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Posteriormente estudió la maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial. Es co-autor de 3 capítulos de libro referentes al producción de bioenergía y de 5 artículos en revistas de alto impacto; 1 de ellas deriva del trabajo realizado durante el doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

EMPLEO DE UNA BIOPELÍCULA DE *Serratia* EN LA CONSTRUCCIÓN DE UN BIOÁNODO CON POSIBLE APLICACIÓN EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

Publicaciones Científicas

Castillo-Zacarías, C., Cantú-Cárdenas, M.E., López-Chuken, U.J. et al. Int Microbiol (2019). <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00088-y>

Participaciones en Congresos

Presentación del trabajo “An integrated approach towards the synthesis of drug molecule Prodigiosin and bioelectricity production by *Serratia marcescens* in microbial fuel cell”. 1st International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability, 23 al 26 de octubre de 2016. Sitges, España.

Distinciones

Best Poster Award 1st International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability