



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**GENERACIÓN DE ELECTRICIDAD EN UNA CELDA
DE COMBUSTIBLE MICROBIANA DE TIPO PEM**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

HÉCTOR ENRIQUE RAMÍREZ LANDEROS

ASESOR: M. EN I. JULIO CESAR MORALES MEJÍA

Este trabajo está dedicado a mis padres por su incondicional apoyo su comprensión y gran fortaleza, a quienes admiro y respeto mucho, a mis hermanas.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su incondicional apoyo y gran fortaleza, siempre han sido una inspiración para mí por seguir adelante realmente los admiro mucho, ya que sin su ayuda este trabajo y mi formación profesional no habría sido posible muchas gracias, los amo. A mis hermanas que siempre me ha apoyado y siempre han estado para mí, muchas gracias.

A mi padrino Nemesio Landeros Torres, por siempre estar apoyándome en los proyectos de mi vida, por sus consejos y compañía, muchas gracias!

A la Universidad Autónoma de México, por darme la oportunidad de ser parte de esta gran Institución y de sus estudiantes. Orgullosamente UNAM!

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por hacer posible mi formación profesional y brindarme todo el apoyo posible dentro de sus instituciones, estaré siempre agradecido.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por el privilegio de poder realizar este proyecto dentro de sus grandes instituciones, y por todo el apoyo brindado para poder realizar este trabajo.

A los grandes académicos de la FESC, los recordaré por siempre y les estaré eternamente agradecido por brindarme sus conocimientos y experiencia, y de quienes aprendí lecciones muy importantes, son los responsables de mi formación como Ingeniero Químico.

Especial agradecimiento a mis asesores:

Al M. en C. Juan Cayetano Cid Núñez, a quien le agradezco por permitirme ser parte de este proyecto de investigación, le estaré en deuda por siempre, muchas gracias por todo su apoyo.

Al M. en I. Julio César Morales Mejía, a quien admiro y respeto mucho. Muchas gracias por su asesoría en la dirección de esta tesis.

A la Q.B.P. Graciela García Caloca, Muchísimas gracias por todo su apoyo y asesoría sobre realización experimental de este trabajo.

A mis amigos: I.Q. Juan José Carmona Rico, I.Q. Alberto Lezama Cortés, I.Q. José Luis Montiel Rivas, I.Q. Denisse Viridiana Vázquez Molina, I.Q. Norma Ramírez Gutiérrez, I.Q. Andrea Ocampo Hernández, I.Q. Rafael Pérez Castro I.Q. Gabriel García Sánchez.

Con los que compartí muchos de los mejores momentos de mi vida y a quienes debo el profesionista y persona que hoy soy.

Y por ultimo a la Bióloga Erika Adriana Aguilar Lázaro, por su apoyo, comprensión y compañía incondicional en la realización de este trabajo, sabes que siempre te estaré muy agradecido por toda tu ayuda. Te amo mi osis!

Al jurado.

ÍNDICE	Pág.
RESUMEN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
HIPÓTESIS.....	2
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. DEFINICIÓN DE CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA.....	5
1.2. HISTORIA DE LAS MFC.....	5
1.3. CLASIFICACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE.....	5
1.4. CRECIMIENTO BACTERIANO, CONCEPTO, EXPRESIÓN MATEMÁTICA Y FACTORES.....	7
1.4.1. CONCEPTO DE MUERTE DE UN MICROORGANISMO.....	8
1.4.2. LO QUE NECESITA UN MICROORGANISMO PARA CRECER.....	9
1.4.3. DETECCIÓN Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO.....	10
1.4.4. CICLO DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES.....	10
1.4.5. FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO.....	11
1.5. FUNCIONAMIENTO DE LA MFC.....	12
1.5.1. ELECTROLITO.....	13
1.5.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES.....	14
1.6. FUNDAMENTOS TERMODINÁMICOS Y ELECTROQUÍMICOS.....	17
1.7. VARIABLES DE CONTROL Y RESPUESTA.....	18
1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21
2.1. MATERIALES Y CONSTRUCCION DE LA MFC.....	22
2.2. ARRANQUE Y FUNCIONAMIENTO DE LA MFC.....	24
2.3. CRECIMIENTO BACTERIANO POR MEDIO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.....	26
2.4. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.....	26

2.4.1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DQO.....	27
2.5. CONSUMO DE SUSTRATO.....	27
2.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSA.....	28
CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
3.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE DQO	30
3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA	31
3.3. PRIMER INÓCULO LIOFILIZADO	32
3.4. SEGUNDO INOCULO LIOFILIZADO	40
3.5. PRIMER INOCULO DE LODOS ACTIVADOS.....	47
3.6. SEGUNDO INOCULO DE LODOS ACTIVADOS.....	54
3.7. CEPA ESCHERICHIA COLI ATCC 25922.....	61
3.8. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	67
CONCLUSIONES	734
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	78
APENDICE A. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO ANAEROBIO POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN POR EXTINCIÓN EN VIALES BREWER.....	79
APENDICE B. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR MEDIO DE UFC DEACUERDO A LA NORMA NOM-092-SSA1-1994.....	811
APENDICE C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	85
APENDICE D. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO CONSUMIDO POR EL SISTEMA	87

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	pag.
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.	
Figura1.1. Esquema básico de una MFC	12
Figura 1.2. Estructura química de la membrana Nafión	13
Figura1.3. Circulación de protones a través de la membrana Nafión.....	14
Figura1.4. Esquema general de transporte de electrones en una MFC.....	15
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.	
Figura2.1. Vista frontal de la celda de combustible.....	22
Figura2.2. Sistema de difusores para el burbujeo de aire.....	23
Figura2.3. Sistema de agitación en la cámara anódica.....	23
Figura2.4. Sistema general de la MFC utilizada.....	24
CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	
Gráfica 3.1. Curva de calibración de DQO.....	30
Gráfica 3.2. Curva de calibración de glucosa.....	31
Primer inóculo liofilizado	
Gráfica 3.3. Cinética de crecimiento para el primer inóculo liofilizado.....	32
Gráfica 3.4. Gráfico semilogarítmico para el primer inóculo liofilizado.....	33
Gráfica 3.5 .Crecimiento con las condiciones de operación para el primer inóculo liofilizado.....	34
Gráfica 3.6. Consumo de sustrato utilizado en el primer inóculo liofilizado.....	35
Gráfica 3.7. Remoción de sustrato para el caso del primer inóculo liofilizado.....	36
Gráfica 3.8. Generación de voltaje y corriente para el caso del primer inóculo liofilizado.....	37
Gráfica 3.9. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del primer inóculo liofilizado.....	38
Gráfica 3.10. Total de coulombs producidos del primer inóculo liofilizado.....	39

Segundo inóculo liofilizado

Gráfica 3.11. Cinética de crecimiento para el segundo inóculo liofilizado.....	40
Gráfica 3.12. Gráfico semilogarítmico para el segundo inóculo liofilizado.....	41
Gráfica 3.13. Crecimiento con las condiciones de operación para el segundo inóculo liofilizado.....	42
Gráfica 3.14. Consumo de sustrato utilizado en el segundo inóculo liofilizado.....	43
Gráfica 3.15. Remoción de sustrato para el caso del segundo inóculo liofilizado.....	43
Gráfica 3.16. Generación de voltaje y corriente para el caso del segundo inóculo liofilizado.....	44
Gráfica 3.17. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del segundo inóculo liofilizado.....	45
Gráfica 3.18. Total de coulombs producidos del segundo inóculo liofilizado.....	46

Primer inóculo de lodos activados

Gráfica 3.19. Cinética de crecimiento para el primer inóculo de lodos activados.....	47
Gráfica 3.20. Gráfico semilogarítmico para el primer inóculo de lodos activados.....	48
Gráfica 3.21. Crecimiento con las condiciones de operación para el primer inóculo de lodos activados.....	49
Gráfica 3.22. Consumo de sustrato utilizado en el primer inóculo de lodos activados.....	50
Gráfica 3.23. Remoción de sustrato para el caso del primer inóculo de lodos activados.....	51
Gráfica 3.24. Generación de voltaje y corriente para el caso del primer inóculo de lodos activados.....	51
Gráfica 3.25. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del primer inóculo de lodos activados.....	52
Gráfica 3.26. Total de coulombs producidos del primer inóculo de lodos activados.....	53

Segundo inóculo de lodos activados

Gráfica 3.27. Cinética de crecimiento para el segundo inóculo de lodos activados.....	54
Gráfica 3.28. Gráfico semilogarítmico para el segundo inóculo de lodos activados.....	55
Gráfica 3.29. Crecimiento con las condiciones de operación para el segundo inóculo de lodos activados.....	55
Gráfica 3.30. Consumo de sustrato utilizado en el segundo inóculo de lodos activados.....	56
Gráfica 3.31. Remoción de sustrato para el caso del segundo inóculo de lodos activados.....	57
Gráfica 3.32. Generación de voltaje y corriente para el caso del segundo inóculo de lodos activados.....	58
Gráfica 3.33. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del segundo inóculo de lodos activados.....	59
Gráfica 3.34. Total de coulombs producidos del primer inóculo segundo inóculo de lodos activados.....	60

Escherichia coli

Gráfica 3.35. Cinética de crecimiento para la cepa de <i>Escherichia coli</i>	61
Gráfica 3.36. Gráfico semilogarítmico para la cepa de <i>Escherichia coli</i>	62
Gráfica 3.37. Crecimiento con las condiciones de operación para la cepa de <i>Escherichia coli</i>	62
Gráfica 3.38. Consumo de sustrato utilizado en la cepa de <i>Escherichiali</i>	63
Gráfica 3.39. Remoción de sustrato para el caso de la cepa de <i>Escherichia coli</i>	64
Gráfica 3.40. Generación de voltaje y corriente para el caso de la cepa de <i>Escherichia coli</i>	64
Gráfica 3.41. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Escherichia coli</i>	65
Gráfica 3.42. Total de coulombs producidos de la cepa de <i>Escherichia col i</i>	66
Gráfica 3.43. Comparación de la generación de voltaje de los inóculos utilizados.....	67

Gráfica 3.44. Comparación de la generación de corriente de los inóculos utilizados.....	68
Gráfica 3.45. Comparación de la generación de potencia de los inóculos utilizados.....	69
Gráfica 3.43. Comparación de la diferencia entre las medias de los inóculos utilizados.....	72
Gráfica 3.43. Relación entre el número de electrodos usados y el voltaje generado.....	72

RESUMEN

El presente trabajo es resultado de un proyecto de investigación enfocado a la generación de energía eléctrica, y a la investigación del comportamiento de las celdas de combustible microbianas intercambiadoras de protones. El proyecto antes mencionado, se llevó a cabo en el Instituto Mexicano del Petróleo. Los resultados presentados en este trabajo se obtuvieron de la experimentación realizada en los laboratorios de la sección de análisis fisicoquímicos y tratamiento de aguas, y sección de análisis microbiológicos del laboratorio de análisis y tratamiento de agua, en el periodo comprendido entre agosto de 2011 y mayo de 2012.

Es importante mencionar que este trabajo solo abarca una pequeña parte del total de todos los aspectos que se deben de estudiar para poder comprender mejor el funcionamiento de una celda de combustible microbiana. La primera etapa de la investigación consistió en diseñar la celda donde se llevarían a cabo los experimentos, en esta etapa se determinaron y buscaron los materiales con los cuales se construiría la celda de combustible, el diseño y tamaño se determino de acuerdo al volumen de líquido que se usaría como celda piloto, y se utilizo un área de contacto de 30cm² entre ambas cámaras debido a que se creyó conveniente aprovechar el total del área de la membrana comercial, en el capítulo número 2 se explica a detalle su construcción. La segunda etapa consistió en probar tres tipos de inóculos: liofilizado, lodos activados y una cepa pura (*E. coli*), más adelante se explica a detalle la metodología usada y los resultados obtenidos en esta etapa. Por último, se calcularon y compararon los resultados obtenidos en cada sistema.

En el capítulo1 se presentan los fundamentos teóricos en los que se basa este trabajo, las referencias correspondientes se encuentran en la sección de referencias bibliográficas. En el capítulo 2 se describen las metodologías utilizadas en la fase de experimentación, en el capítulo 3 se presentan los resultados experimentales obtenidos y en el capítulo 4 las conclusiones a las que se llegó luego de esta investigación. En la sección de anexos se describen a detalle las metodologías de las técnicas analíticas utilizadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar experimentalmente el efecto de algunos tipos de inóculos sobre la generación de electricidad en una celda microbiana intercambiadora de protones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar experimentalmente la generación de energía eléctrica de acuerdo con el tipo de inóculo establecido en la celda.
- Determinar experimentalmente la cinética de crecimiento para cada consorcio microbiano o cepa pura utilizada.
- Comparar la eficiencia de generación eléctrica de cada inóculo o cepa utilizada en el sistema.
- Determinar experimentalmente el consumo de sustrato y la eficiencia de remoción de carga de demanda química de oxígeno en cada sistema.

HIPÓTESIS

- Si se usa un inóculo mixto en el tratamiento de un agua residual sintética, entonces se podrá producir una mayor cantidad de **energía eléctrica**, en comparación con una cepa pura.
- Si el voltaje generado es proporcional al área de contacto de los electrodos usados, al incrementar el número de electrodos, se tendrá un aumento en el voltaje total obtenido, usando inóculo mixto.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Existe un gran interés en la producción de energía eléctrica a partir de una fuente biológica, que se puede aprovechar a partir de un proceso fundamental para el tratamiento de agua. Este interés se debe al problema de la contaminación ambiental y a las especificaciones que regulan las emisiones de aguas tóxicas, ya que al tratar agua residual podría aprovecharse la materia orgánica contenida para producir energía eléctrica.

El interés o idea de generar electricidad por medio del tratamiento de agua residual o de una fuente biológica también se debe a la necesidad buscar nuevas fuentes de energía que puedan ser sustentables y viables, para de esa manera no depender de los combustibles fósiles, fuentes de energía que no pueden renovarse.

Las celdas de combustibles microbianas tienen ventajas sobre otras tecnologías usadas para la generación de energía a partir de materia orgánica. Como la conversión directa de sustrato a electricidad, ya que esto permite altas eficiencias de conversión. También estas celdas operan eficientemente a temperatura ambiente, incluidas bajas temperaturas. No requieren del tratamiento del biogás generado en la celda y no requieren de energía extra para funcionar, ya que para airear el cátodo, se puede usar un sistema de aireado pasivamente. Por último tienen aplicación potencial en lugares alejados con ausencia de infraestructura eléctrica, convirtiéndose en una opción más de energía renovable.

CAPÍTULO 1.

ANTECEDENTES

1.1. DEFINICIÓN DE CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

Una celda de combustible microbiana o MFC por sus siglas en inglés (Microbian Fuel Cell), es un dispositivo en el que las bacterias generalmente anaerobias y facultativas se utilizan para catalizar la oxidación de varios sustratos orgánicos e inorgánicos (Logan *et. al.* 2006a). Una MFC convierte un sustrato biodegradable directamente a electricidad.

1.2. HISTORIA DE LAS MFC

La idea de que los microorganismos podrían producir una señal eléctrica a través de sus procesos metabólicos se introdujo en el año 1911 por el profesor de botánica de la Universidad de Durham, M.C. Potter, quien utilizó una celda electroquímica de vidrio con dos alambres de platino como electrodos y una bolsa de diálisis como membrana, utilizó una solución de glucosa, como anolito y catolito, para investigar si las señales eléctricas se podían observar cuando los microorganismos se introducen en ambos lados de la bolsa de diálisis. Potter descubrió que las señales eléctricas producidas a partir de sus sistemas son únicas y dependen del tipo de microorganismo.

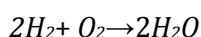
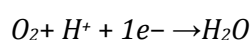
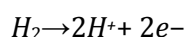
Recientemente el concepto de que algunos microorganismos pueden ser usados como catalizadores en celdas de combustible microbianas fue explorado desde los años 70 y 80 (Suzuki, 1976; Roller *et al.*, 1984), y recientemente han vuelto a ser dispositivos atractivos para generar electricidad, desarrollando oportunidades para aplicaciones prácticas (Liu y Logan, 2004; Liu *et al.*, 2004).

1.3. CLASIFICACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE

Las celdas de combustible se pueden clasificar en diferentes tipos basados en el diseño, la temperatura de operación y tipo de combustible utilizado tales como:

Celda de combustible con membrana de intercambio de protones (PEMFC por sus siglas en inglés).

Este tipo de celda es también conocida como celda de combustible de membrana hecha de electrolito de polímero, se compone de una membrana conductora de protones como la Nafión, esta membrana presenta una alta resistencia química, es mecánicamente fuerte, es buena conductora de protones y es altamente absorbente de agua. Las reacciones que se dan en el ánodo y cátodo de forma general son las siguientes:



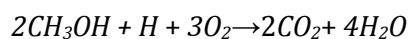
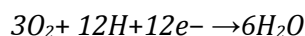
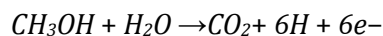
Algunas de las ventajas principales de este tipo de celda son:

- Operan eficientemente a temperatura ambiente, incluidas bajas temperaturas.
- No requiere tratamiento el biogás generado en la celda.

La principal desventaja de este tipo de celda de combustible es la necesidad de catalizadores caros para acelerar la reacción electroquímica. Además, el monóxido de carbono no puede ser utilizado como un combustible debido a que envenena la celda.

Celdas de combustible de metanol directo (DMFC por sus siglas en inglés).

Este tipo de celda también utiliza una membrana conductora de protones como la celda anterior mencionada (PEMFC). Su principal diferencia es la alimentación directa de metanol a la celda de combustible. Las reacciones que se producen en la reacción de ánodo, cátodo y en general se dan en las ecuaciones:



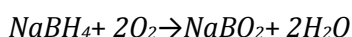
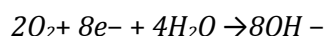
Las principales ventajas de este tipo de celda de combustible son las siguientes:

- El metanol como combustible es fácil de obtener y poco costoso.
- El metanol produce alta densidad de energía.

La principal desventaja de este tipo de celda de combustible es la cinética de reacción lenta, para el caso de la oxidación del metanol, lo que resulta en una menor potencia para un mayor tamaño dado.

Celdas de combustibles alcalinas (AFC por sus siglas en inglés).

Estos dispositivos se han hecho populares, en particular para vehículos espaciales, pero el éxito en otras celdas de combustible de baja temperatura ha disminuido el interés en este tipo de celda. Las principales razones de esto fueron los problemas con los costos, confiabilidad y facilidad de uso. Sin embargo, existe un tipo de AFC que todavía llama la atención y es un candidato para ser utilizado en aplicaciones portátiles, es la celda de combustible de borohidruro directo también conocida como DBFC por sus siglas en inglés, ya que utiliza una solución de borohidruro de sodio como combustible. Las reacciones que se producen en el ánodo y cátodo de forma general se dan en las ecuaciones:



Las principales ventajas de la DBFC son:

- Ocho electrones se forman a partir de un mol de combustible.
- El combustible es altamente alcalino y los residuos de bórax evitan la intoxicación con CO_2 de la celda

de combustible.

La principal desventaja de DBFC es la reacción secundaria llamada reacción de hidrólisis en la que el hidrógeno que se produce del NaBH_4 reacciona con el agua. Sin embargo, con técnicas modernas, el hidrógeno puede ser oxidado de inmediato dando ocho electrones, siempre que la reacción de hidrólisis no se está llevando a cabo con demasiada rapidez.

Celdas de combustible de óxido sólido (SOFC por sus siglas en inglés).

Se utilizan principalmente para aplicaciones estacionarias de generación de energía, sin embargo, también se usan en aplicaciones portátiles. A diferencia de los otros tipos de celdas de combustible mencionadas, son elevadas las temperaturas a las cuales operan estas celdas ya que pueden operar entre 500°C y $1,000^\circ\text{C}$. El material más común utilizado para el electrolito es circonio estabilizado (Colpan *et al*, 2008).

1.4. CRECIMIENTO BACTERIANO, CONCEPTO, EXPRESIÓN MATEMÁTICA Y FACTORES

En este trabajo se entiende por crecimiento microbiano el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo (como ciclo celular) si no al demográfico de una población. En este trabajo nos centraremos en el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, que también puede servir para entender el crecimiento de levaduras y de algunos hongos, pero el crecimiento de los virus no se aborda porque se produce de otra forma diferente.

Se denomina ciclo celular al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y alargándose, otras que están iniciando la división celular, etc.

En un crecimiento sincrónico todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular. Los cultivos sincrónicos son muy difíciles de mantener por lo que su importancia está principalmente ligada a los estudios básicos de biología microbiana.

Se denomina crecimiento equilibrado a aquél en el que toda la biomasa, número de células, cantidad de proteínas, de ADN, etc., evolucionan en paralelo. El crecimiento equilibrado probablemente ocurra en muy contadas ocasiones en condiciones naturales.

Las poblaciones de bacterias pueden crecer de una forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido. Puesto que el efecto nocivo (infecciones, intoxicaciones o

envenenamiento) de los microorganismos depende de su número en la mayoría de los casos, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir dichos efectos nocivos.

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación (τ). De esta forma, podemos calcular el número de bacterias (N) al cabo de un número de generaciones (n) usando la ecuación siguiente:

$$N = N_0 2^n$$

Siendo N_0 el número de células en el momento actual. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t/\tau$$

Donde t es el tiempo transcurrido.

Los tiempos de generación de algunas bacterias creciendo en ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de τ de 20 min). Esto lleva a que una única célula ($N_0 = 1$) creciendo con un $\tau = 20$ min, llegue a poder producir 4.7×10^{21} células en 24 horas. Si la bacteria crece en un medio líquido, las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos formando una suspensión de células libres, que puede adherirse a una superficie interna formando una biopelícula (Michel *et al*, 1999).

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada que se encuentra en un sustrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo. Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

Cuando algunos tipos de bacterias o de levaduras patógenas crecen sobre superficies forman biopelículas (*biofilms*) en los que las células se asocian entre sí mediante capas de polisacáridos que forman una película que recubre la superficie sobre la que se encuentran las células. Los biofilms son muy importantes porque los microorganismos que los forman resultan más resistentes a agentes tóxicos. La presencia de biopelículas es un problema serio en la medicina clínica por ejemplo en los implantes ortopédicos, catéteres, etc. Pero por otro lado para el funcionamiento de una MFC es de suma importancia, porque al formarse en los electrodos contribuye con el intercambio de electrones. Un ejemplo de biofilm muy común es el sarro que se forma en de los dientes.

1.4.1. CONCEPTO DE MUERTE DE UN MICROORGANISMO

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible

detectar su presencia por los métodos microbiológicos tradicionales. Es decir: cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas. Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, podríamos considerar como muertos a los microorganismos que no pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables (Michel *et al*, 1999).

1.4.2. LO QUE NECESITA UN MICROORGANISMO PARA CRECER

El aislamiento de las bacterias se hace en la mayoría de los casos mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales. Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares, actualmente existen medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es que utilizan el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si es que utilizan el carbono orgánico.

Los medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.).

Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o bien sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (por ejemplo, el medio SPS denominado de esta forma porque contiene sulfadiacina y sulfato de polimixina utilizado para clostridios), diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos (por ejemplo medios con hematóxinas para identificar colonias de microorganismos hemolíticos), selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*), y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de la mezcla de una población mixta de gran tamaño (Michel *et al*, 1999).

1.4.3. DETECCIÓN Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO

Existen diferentes sistemas ó métodos para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. Algunos de ellos se enumeran a continuación:

Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados **cámaras de Petroff-Hausser**. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10⁵ por mL.

Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. La densidad de células debe ser del orden de 10⁵ por mL.

Cuenta en placa: consiste en sembrar un volumen determinado de muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) contando el número de colonias que se forman. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario que los valores de UFC contados entren en el rango de la norma **NOM-092-SSA1-1994**.

Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.

Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen.

Medida de actividad metabólica de las bacterias debido a que respiran y producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno).

1.4.4. CICLO DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES

En un cultivo bacteriano, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Michel *et al*, 1999):

Fase de adaptación: durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.

Fase exponencial o logarítmica: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático descrito anteriormente en la sección 1.4.

Fase estacionaria: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del

cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.

Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.

Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. La cinética de crecimiento, en este caso, sólo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie también llamadas UFC o por unidad de masa.

1.4.5. FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO

Algunos de los parámetros más importantes que pueden influir en el crecimiento de los microorganismos según Michel *et al*, 1999, son:

Temperatura: cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular.

La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular es lento y las células paran de crecer; aunque suelen morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío.

Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.

pH: el pH influye en el crecimiento de las bacterias debido a que algunas no son capaces de poder reproducirse en medios alcalinos o básicos, la mayoría de las bacterias crecen en un medio con un pH cercano al neutro, aunque también existen bacterias que son especiales de los medios alcalinos o básicos, y que solo se reproducen en esas condiciones.

Oxígeno disuelto: las bacterias que crecen en la presencia de oxígeno son llamadas bacterias aerobias,

las bacterias que crecen sin presencia de oxígeno, o en condiciones donde es muy baja la cantidad de oxígeno son llamadas bacterias anaerobias, por lo que el oxígeno disuelto en el medio de crecimiento es de gran importancia para el crecimiento del tipo de bacteria con las que se esté trabajando.

1.5. FUNCIONAMIENTO DE LA MFC

Una celda de combustible microbiana consiste básicamente en dos cámaras, una llamada anódica y otra catódica, separadas por una membrana intercambiadora de protones. Las bacterias que actúan como biocatalizadores están presentes en el compartimiento del ánodo y participan en la oxidación del sustrato (combustible) para producir electrones. El combustible que se oxida en el ánodo, resulta en electrones, protones y un producto oxidado. Los electrones generados pasan desde el ánodo al cátodo a través del circuito externo, donde se combinan con el oxígeno presente en el aire burbujeadado, y con los protones que llegan hasta el compartimiento del cátodo a través de la membrana selectiva de protones, se genera una corriente eléctrica.

Un diagrama esquemático de la construcción y operación de una MFC se da en la figura 1.1. Ecuaciones generales que ilustran el funcionamiento de un MFC son (Alzate *et al*, 2007):

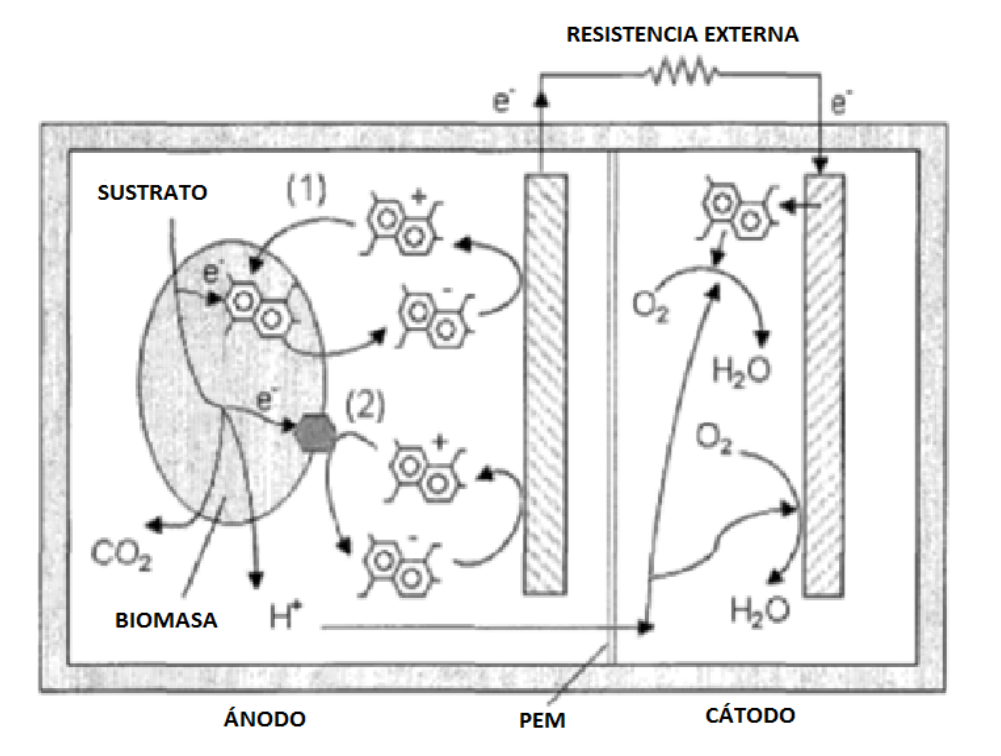
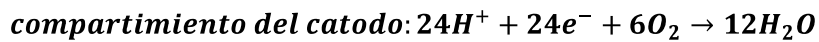
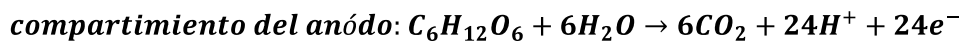


Figura 1.1. Esquema básico de una MFC de dos cámaras que ilustra los mecanismos de transporte de electrones (Alzate *et al*, 2007).

1.5.1. ELECTROLITO

La diferencia fundamental de una celda microbiana de combustible es que está pertenece a las celdas de combustible con membrana de intercambio de protones (PEMFC), y esto radica en el electrolito empleado. El electrolito usado es una membrana polimérica de entre 75 y 150 micras que recibe el nombre comercial de Nafión, fabricado por Dupont, que es un derivado del Teflón cuya estructura se muestra en la Figura 1.2 (Mayandía, 2009).

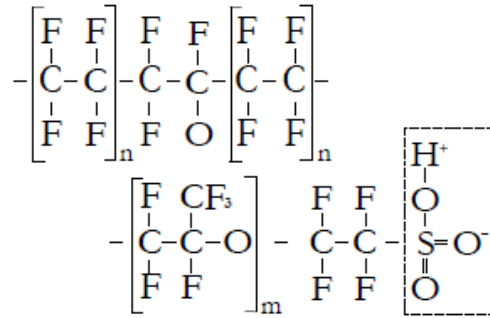


Figura 1.2. Estructura química de la membrana Nafión (Mayandía, 2009).

Las membranas de este material poseen una extraordinaria estabilidad química y térmica, y soportan la acción de numerosos agentes oxidantes o reductores, así como temperaturas relativamente elevadas. La membrana Nafión es un tanto peculiar, ya que para el correcto funcionamiento de todo el dispositivo esta debe mantenerse humedecida en todo momento, de manera que el agua es absorbida por la membrana y debido a su estructura química, los iones negativos queden retenidos, mientras que solo los iones positivos contenidos en la membrana son móviles y libres para llevar carga positiva desde el ánodo hasta el cátodo.

En la mayoría de las celdas de tipo PEM estos iones positivos son iones hidrógeno o protones, de aquí la designación “Membrana de Intercambio de Protones”. Este movimiento de cargas positivas en una sola dirección dentro de la celda de combustible es esencial para su correcto funcionamiento, ya que sin este circuito formado por la celda, la conexión entre electrodos y la carga permanecería abierta y no circularía corriente alguna (Mayandía, 2009).

En general, un electrolito común es una sustancia que se disocia en iones cargados positiva y negativamente en presencia de agua, haciendo por ello que la solución acuosa sea conductora de la electricidad debido al propio movimiento de los iones. Pero no es el caso del usado aquí, ya que se trata de un electrolito no acuoso, que esta inmerso en agua, y necesita ser activado para su buen funcionamiento.

La membrana de electrolito polimérico esta hecha de un polímero orgánico solido compuesto por acido poli-perfluorosulfónico, y consta de tres zonas bien diferenciadas:

- Una cadena principal de fluorocarbonos (Teflón), repetida cientos de veces.
- Cadenas laterales que conectan la cadena.
- Grupos iónicos formados por grupos sulfúricos.

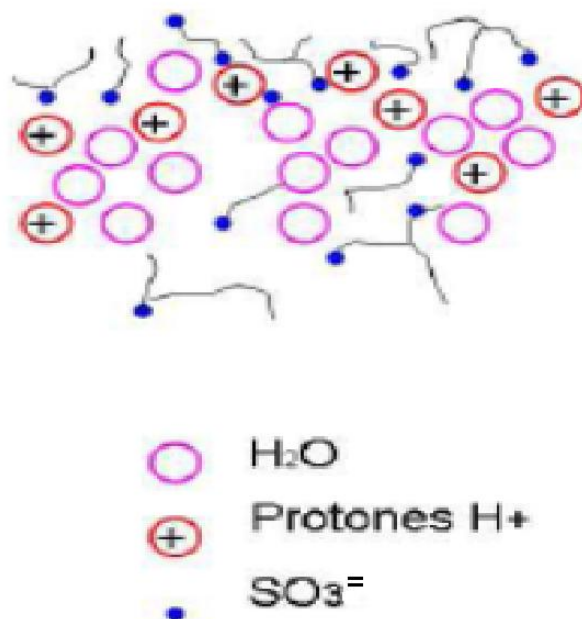


Figura 1.3. Circulación de protones a través de la membrana Nafion (Mayandía, 2009).

El Teflón (Politetrafluoroetileno, o PTFE), es un polímero resistente al ataque químico y fuertemente hidrófobo, propiedad en la que se basa su utilización en la construcción de electrolitos para pilas de combustible para eliminar el agua obtenida en la oxidación del hidrógeno, evitando así el encharcamiento del mismo. Pero para obtener electrolito como tal es necesario añadir otra fase adicional. El polímero PTFE se sulfata, y en uno de los lados de la cadena se añade un grupo sulfúrico HSO₃. Este grupo se enlaza iónicamente, obteniéndose al final de la cadena lateral un ion SO₃⁻.

Como consecuencia de la presencia de estos iones y de los H⁺, se produce una fuerte atracción entre los iones positivos y negativos de cada molécula, de manera que se forman una serie de agrupaciones dentro del material. El ácido sulfúrico es fuertemente hidrófilo, encontrándose en el interior de una estructura hidrófoba. La región hidrófila localizada alrededor de los agregados de cadenas laterales sifonadas puede absorber grandes cantidades de agua, de manera que dentro de estas regiones hidratadas los protones son débilmente atraídos por los grupos SO₃⁻, y gracias a ellos son capaces de desplazarse. Esta morfología está esquematizada en la Figura 1.3.

1.5.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES

El proceso de transporte de electrones es un punto importante de las celdas de combustibles microbianas, debido a que ocurren dos procesos diferentes de transporte de electrones, el primero es el que ocurre en el interior de la celda de combustible, donde son producidos los electrones a través de los metabolismos de las bacterias, y el segundo es el que ocurre en el transporte desde el ánodo hacia el cátodo.

Para el transporte de electrones del ánodo al cátodo, se debe tener en cuenta que se necesita de un

sistema eficiente de transporte de electrones para el correcto funcionamiento de la celda, generalmente se utiliza un circuito externo para hacer el flujo de electrones a través de una resistencia. El circuito externo debe estar compuesto por un conductor eléctrico con una eficiencia alta, para minimizar las pérdidas por resistencia del material conductor desde el ánodo al cátodo, un esquema general del flujo de electrones se muestra en la Figura 1.4.

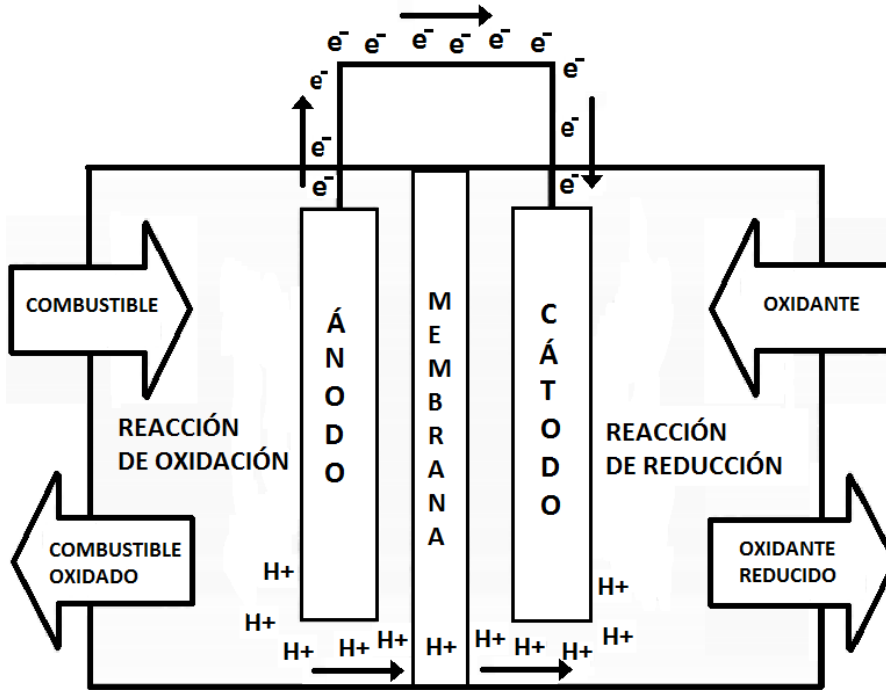


Figura 1.4. Esquema general del transporte de electrones en una celda de combustible microbiana (Mayandía, 2009). Reacción de oxidación

El proceso de transporte de electrones de las bacterias al ánodo, es uno de los fenómenos más complicados de interpretar en un sistema de MFC. Los electrones producidos a partir del sustrato, son oxidados por la bacterias electroactivas, y son transportados hacia el ánodo o electrodo por un mediador como medio de transporte de electrones o nanocables entre la biomasa.

La teoría de transporte de electrones no se ha investigado bien. Sólo un número limitado de estudios han abordado el transporte de electrones. Dos mecanismos de transferencia de electrones se han propuesto en la literatura. En uno de los mecanismos, se considera que los electrones pueden ser transportados al electrodo por un "mediador". Ciertos productos químicos agregados al sistema pueden servir como mediadores. Por ejemplo, ferrocianuro, el hexacianoferrato de potasio, 2-hidroxi-1, 4-naftoquinona, y el rojo neutro se han utilizado como medios para transporte de electrones hacia el ánodo, los cuales pueden funcionar como anolitos acuosos. Un mediador actúa para acelerar el transporte de electrones entre las bacterias electroactivas y el electrodo, y proporciona una reacción bioquímica denominada acoplamiento redox entre la enzima bioelectroactiva y el electrodo.

En el otro mecanismo, los electrones se considera que pueden ser transportados al electrodo por "nanocables" que forman parte de la biopelícula y conectarán a los electrones con el electrodo. Los nanocables se supone que aceptan los electrones de las bacterias en el biofilm y transportan los electrones hacia el ánodo. Ciertas bacterias pueden transferir directamente los electrones hacia el

ánodo por activos redox electroquímicos tales como citocromos en la membrana exterior de las bacterias sin ningún tipo de intermediarios en un sistema de MFC.

Independientemente del mecanismo, el electrón debe ser transferido al electrodo del cátodo para generar la corriente a través del sistema de la MFC. Por lo tanto, la generación eléctrica depende principalmente de la capacidad de transporte de electrones.

Sin embargo, la directa y rápida transferencia de electrones entre las bacterias y el electrodo es difícil de lograr, y hay quienes no recomiendan el uso de mediadores redox, debido a que una vez agotado el mediador, hay que renovarlo.

Aunque se han hecho ya varios experimentos probando diferentes tipos de inóculos y sustratos, la mayor potencia registrada en literatura es de $3.6\text{W}/\text{m}^2$, a continuación se muestra una tabla comparativa de diferentes configuraciones en celdas microbianas de tipo PEM.

Sustrato	Cultivo	Tipo de electrodo	Mediador redox	Densidad de potencia (mW/m^2)	Eficiencia coulombica (%)	Referencia
Lactato	<i>Shewanellaoneidensis</i>	Carbón reticulado vítreo	Ferrocianuro potásico	24	2.4	Ringeisenet al. (2006)
Agua residual doméstica	Bacterias de aguas residuales	Grafito	No	24	3-12	Liu et al. (2004)
Glucosa	Cultivo mixto	Grafito plano	Hexacianoferrato de potasio	3600	89	Rabaey et al. (2003)
Acetato	Bacterias de agua residual doméstica	Papel carbón	No	286 ± 3	65	Min y Logan (2004)
Glucosa	Bacterias de agua residual doméstica	Papel carbón	No	494	9-12	Liu y Logan (2004)
Acetato	<i>Geobactermetallireducens</i>	Papel carbón	No	40 ± 1	19	Min et al. (2005)
Peptona	Bacterias de agua residual doméstica	Papel carbón	No	269 ± 1	6	Heilmann y Logan (2006)
Acetato	Lodos activados	Papel carbón	No	0.097	63-78	Oh et al. (2004)
Glucosa	Bacterias de agua residual	Papel carbón	No	262	40-55	Liu y Logan (2004)
Acetato	Lodos activados	Grafito plano	Ferrocianuro en cátodo	788	No reportó	Park y Zeikus (2003)
Glucosa	Bacterias de agua residual doméstica	Fibra de carbón	No	1430	23	Logan et al. (2007)
Glucosa	Cultivo mixto	Papel carbón	No	336 y 340	60	Alzate et al. (2007)

Tabla 1.1. Comparación de algunos parámetros de desempeño de diferentes configuraciones en celdas de combustibles microbianas de tipo PEM (Alzate et al, 2007).

También es importante mencionar que la celda de combustible en sus dos cámaras debe contener un anolito (cámara anódica) y un catolito (cámara catódica), los cuales deben de ser conductores eléctricos para su correcto funcionamiento, en el caso de la cámara anódica se utiliza un medio acuoso para el crecimiento de los microorganismos, el cual debe de ser rico en nutrientes o aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias a utilizar, y estas puedan generar corriente eléctrica a través de sus metabolismos.

En la cámara catódica se puede utilizar agua como catolito acuoso, la función de utilizar agua es burbujearla con oxígeno para oxidarlo y combinarlo con los protones que provienen de la cámara anódica. También se pueden utilizar mediadores redox como los anteriormente mencionados.

1.6. FUNDAMENTOS TERMODINÁMICOS Y ELECTROQUÍMICOS

Energía libre de Gibbs. La electricidad se genera en una MFC sólo si la reacción global es termodinámicamente favorable.

La reacción puede ser evaluada en términos de energía libre de Gibbs, calculada como:

$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln \Pi$$

Donde ΔG_r (J) es la energía libre de Gibbs para las condiciones específicas, ΔG_r^0 (J) es la energía libre de Gibbs en condiciones estándar, R (8,31447 J/mol K) es la constante universal de los gases, T (K) es la temperatura absoluta, Π (sin unidades) es el cociente de reacción calculado como las actividades de los productos dividido por las de los reactivos elevados a sus correspondientes coeficientes estequiométricos. La reacción normal de la energía libre de Gibbs se calcula a partir de energías de formación de compuestos orgánicos en el agua tabulados (Logan *et. al.* 2006c).

Trabajo eléctrico. En una reacción redox, la energía liberada en una reacción debido al movimiento de las partículas cargadas, resulta en una diferencia de potencial. La diferencia de potencial y la carga transferida de la reacción le ofrecen el trabajo eléctrico. La carga se puede calcular con la constante de Faraday y el número de electrones producidos por unidad mol de reacción.

$$Q = nF$$

Donde Q es la carga transferida en la reacción, expresada en Coulomb [C], n es el número de electrones por mol de reacción y F es la constante de Faraday (96500 Coulombs).

La corriente (I) en amperios se obtiene como:

$$I = \frac{V}{R} = \frac{Q}{t}$$

Donde V es el voltaje (voltios), Q es la carga (coulombs) y t es el tiempo (segundos). La potencia P (vatios) de la celda se mide como

$$P = I \times V$$

Y la producción de energía se mide en joules (J) empleando la expresión:

$$E = P \times t$$

Las eficiencias se expresan con base en la eficiencia coulombica experimental respecto a la teórica y variando de acuerdo al tipo de sustrato empleado en la CCM (Rabaey *et al.*, 2004)

La eficiencia coulombica (EC) se define como la cantidad de materia orgánica que se recupera como electricidad, calcula como:

$$E_c = \frac{C_p}{C_{Ti}} \times 100\%$$

Donde C_p es el total de coulombs calculados por la integración de la corriente en el tiempo transcurrido y C_{Ti} es la cantidad teórica de coulombs, calculada a partir de

$$C_{Ti} = \frac{F \cdot S \cdot v \cdot b}{M}$$

Donde F es la constante de Faraday ($96500 \cdot \text{mol}^{-1}$ de electrones), b es el número de moles de electrones producidos por molde sustrato (para glucosa como sustrato $b=24$), S es la concentración del sustrato (g/L), v es el volumen del líquido, y M es el peso molecular del sustrato (glucosa, 180). De esa manera se obtiene C_{Ti} y se puede obtener la eficiencia coulombica de la MFC (Alzate *et al.*, 2007).

1.7. VARIABLES DE CONTROL Y RESPUESTA

En una MFC la energía es producida directamente por las bacterias, lo que implica la conversión directa de sustrato a energía eléctrica, por lo que las MFC deben ser monitoreadas a través de parámetros electroquímicos tales como densidad de potencia, corriente eléctrica generada y voltaje. De igual forma, un parámetro biológico muy importante es la carga orgánica del sustrato a emplear y el consumo del mismo, (Rabaey *et al.*, 2003).

También es importante mencionar que la Temperatura de operación, el pH y el Oxígeno Disuelto juegan un papel muy importante, ya que las bacterias son muy sensibles a estos cambios, por lo que se recomienda hacer un seguimiento de estas tres variables manteniéndolas en las condiciones óptimas para el desarrollo de las bacterias y la generación de corriente.

1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de resultados se utilizó un software llamado Origin Pro 8.0® con la herramienta ANOVA, y del mismo modo que la t de Student, la prueba ANOVA es una prueba paramétrica y como tal requiere una serie de supuestos para poder ser aplicada correctamente. Denominada también análisis

de la varianza, en realidad va a servir no solo para estudiar las dispersiones o varianzas de los grupos, sino para estudiar sus medias y la posibilidad de crear subconjuntos de grupos con medias iguales. Se puede decir que la prueba ANOVA es la generalización de la t de Student, ya que si se realiza una prueba ANOVA en la comparación de solo dos grupos, se obtiene el mismo resultado (Martínez *et al.* 2006).

Al igual que la t de Student, se requiere que cada uno de los grupos a comparar tenga distribuciones normales, o lo que es más exacto, que lo sean sus residuales. Los residuales son las diferencias entre cada valor y la media de su grupo. Además se debe estudiar la dispersión o varianzas de los grupos, es decir estudiar su homogeneidad. Cuando mayor sean los tamaños de los grupos, menos importante es asegurar estos dos supuestos, ya que la prueba ANOVA suele ser una técnica bastante “robusta” comportándose bien respecto a transgresiones de la normalidad. No obstante, si se tienen grupos de tamaño inferior a 30, es importante estudiar la normalidad de los residuos para ver la conveniencia o no de utilizar el análisis de la varianza. Si no fuera posible utilizar directamente el ANOVA, se puede recurrir al uso de pruebas no paramétricas, como la de Kruskal-Wallis (Martínez *et al.* 2006).

Como se ha mencionado, la prueba de ANOVA es la generalización de la t de Student, y sus hipótesis nula y alternativa se pueden formular del siguiente modo:

$$\cdot \text{Hipótesis nula (H}_0\text{): } \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

Las medias de los k grupos son iguales y por tanto las diferencias encontradas pueden explicarse por el azar. Dicho de otro modo, los grupos proceden de poblaciones con medias iguales.

· Hipótesis alternativa (H₁): al menos uno de los grupos tiene una media distinta del resto de grupos.

En la prueba ANOVA las comparaciones son siempre bilaterales (a dos colas) ya que se estudia globalmente si los grupos tienen medias distintas, y no si un grupo tiene una media menor o mayor que otro por separado. Si se rechaza la hipótesis nula, no sabremos entre qué grupos están las diferencias (Stockburger *et al.* 1998).

Al usar el software Origin Pro 8.0 se pueden utilizar una serie de métodos por los cuales se puede hacer una comparación de medias por ANOVA: Bonferroni, Scheffe, Tukey, Sidak, Fisher, Bonholm, Sidakholm. Para este trabajo se utilizó el método Holm-Bonferroni.

En la estadística, el método de Holm-Bonferroni es un método utilizado para contrarrestar el problema de las comparaciones múltiples. Con el cual se tiene la intención de controlar la tasa de error y ofrece una sencilla prueba uniformemente más potente que las demás correlaciones que usan datos impares. Es uno de los primeros que usó algoritmos paso a paso en inferencia simultánea. Lleva el nombre de Sture Holm y Carlo Emilio Bonferroni que inventaron el método en 1978 (Altman y Bland, 1996).

El método de Bonferroni es un método sencillo que permite hacer muchas comparaciones (o intervalos de confianza) mientras que mantiene seguro un coeficiente de confianza general.

Este método es aplicable a un análisis de ANOVA cuando el analista ha elegido un conjunto particular de comparaciones por parejas o contrastes, o combinaciones lineales. Este conjunto no es infinito, como en el caso de Scheffé, pero pueden superar el conjunto de comparaciones por pares especificados en el procedimiento de Tukey.

El método de Bonferroni es válido para tamaños de muestra igual y desigual. Se limita únicamente a las

combinaciones lineales o comparaciones de medias de tratamiento (nivel de comparaciones por pares y los contrastes son casos especiales de combinaciones lineales). Indican el número de declaraciones o comparaciones en el conjunto finito de g (Bland y Altman, 1995).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES Y CONSTRUCCION DE LA MFC

La MFC estaba constituida de dos cámaras una llamada anódica y otra catódica, separadas por la membrana de tipo PEM, cada cámara estaba formada por tres placas de vidrio templado, a la orilla de ambas cámaras en la parte donde va la membrana se colocó una goma de hule para evitar fugas y también para amortiguar la presión ejercida al momento de cerrar la celda. La celda tenía una carcasa de acero en cada cámara para poder apretarla y de este modo cerrarla herméticamente, y en la parte de arriba de ambas cámaras se colocó una placa de acrílico, donde se colocaron los electrodos de papel carbón, los cuales estaban unidos a una resistencia externa de 100Ω , como se muestra en la Figura 2.1.



Figura 2.1. Vista frontal de la celda de combustible.

El tamaño de la celda de combustible fue diseñado para poder aprovechar el total del área de la membrana comercial Nafion NR-177, por lo que se construyó de un área de contacto de 30cm X 30cm entre ambas cámaras. También contaba con tres difusores en la cámara catódica, para el burbujeo del oxígeno como se muestra en la Figura 2.1 y 2.2, y poder homogenizar la cantidad de oxígeno presente en la cámara catódica.



Figura 2.2. Sistema de difusores para el burbujeo de aire.

La cámara anódica fue construida de forma diferente a la cámara catódica, esto fue pensado para tener un sistema de agitación constante, por lo que la cámara anódica tenía un arreglo que la hace de menor volumen, pero sigue teniendo la misma área de contacto entre las dos cámaras. La agitación fue proporcionada por un agitador magnético en la parte inferior de la cámara anódica, como se muestra en la Figura 2.3. La razón por la cual se mantuvo en agitación constante la cámara anódica, fue para aumentar la difusión de los nutrientes y lograr una distribución de biopelícula uniforme, además de que ayudo a remover la materia orgánica muerta.

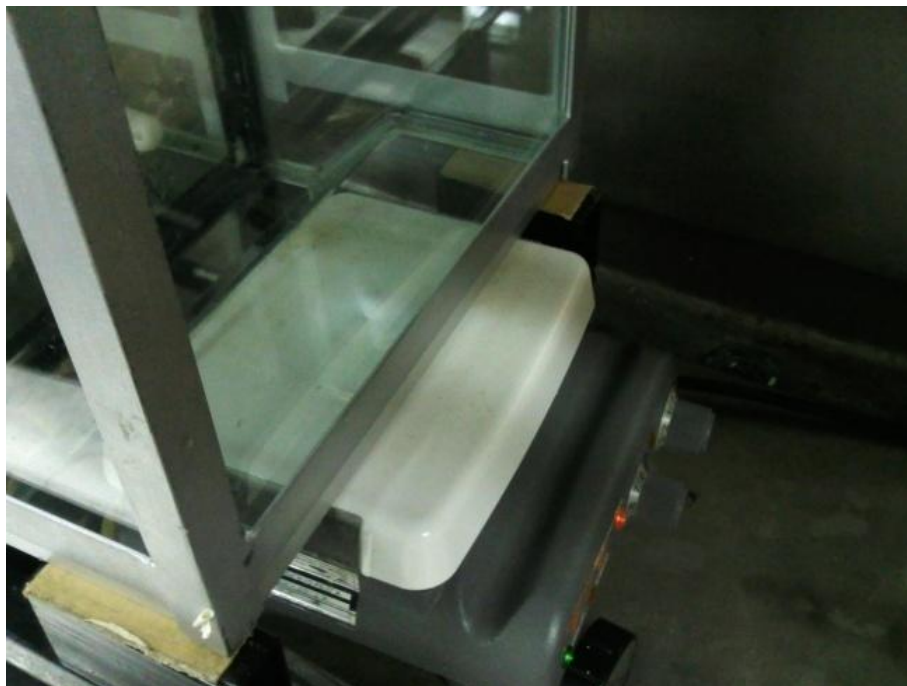


Figura 2.3. Sistema de agitación en la cámara anódica



Figura 2.4. Sistema de agitación en la cámara anódica

Los materiales con los cuales se construyó la celda de combustible microbiana ilustrada en la Figura 2.4, fueron los siguientes:

- Vidrio templado
- Silicón
- Goma de hule de tipo "U"
- Membrana intercambiadora de protones Nafión NR-177 (ION POWER, DUPONT)
- Electrodo de papel carbón (BRUSSEN DE OCCIDENTE, S.A. DE C.V.)

Los inóculos o cultivos utilizados fueron los siguientes:

- Inóculo liofilizado en capsulas marca PolySeed®
- Lodos activados obtenidos de la planta tratadora de aguas COPLATA.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2. ARRANQUE Y FUNCIONAMIENTO DE LA MFC

La MFC fue suministrada con un anolito acuoso compuesto de agua residual sintética, la misma composición se uso para cada tipo de inóculo utilizado, y cuya fuente de carbono fue glucosa grado reactivo. El agua residual sintética (ARS) tuvo un pH de 6 ± 0.5 , y la siguiente composición por litro: 310mg NH_4Cl ; 130mg KCl ; 4,97g NaH_2PO_4 ; y 2,75g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Lovley and Philips, 1998).

Esta ARS solo fue usada en la cámara anódica, en conjunto con las bacterias del inóculo a utilizar, en la cámara catódica solo se uso agua destilada.

Una vez agregada el agua residual sintética, se agregó el inóculo a utilizar, para los tres casos se utilizo un volumen de 2L de inóculo.

Para los tres tipos de inóculo utilizados se realizo el monitoreo de crecimiento bacteriano, determinando UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Una vez que los microorganismos aerobios, facultativos, terminaron su ciclo de vida, se hizo un monitoreo de bacterias anaerobias en viales con medio Brewer, cuya composición y procedimiento de elaboración se describe en la sección de anexos en el apéndice A, y solo se reporto el número máximo de células por mililitro. Los resultados del monitoreo de crecimiento se reportan en el capítulo 3. A continuación en la tabla 2.1 se comparan los 5 experimentos realizados con electrodos de papel carbón.

Tabla 2.1. Descripción de los experimentos realizados				
Orden de inóculo usado	Inóculo o cultivo utilizado	Sustrato empleado	Días de la prueba	Numero de electrodos usados
1	Liofilizado	Glucosa	39	2
2	Liofilizado	Glucosa	43	4
3	Lodos activados	Glucosa	42	6
4	Lodos activados	Glucosa	45	10
5	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Glucosa	29	10

También se monitoreo el pH, la Temperatura y el Oxígeno Disuelto en ambas cámaras, para saber como se comportaba el sistema y poder controlarlo tratando de mantener las mismas condiciones de operación para los 5 experimentos mostrados en la tabla 2.1. También se midió el voltaje generado a través de la resistencia de 100 Ω a lo largo del tiempo de cada experimento realizado.

El inóculo liofilizado que se utilizo en este trabajo requirió de una activación previa a su uso, esta consto en utilizar 500mL de agua por cada capsula usada, y mantenerlo en aireación y agitación constante por lo menos 30 minutos, una vez que se llevo a cabo el procedimiento anterior se utilizó en la MFC.

El inóculo de lodos activados obtenido de la planta tratadora de aguas residuales COPLATA se utilizo el mismo día de su adquisición, tratándolo de transportar en el menor tiempo posible y a temperatura menor a la del ambiente.

Para el crecimiento de la cepa de *Escherichia coli*, primero se sembró por el método de estría en agar McConkey donde se dejo incubando por 24 horas a 34.5°C para después aislar una colonia.

Después de haber revisado el crecimiento en el agar MacConkey, se selecciono una colonia aislada y se pasó a una caja con agar para métodos estándar, donde se dejo incubar a 34.5°C por 24 horas para el crecimiento de la colonia seleccionada, y posteriormente se le hicieron las pruebas de oxidasa y catalasa

para asegurar su pureza. Una vez que se aseguro que la cepa estaba pura se paso a caldo nutritivo para usarlo en la MFC.

Para poder monitorear la carga química en cada una de las 5 pruebas montadas, se midió la demanda química de oxígeno, de acuerdo a la **NMX-AA-030-SCFI-2001**, y también se monitoreo el consumo de sustrato empleado en la celda, debido a que se utilizo glucosa como fuente de carbono, se utilizo un método denominado fenol-sulfúrico, el cual mide la glucosa libre, es decir la que aún no ha sido consumida en el sistema.

2.3. CRECIMIENTO BACTERIANO POR MEDIO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Para monitorear el crecimiento de las bacterias en el interior de la cámara anódica, se tomaron muestras representativas de 10mL desde el primer día de la prueba hasta que se considero la muerte de los microorganismos aerobios, y de las cuales solo se uso 1mL para hacer diluciones en tubos de dilución, los cuales contenían solución con cloruro de sodio al 8.5%, y posteriormente realizar la siembra inmersa en placa.

Para realizar la siembra inmersa en las placa de acuerdo a la **NOM-092-SSA1-1994** se utilizó 1mL de la muestra diluida y se le agrego agar, posteriormente a su enfriamiento se incubaron las placas a 34.5°C por 24 horas, y después se contaron el total de colonias formadas, el medio utilizado fue agar para métodos estándar (AME), y los resultado se reportaron en UFC/ml. Las gráficas de crecimiento y cinéticas obtenidas se muestran en el capítulo 3. El procedimiento para determinar UFC se detalla en la sección de anexos apéndice B.

2.4. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

Se entiende por demanda química de oxígeno (DQO), la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible a ser oxidada por un oxidante fuerte.

Para determinar la concentración de demanda química de oxígeno, mediante espectrofotometría de los tres tipos de inóculos utilizados en este trabajo: liofilizado, lodos activados y cepa pura, se debieron hacer mediciones de la demanda química de oxígeno, a temperatura constante, y con esto se obtiene una curva de calibración en función de la concentración, a la cual se aplica la primera derivada para obtener la ecuación de la recta y poder obtener la DQO para cualquier muestra que entre en el rango de la curva.

El principio por el cual se rige este método es debido a que existe una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden ser oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición a 150°C. La muestra se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Después de la digestión, el dicromato no reducido se mide por titulación o espectrofotométricamente para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente, en este trabajo se siguió el método de

espectrofotometría de acuerdo a la **NMX-AA-030-SCFI-2001**, el procedimiento, los reactivos y los equipos usados se describen en la sección de anexos en el apéndice C.

Para determinar la degradación de DQO o porcentaje de eficiencia de remoción de materia orgánica/sustrato del sistema, se monitoreo el consumo de DQO, y de acuerdo a como disminuía la cantidad de DQO se determino el porcentaje de degradación, usando la siguiente formula para todos los experimentos:

$$\% \text{Degradación} = 1 - \frac{DQO_{M1} - DQO_{B1}}{DQO_{M0} - DQO_{B0}} \times 100$$

Donde DQO_{M1} es la DQO de la muestra a través del tiempo transcurrido, DQO_{B1} corresponde al blanco utilizado al mismo tiempo que se analizo la muestra M1, DQO_{M0} es la DQO de la muestra al inicio de la prueba y DQO_{B0} es la DQO del blanco utilizado al inicio de la prueba.

2.4.1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DQO

Para obtener la curva de calibración de la DQO se realizó la disolución de biftalato de potasio tomando en cuenta que 1mL de la solución preparada es igual a 1mg de DQO, se hicieron diluciones de DQO equivalentes a un rango de 50mg O₂/L a 1000 mg O₂/L. Utilizando los mismos volúmenes de reactivo y procedimiento de digestión que para las muestras. Para realizar la curva de calibración de DQO se hizo una serie de 10 repeticiones de cada concentración utilizada. La tabla y gráfica se muestran en el capítulo 3.

2.5. CONSUMO DE SUSTRATO

Al usar glucosa como fuente de energía para las bacterias contenidas en la cámara anódica, se tuvo que monitorear el consumo de esta, por lo que se determinaron los carbohidratos solubles totales mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Southgate, 1990).

Para determinar la concentración de glucosa consumida en el sistema, mediante espectrofotometría de los tres tipos de inóculos anteriormente mencionados, se deben hacer mediciones de la glucosa en función de la concentración, a temperatura constante, y al igual que con el caso de DQO se realizo una curva de calibración en función de la concentración, a la cual se aplica la primera derivada para obtener la ecuación de la recta y poder obtener la concentración de glucosa para cualquier muestra que entre en el rango de la curva, el procedimiento, los reactivos y los equipos usados se describen en la sección de anexos en el apéndice D.

2.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSA

Se preparo una solución de $100\mu\text{g}$ de glucosa por mililitro, pesando 100mg de glucosa y aforándolos a 100mL; lo que seria igual a 1mg/mL , de esta solución se tomaron 10ml y se aforaron a 100ml nuevamente, obteniendo así la concentración de $100\mu\text{g/ml}$. Una vez obtenido esta solución, se prepararon diferentes tubos con la solución de glucosa para obtener diferentes concentraciones como se muestra en la siguiente tabla:

# Tubo	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de glucosa (ml)	Volumen de agua (ml)	Acido sulfúrico (ml)
Blanco	0	0	1.0	5
1	20	0.2	0.8	5
2	40	0.4	0.6	5
3	60	0.6	0.4	5
4	80	0.8	0.2	5
5	100	1.0	0	5

Para realizar la curva de calibración de glucosa se realizó una serie de 5 repeticiones, de cada concentración utilizada, con los cuales se genero la gráfica, la gráfica y los resultados son mostrados en el capítulo 3.

CAPÍTULO 3.

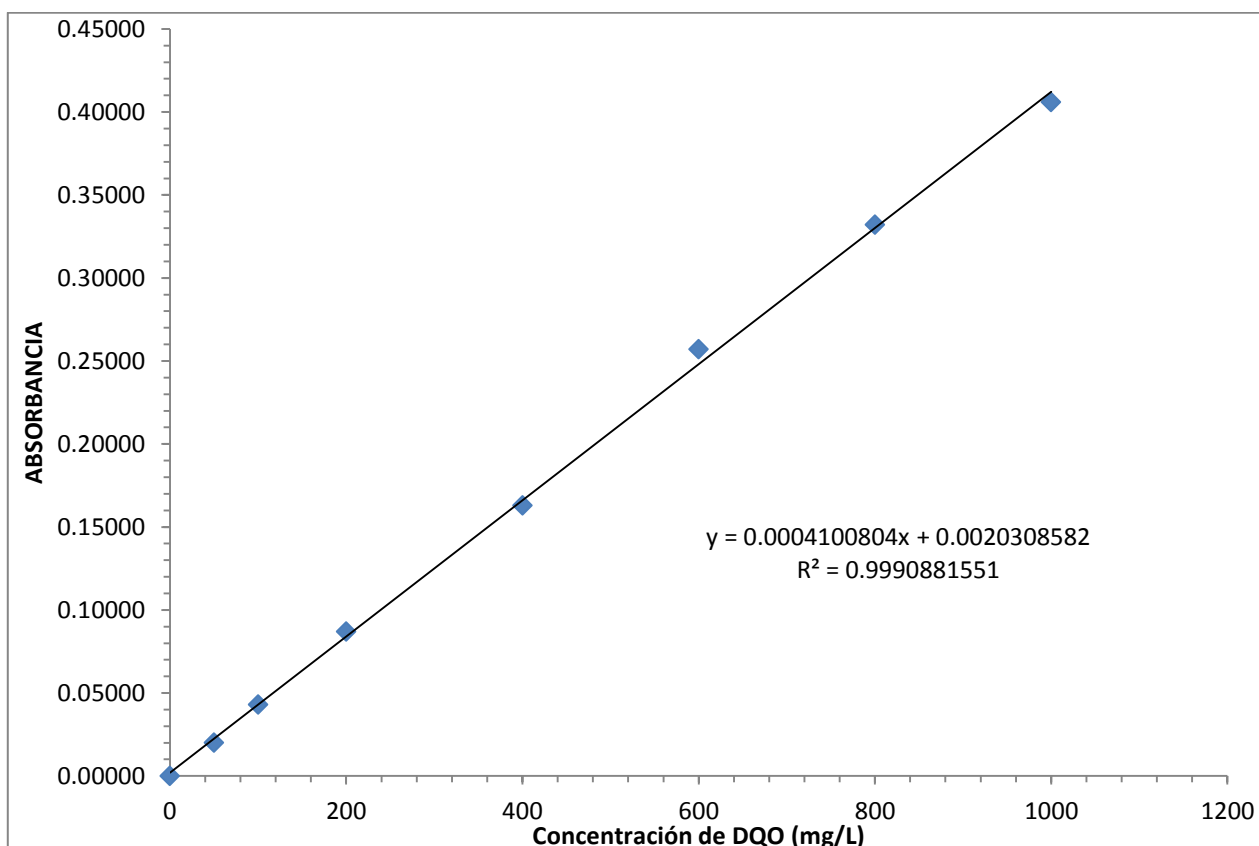
ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE DQO

En la tabla 3.1 se muestran las concentraciones a las cuales se realizó la curva, con sus absorbancias correspondientes. La gráfica que muestra el comportamiento de la curva se muestra en la figura 3.1, donde se encuentra la ecuación de la recta utilizada para el cálculo de la DQO, y donde se puede observar que el ajuste de los datos experimentales a una recta presentan una alta confiabilidad para la determinación de DQO en los sistemas que se utilizaron.

DQO (mgOD/L)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS 4	ABS 5	ABS 6	ABS 7	ABS 8	ABS 9	ABS 10	Curva promedio	Desviación estándar
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0.00000
50	0.02	0.019	0.021	0.022	0.025	0.018	0.02	0.02	0.018	0.017	0.020	0.00231
100	0.043	0.047	0.043	0.041	0.041	0.041	0.047	0.045	0.043	0.039	0.043	0.00267
200	0.087	0.091	0.085	0.086	0.088	0.092	0.084	0.086	0.087	0.084	0.087	0.00271
400	0.165	0.163	0.158	0.161	0.167	0.169	0.16	0.164	0.163	0.16	0.163	0.00340
600	0.258	0.257	0.254	0.255	0.258	0.257	0.259	0.258	0.254	0.26	0.257	0.00205
800	0.328	0.332	0.334	0.335	0.332	0.331	0.336	0.332	0.33	0.33	0.332	0.00245
1000	0.402	0.418	0.405	0.406	0.403	0.405	0.406	0.407	0.406	0.402	0.406	0.00457

Tabla 3.1. Absorbancia en función de la concentración de DQO.



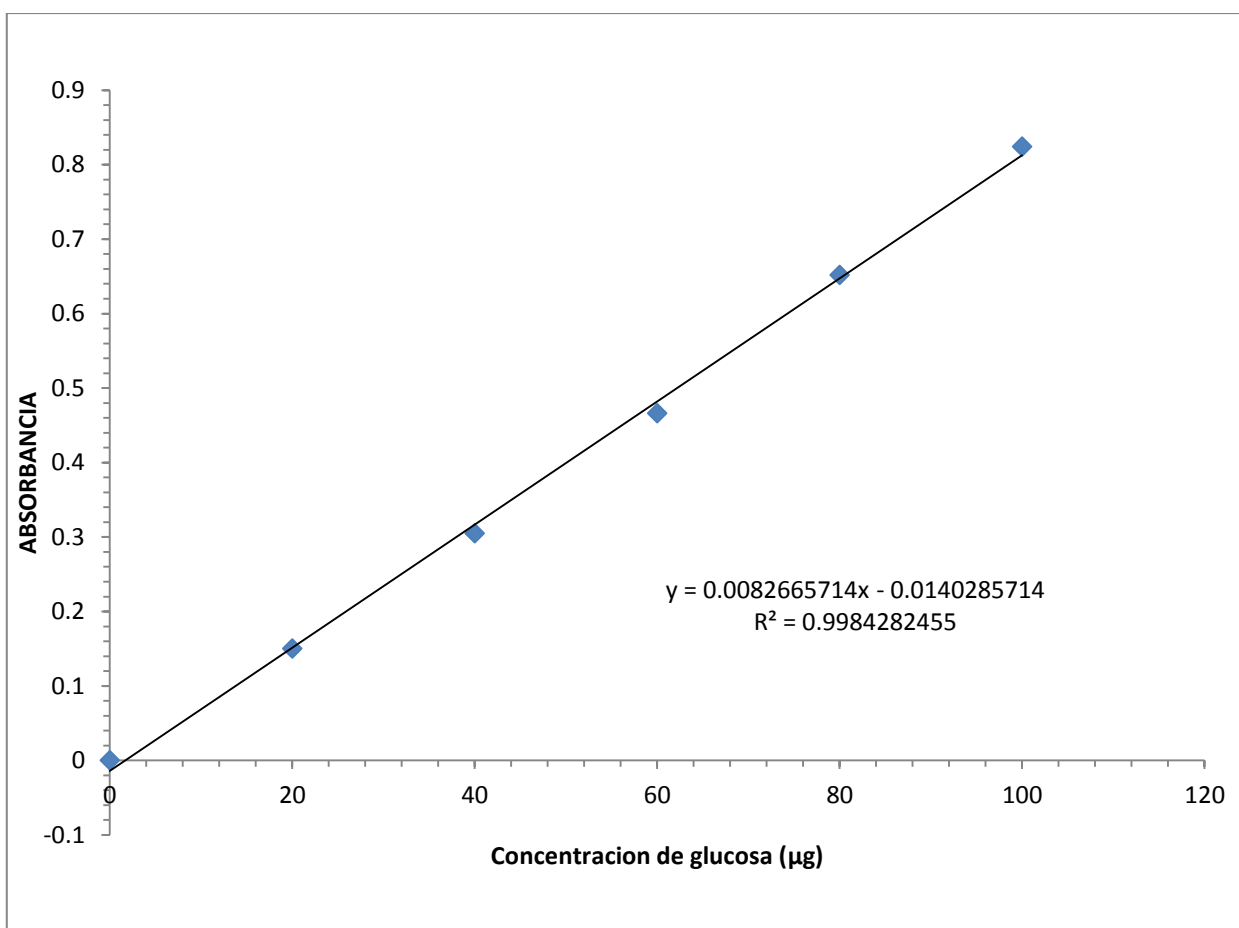
GRÁFICA 3.1 Curva de calibración para la determinación de la DQO

3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

La gráfica que ilustra el comportamiento de la curva de calibración se muestra en la figura 3.2, donde también se encuentra la ecuación de la recta con la cual se determino el consumo de glucosa de los microorganismos dentro de los sistemas utilizados, y también se puede observar que los datos obtenidos experimentalmente ajustados a una recta presentan una alta confiabilidad en el método para determinar el consumo de sustrato.

Concentración (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia promedio	Desviación Estándar
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0.149	0.156	0.151	0.148	0.145	0.1498	0.00408
40	0.35	0.324	0.279	0.27	0.304	0.3046	0.03282
60	0.471	0.455	0.468	0.47	0.465	0.4658	0.00645
80	0.649	0.651	0.667	0.64	0.651	0.6516	0.00973
100	0.842	0.819	0.815	0.82	0.824	0.824	0.01055

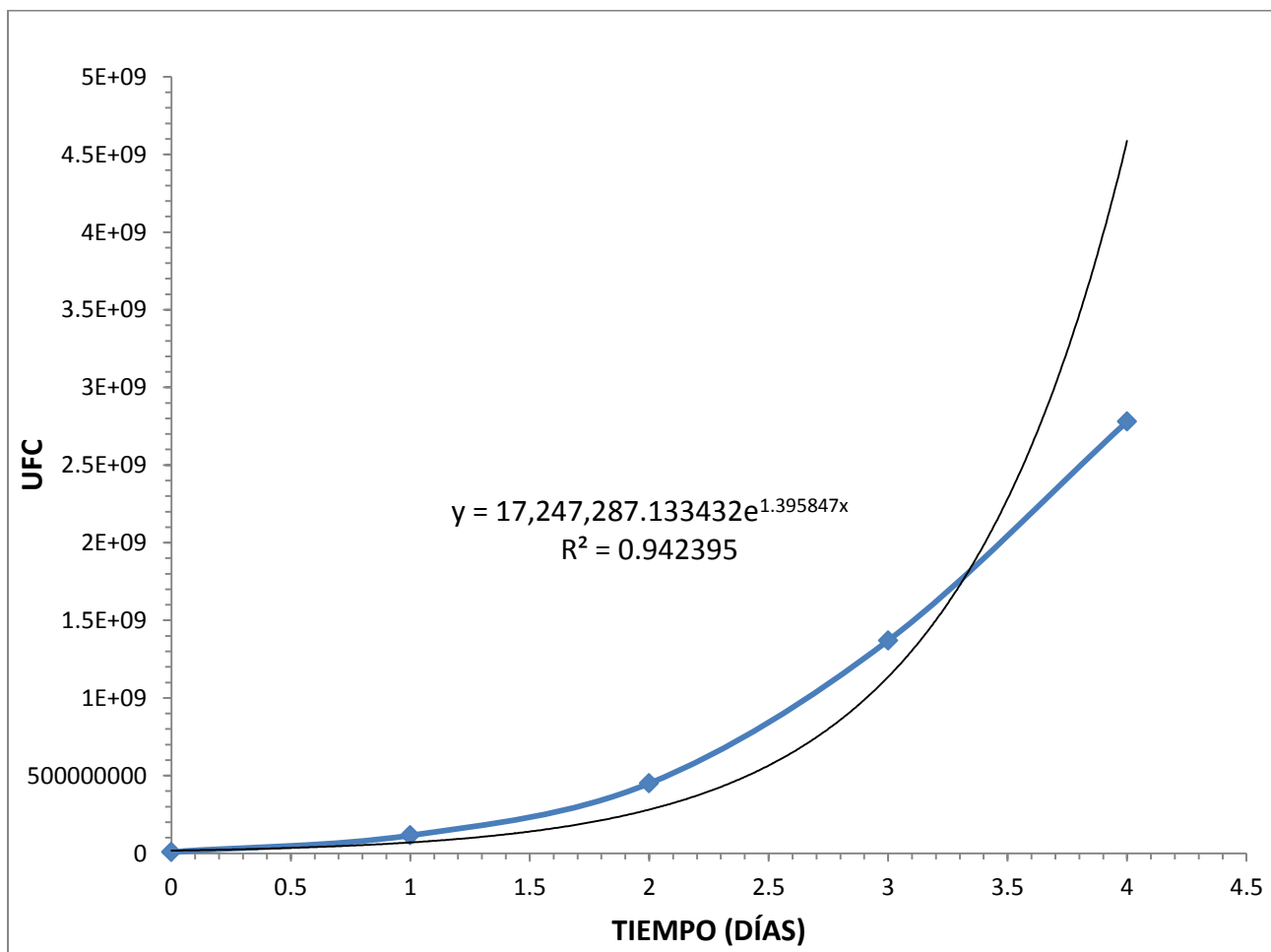
Tabla 3.2. Absorbancia en función de la concentración de la glucosa.



GRÁFICA 3.2 Curva de calibración para la determinación de la concentración de glucosa

3.3. PRIMER INÓCULO LIOFILIZADO

En la figura 3.3 se muestra la cinética de crecimiento de las bacterias aerobias, facultativas contenidas en el inóculo liofilizado, el periodo de crecimiento estudiado fue de 4 días, y se estimó un crecimiento exponencial de 2 orden.

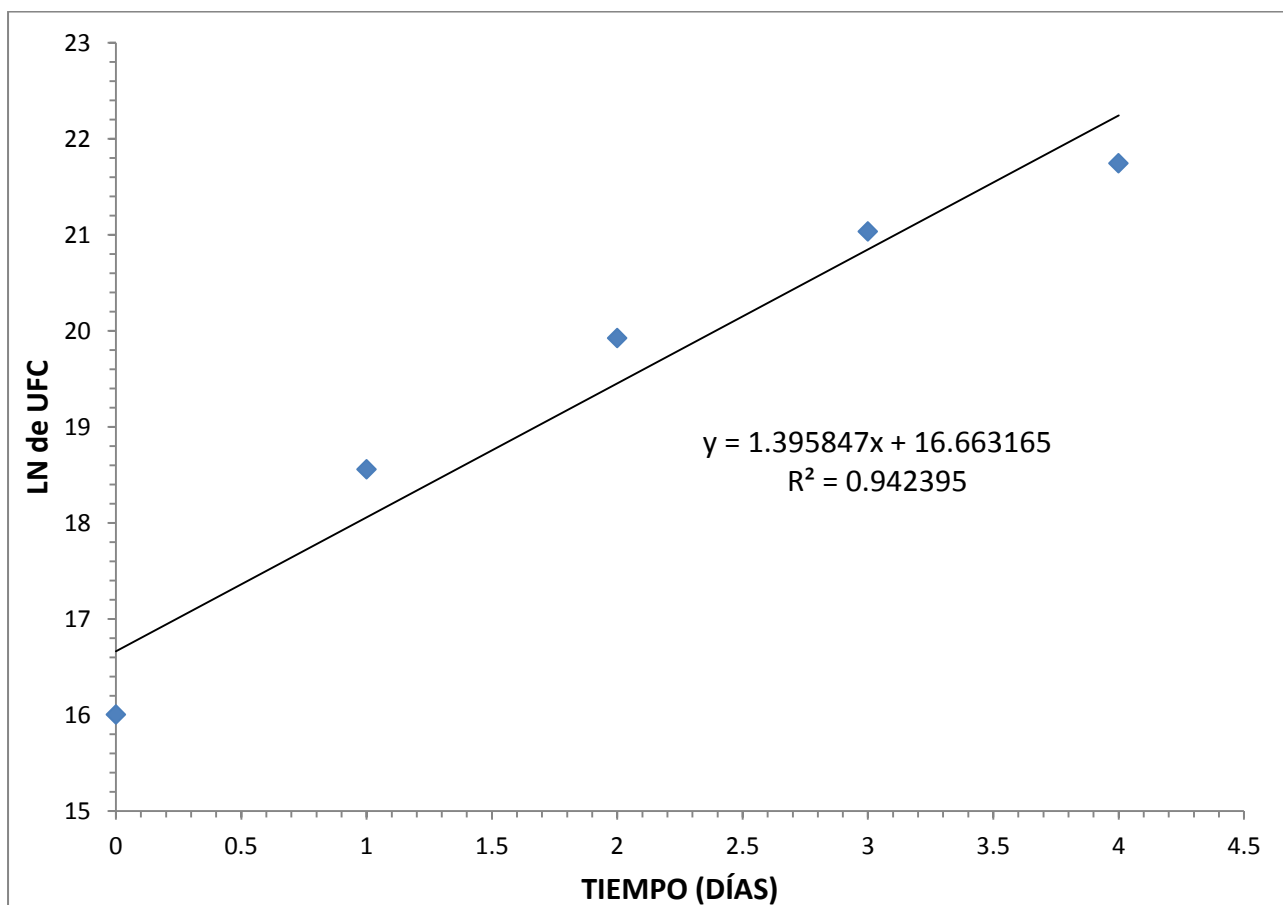


GRÁFICA 3.3. Cinética de crecimiento para el primer inóculo liofilizado

Como se puede observar en la gráfica 3.3 la cinética de crecimiento de las bacterias encontradas en las capsulas de Polyseed® sigue un crecimiento exponencial. Este crecimiento es llamado así porque el aumento de la población se va duplicando cada cierto periodo de tiempo. Cuando esto se representa en una gráfica cuyos ejes están en una escala aritmética, se obtiene un gráfico como el mostrado en la figura, donde se incrementa la pendiente progresivamente, y donde también se muestra el comportamiento teórico esperado por la línea de tendencia (línea solida).

Para obtener información sobre la velocidad de crecimiento se realizó un gráfico semilogarítmico, como el mostrado en la gráfica 3.4 donde se representa el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en escala logarítmica frente al tiempo en escala aritmética, lo que da una línea casi recta.

Este método de estimación de los tiempos de generación (UFC en este caso) de poblaciones con una tendencia de crecimiento exponencial, nos permite dar una idea del crecimiento a partir de la pendiente del gráfico, usando el valor de la pendiente al proponer un valor de tiempo transcurrido.

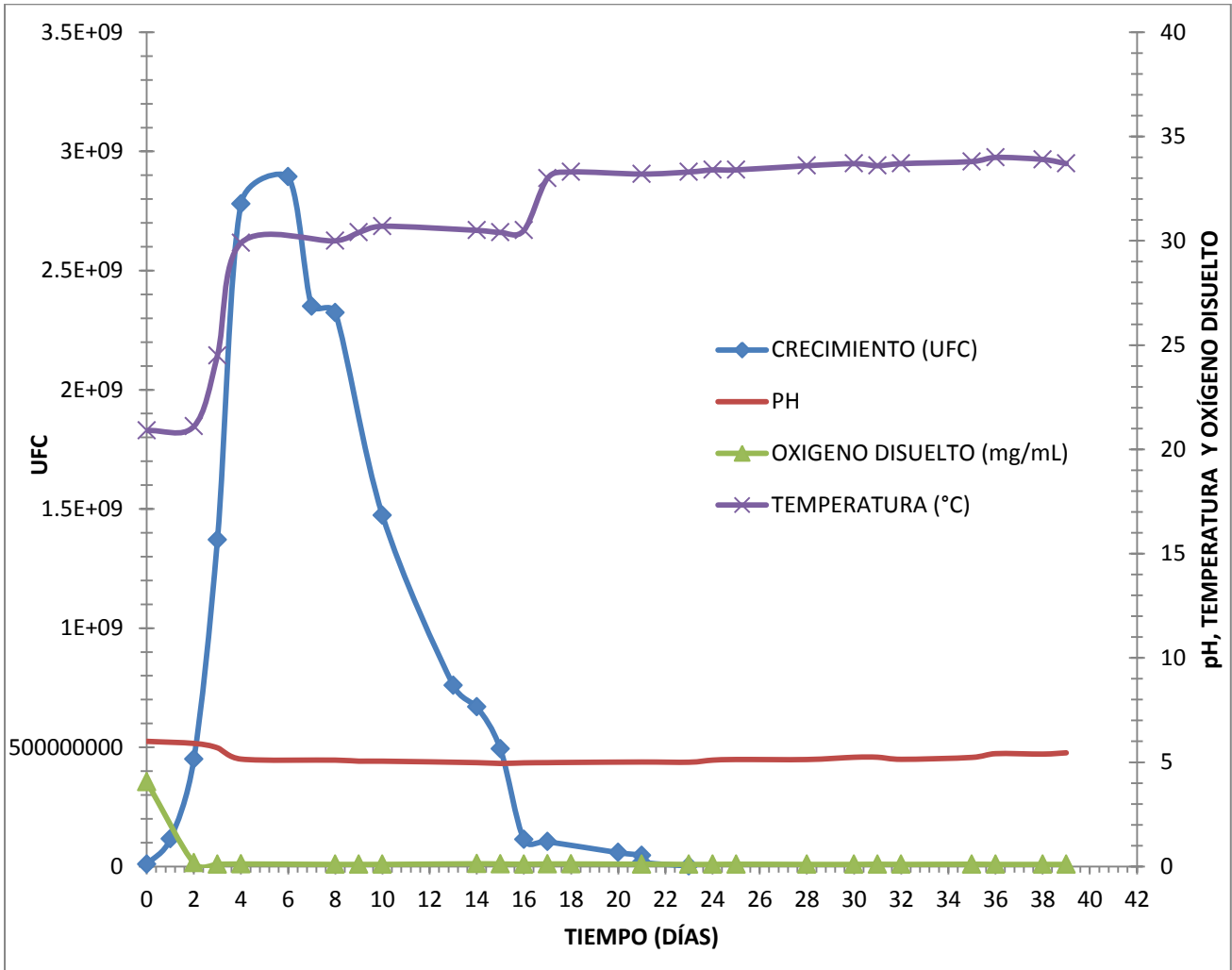


GRÁFICA 3.4. Gráfica semilogarítmico del primer inóculo liofilizado

La idea de conocer los tiempos en los cuales las bacterias duplican su población, nos permite dar una idea de cada cuanto tiempo se tendrá que agregar una fuente de carbón orgánico o sustrato al sistema para que las bacterias tengan una fuente constante de energía con la cual puedan subsistir. En este trabajo no se aborda a fondo este tema porque la experimentación que se realizó fue pensada en una celda de combustible microbiana que no funcionara de forma continua tratando un influente de agua residual, sin embargo, puede servir para el caso en que se plante una MFC en forma continua.

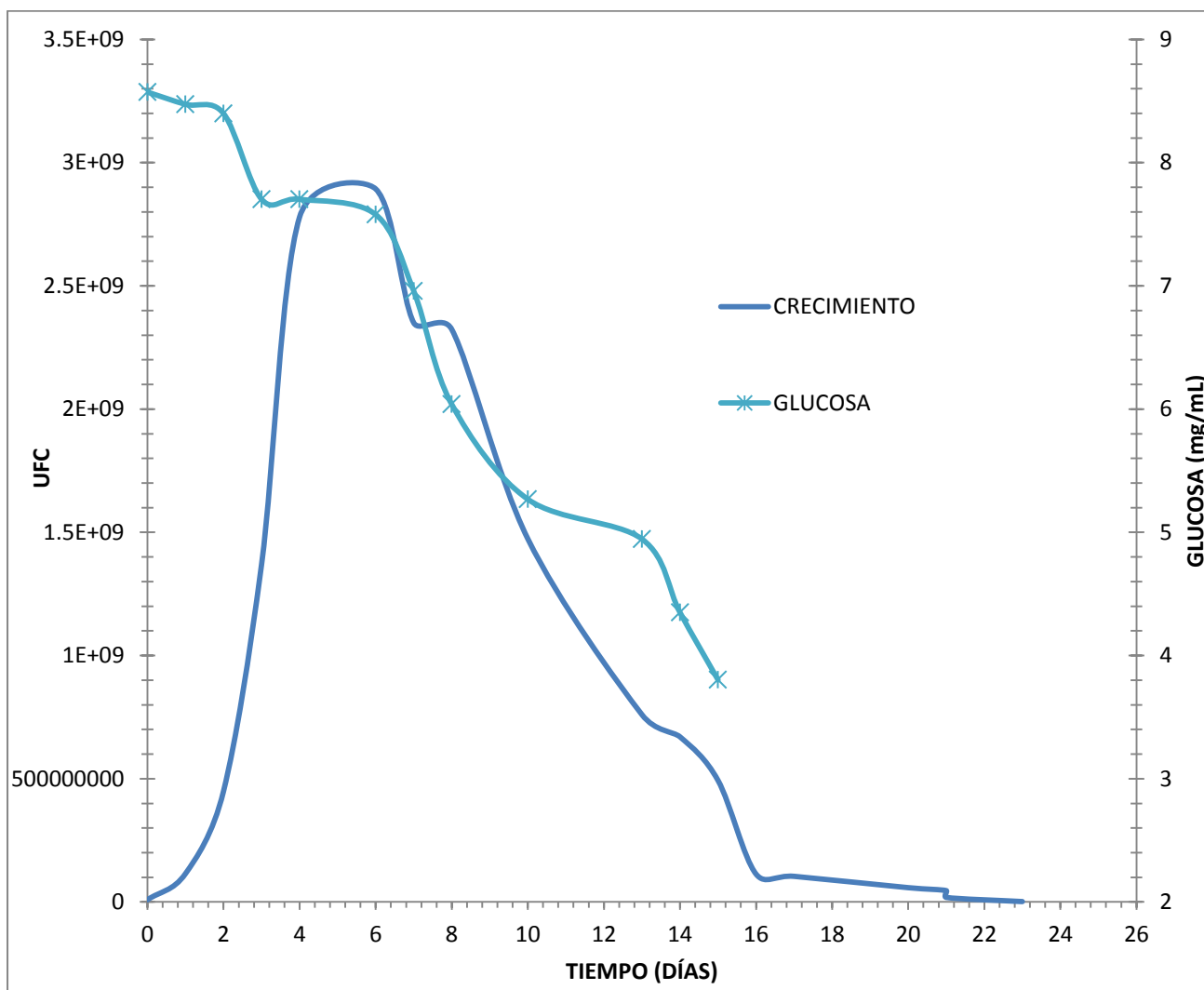
Una de las características de este tipo de crecimiento es que la velocidad de incremento en el número de la población es lenta inicialmente, para después incrementarse constantemente hasta llegar a su máximo, lo cual se puede observar en el gráfico 3.4 donde se puede apreciar una tendencia más lineal a partir del día 1.

En la gráfica 3.5 se muestra el crecimiento obtenido a partir del monitoreo de UFC, con las condiciones de pH, Temperatura y Oxígeno Disuelto, en las cuales opero la MFC con el primer inóculo liofilizado utilizado. En el eje izquierdo del grafico se muestra la escala de crecimiento en función de las UFC's, mientras que en el eje de la derecha se muestra la escala que esta en función del pH, Temperatura y Oxígeno Disuelto.



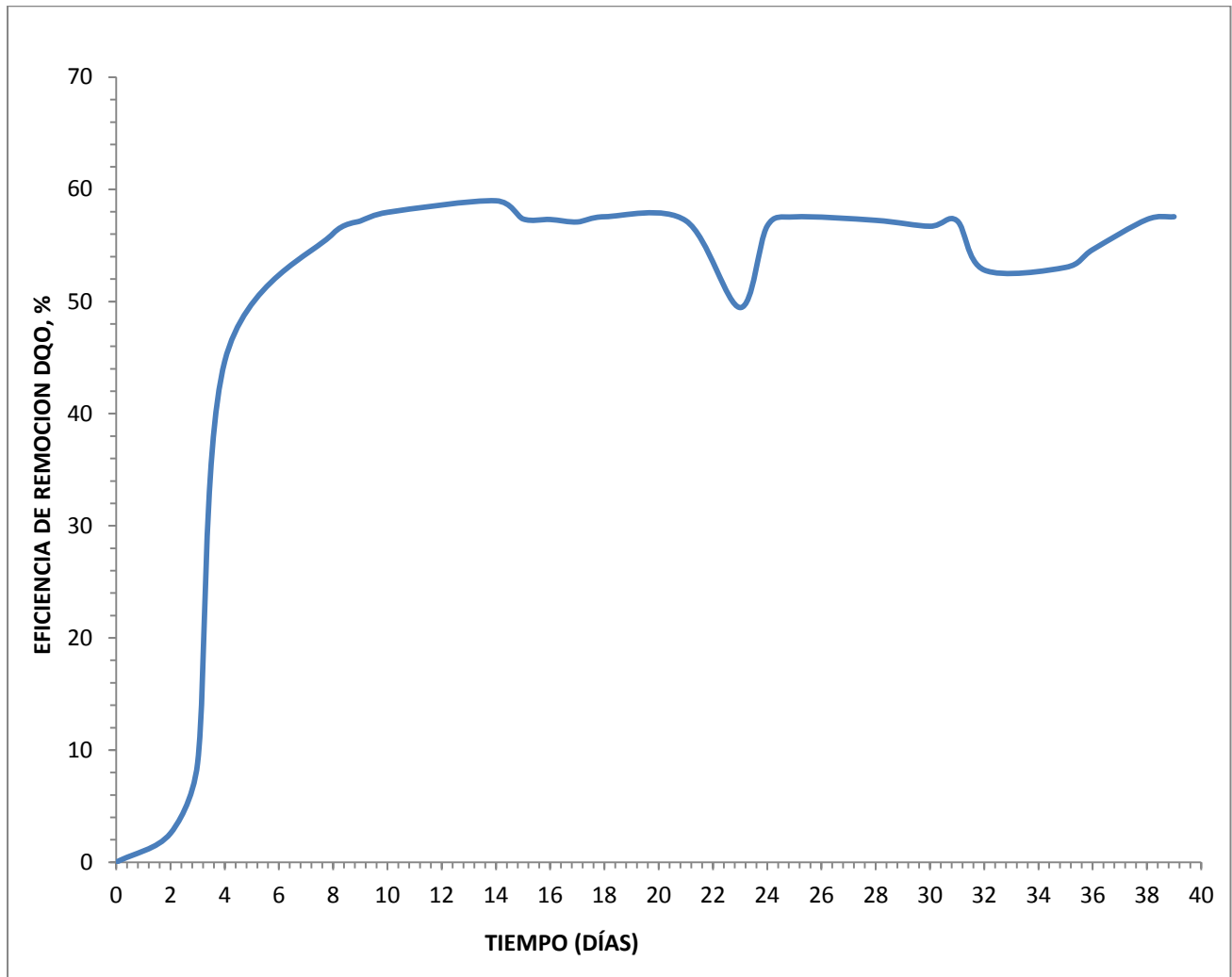
GRÁFICA 3.5. Crecimiento para el primer inóculo liofilizado con las condiciones de operación.

En este experimento solo se pudo determinar el consumo de glucosa en los días en los cuales se monitoreo el crecimiento y una parte de la fase final de vida de los microorganismos, por lo que solo se obtuvieron datos del consumo de glucosa de los primeros 15 días de la prueba mostrados en la gráfica 3.6.



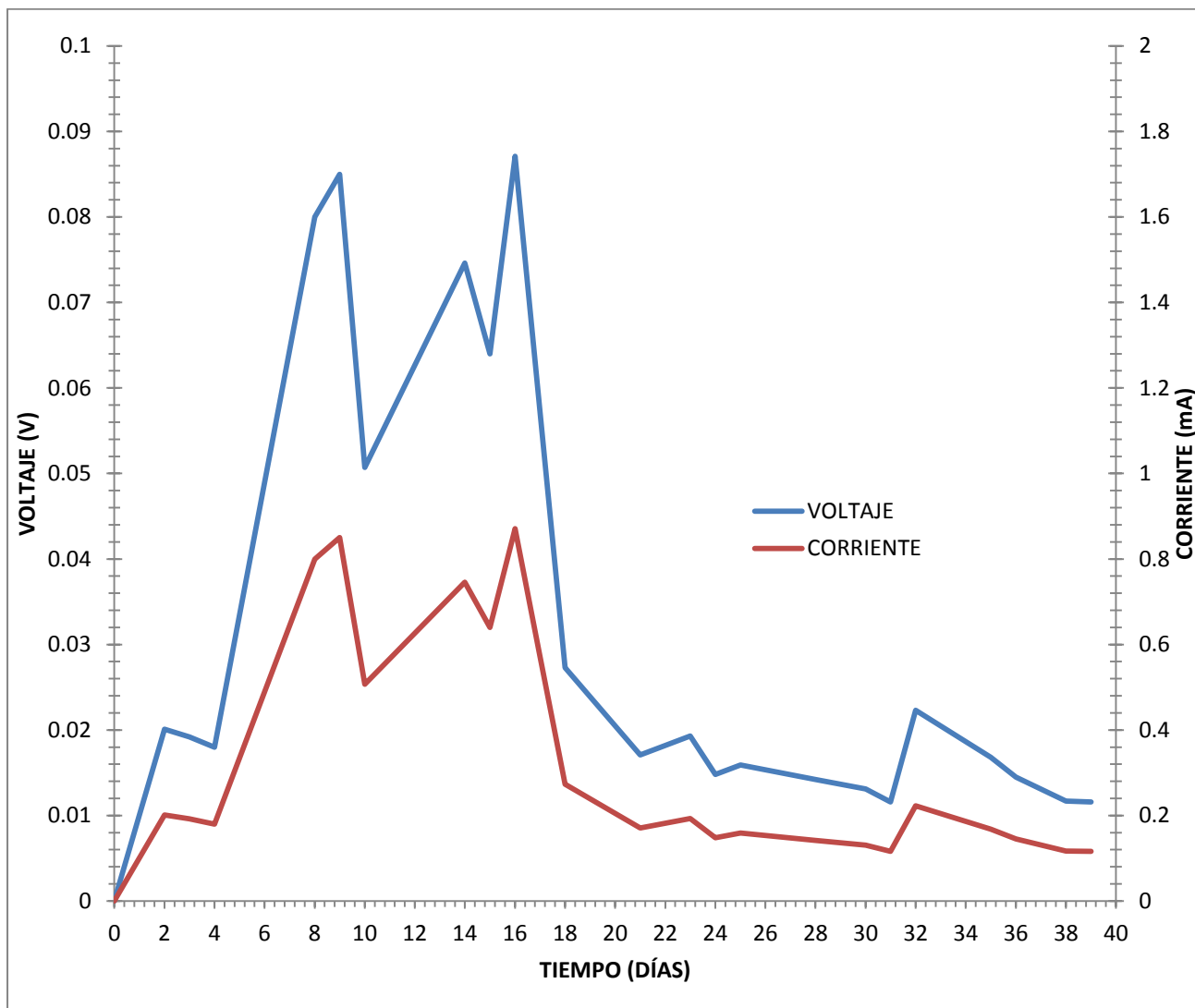
GRÁFICA 3.6. Consumo de sustrato utilizado en el primer inóculo liofilizado.

La gráfica 3.7 muestra el porcentaje de remoción de materia orgánica/sustrato que presentó el primer inóculo liofilizado utilizado, y donde se puede observar una remoción muy próxima al 60%. Debido a que en todos los experimentos se utilizó glucosa como sustrato, la cual es la causante de la mayor carga de DQO, una vez que las bacterias consumieron la glucosa, el porcentaje de remoción de DQO se mantuvo alto y prácticamente constante.



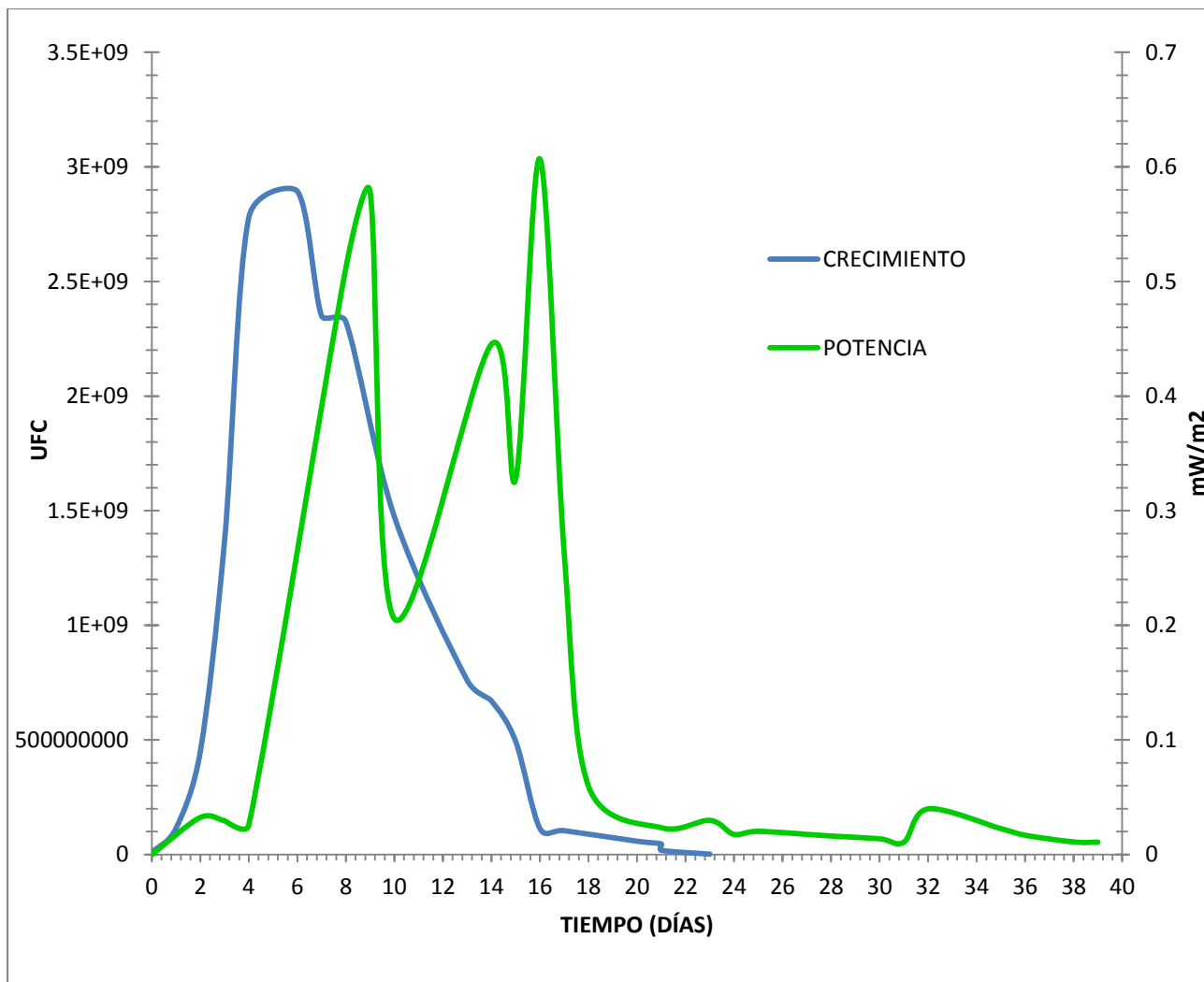
GRÁFICA 3.7. Remoción de sustrato para el caso del primer inóculo liofilizado.

Para generar las graficas de voltaje en todos los experimentos realizados se monitoreo el voltaje generado todos los días a lo largo del experimento, para el caso del primer inóculo liofilizado se encontró un máximo de 0.087V mostrado en la gráfica 3.8, y posteriormente se calculo la corriente generada que circulo a través de la resistencia de 100Ω, médiante la ley de ohm.



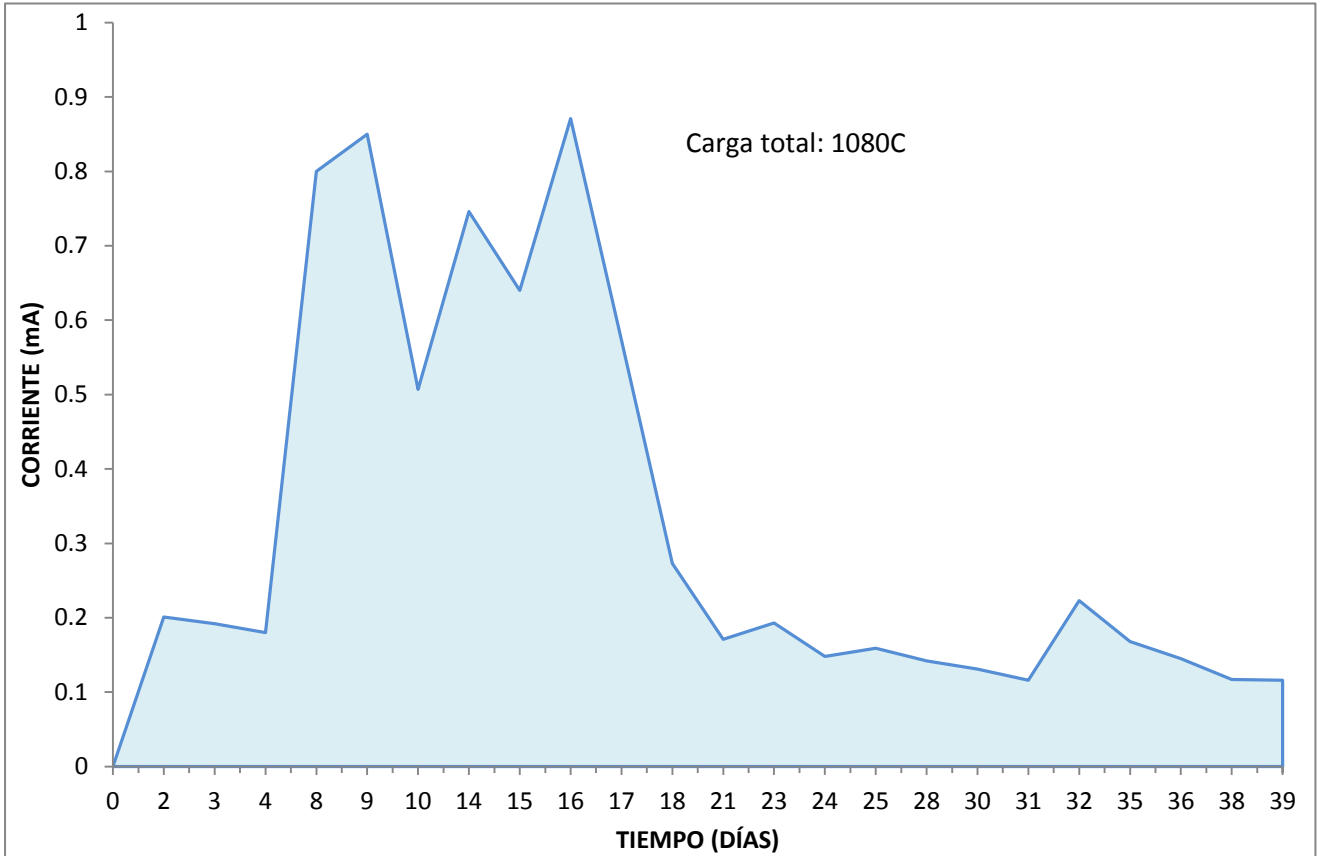
GRÁFICA 3.8. Generación de voltaje y corriente para el caso del primer inóculo liofilizado.

La potencia máxima generada por el primer inóculo liofilizado utilizado fue de 0.6 mW/m² y se puede observaren la gráfica 3.9, la cual se genero al día 16 de la prueba, si lo comparamos con el crecimiento bacteriano, se puede observar que las UFC de ese mismo día se encontraban en su fase final, lo que hace suponer que las bacterias aerobias posiblemente no son las que contribuyen en su mayoría a la generación de corriente eléctrica, y por lo tanto una vez que empezó el crecimiento anaerobio, la generación de electricidad se incremento.



GRÁFICA 3.9. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del primer inóculo liofilizado.

El área bajo la curva es la corriente generada a lo largo de la prueba es decir, es la cantidad de coulombs generados a lo largo de los 39 días del experimento (gráfica 3.10) en este caso el total de coulombs calculado aproximadamente es de 1044C, lo que permitirá calcular la eficiencia de la MFC, si lo comparamos con la cantidad de coulombs teóricos que se deberían de generar.



GRÁFICA 3.10. Total de coulombs producidos del primer inóculo liofilizado.

La eficiencia de la MFC se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$E_c = \frac{C_p}{C_{Ti}} \times 100\%$$

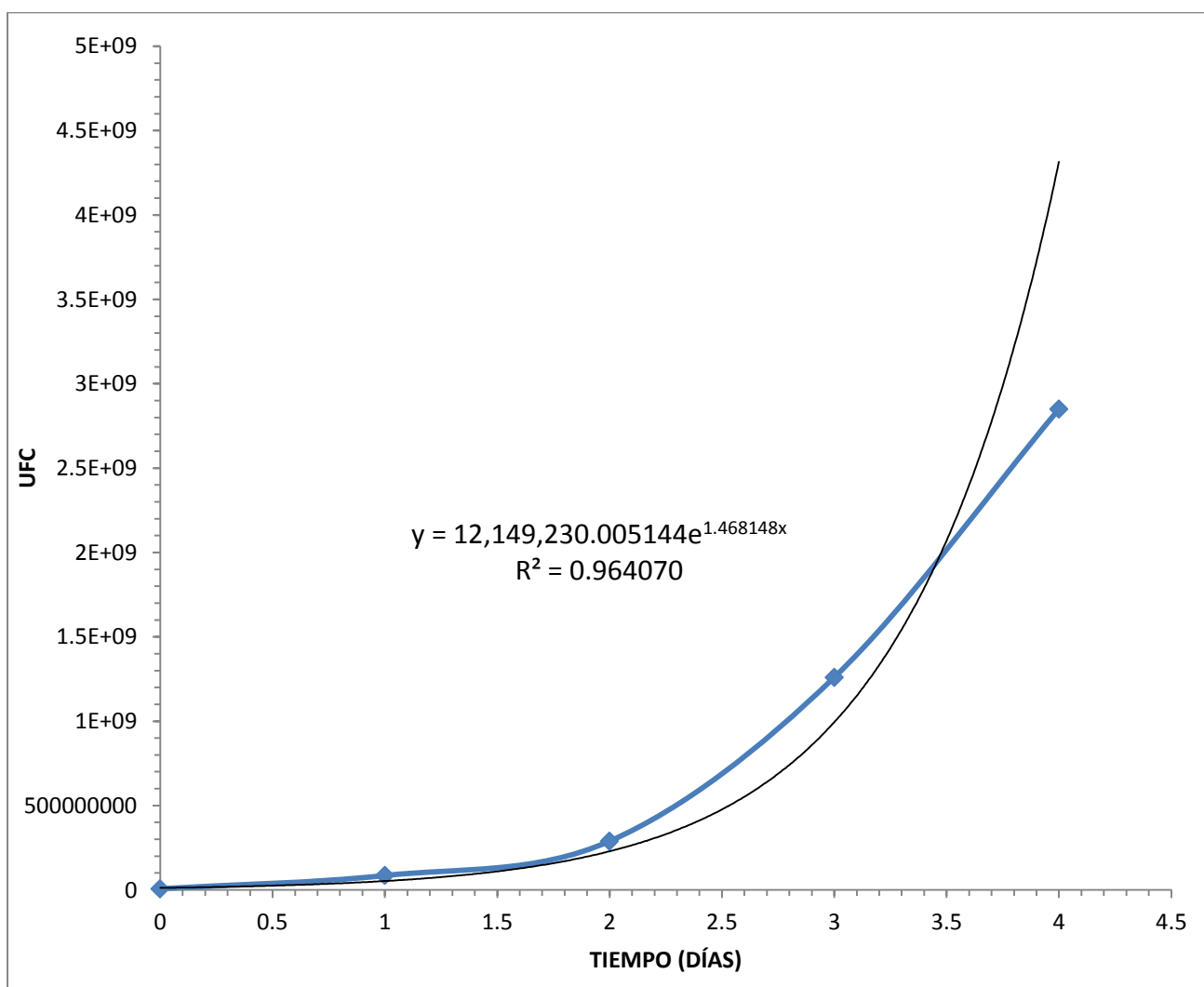
Donde Cp es la carga total calculada a partir del grafico 3.10, y Cti es la carga teórica que se esperaba obtener, para este caso la Cti del primer inoculo liofilizado utilizado fue de 12866.66 C, por lo que la eficiencia de este experimento es:

$$E_c = \frac{1044C}{12866.66C} \times 100 = 8.11\%$$

La eficiencia de este experimento es muy baja debido a que los microorganismos utilizados son aerobios casi en su totalidad, además de que se trata de una capsula liofilizada simuladora de lodos activados, pero no tiene una variedad muy grande de microorganismos.

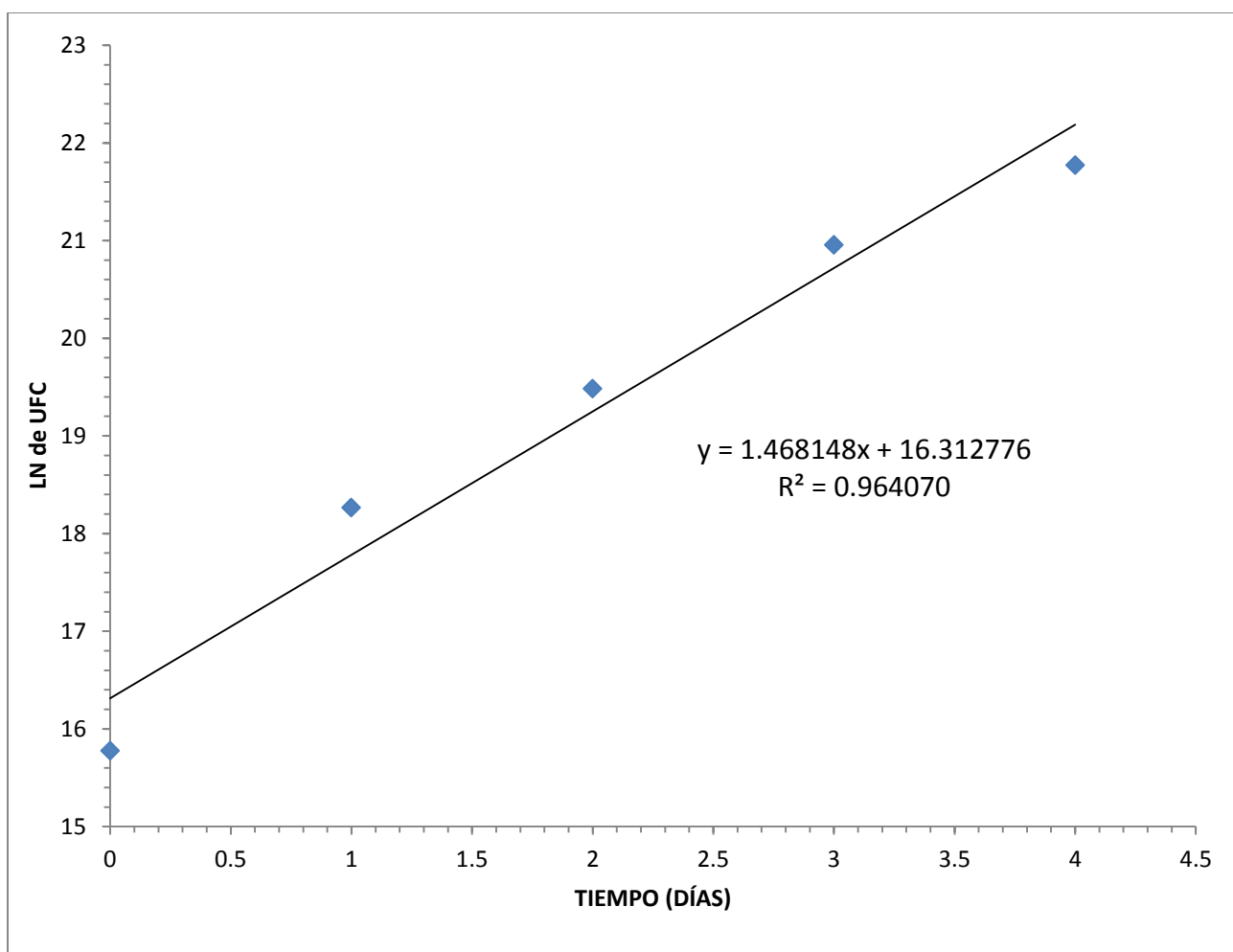
3.4. SEGUNDO INOCULO LIOFILIZADO

En la gráfica 3.11 se muestra la cinética de crecimiento de las bacterias aerobias facultativas del segundo experimento utilizando inóculo Polyseed®, y se puede observar una tendencia muy cercana a la teórica esperada, si comparamos este experimento con el primer inóculo liofilizado, podemos ver que el ajuste entre la línea con experimental (con puntos) y la línea teórica (línea solida) esperada es mayor que la del primer experimento con inóculo liofilizado.



GRÁFICA 3.11. Cinética de crecimiento para el segundo inóculo liofilizado.

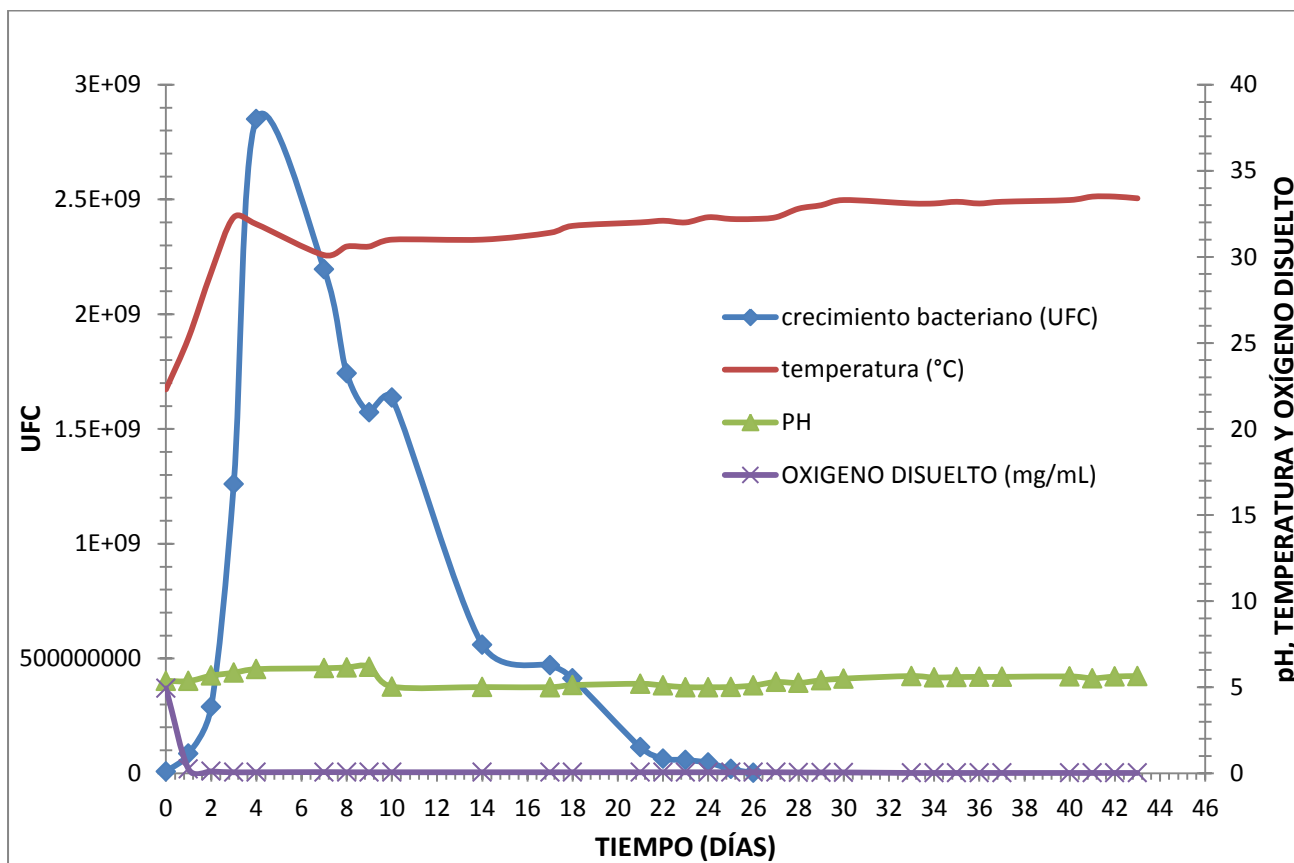
En el gráfico 3.12 se muestra el crecimiento de las bacterias utilizadas, pero se muestra mediante un gráfico semilogarítmico donde se puede predecir el crecimiento de la población de los microorganismos, mediante la ecuación de la recta, es decir a través de la pendiente podemos saber en cuanto tiempo se duplicara la población de las bacterias.



GRÁFICA 3.12. Gráfica semilogarítmica del segundo inóculo liofilizado.

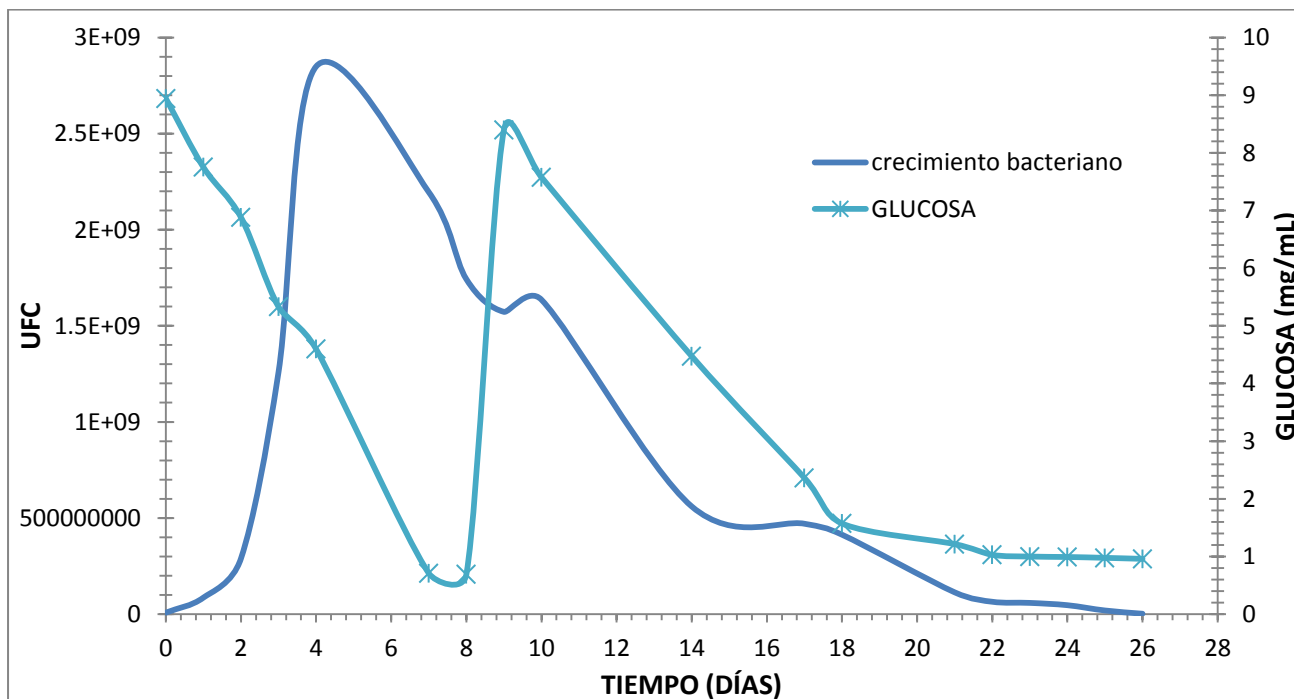
En el gráfico 3.12 se puede apreciar que la población de microorganismos crece de forma lineal, y ya que sigue una tendencia similar al experimento anterior, se puede deducir que el comportamiento de crecimiento en el inóculo liofilizado es independiente del número de electrodos que se usaron.

Las condiciones de operación del segundo inóculo utilizadas mostradas en la figura 3.13, son muy similares a las que se utilizaron en el primer experimento, esto se debió a que se trató de tener las mismas condiciones de operación, para que los microorganismos crecieran en un número igual o similar al anterior.



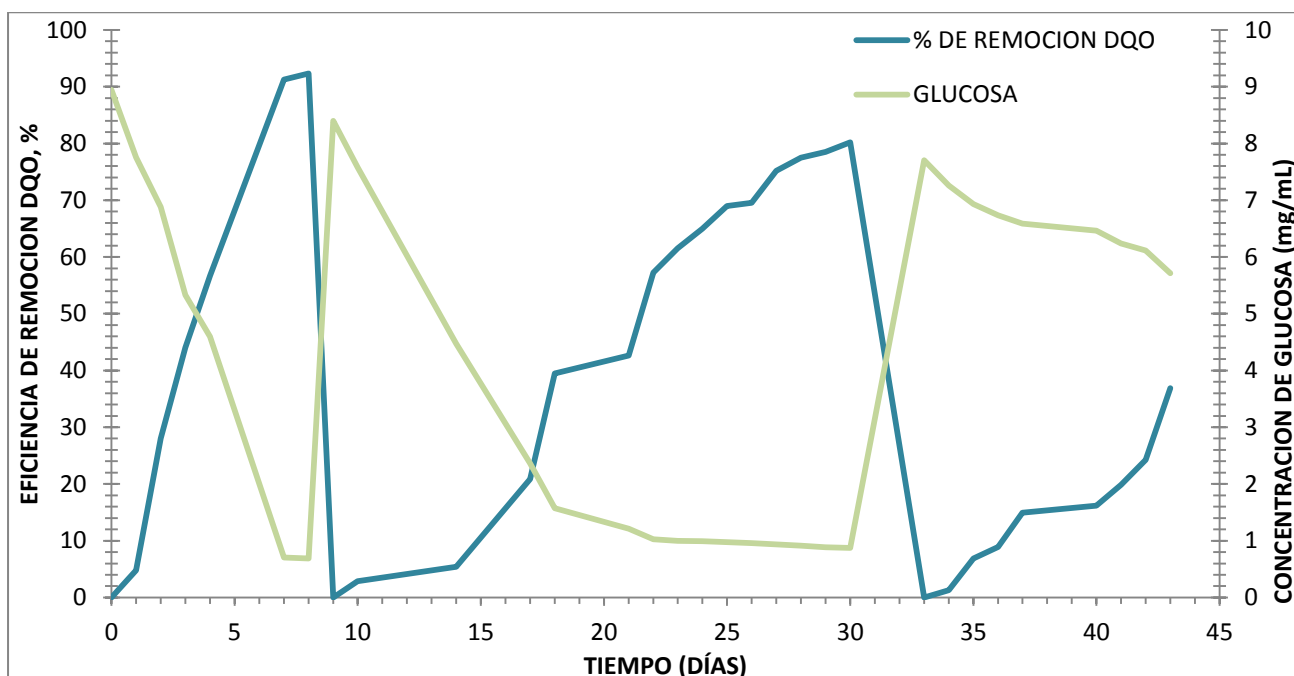
GRÁFICA 3.13. Crecimiento para el segundo inóculo liofilizado con las condiciones de operación.

En la gráfica 3.14 se puede observar el comportamiento del consumo de glucosa, ya que al ir incrementándose la población de bacterias, la cantidad de glucosa presente en el sistema fue disminuyendo, hasta que se le agregó nuevamente para que las bacterias tuvieran una fuente de sustrato con las cuales existir.



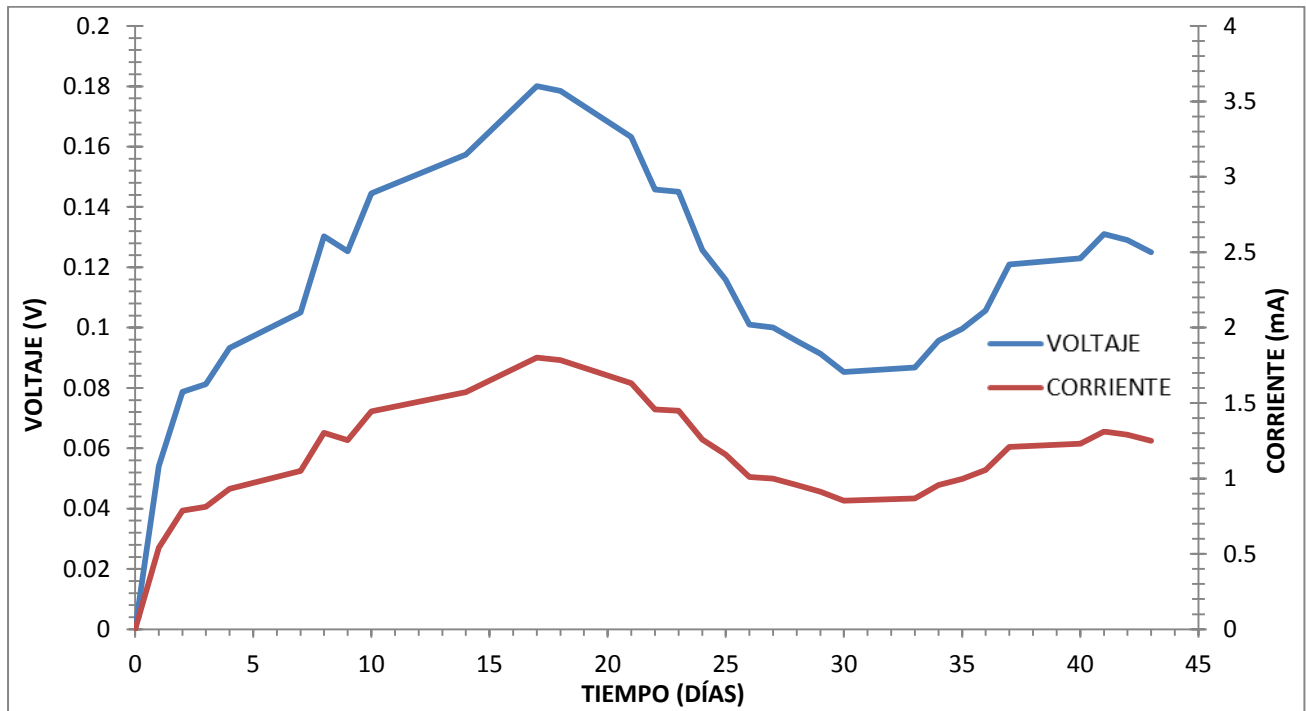
GRÁFICA 3.14. Consumo de sustrato en el segundo inóculo liofilizado.

La siguiente figura 3.15 se puede apreciar que la mayor carga de DQO fue debido a la glucosa presente en el sistema, ya que al agregar glucosa el porcentaje de remoción de DQO se ve incrementado, y con el transcurso de los días y el consumo de la glucosa, la cantidad de DQO presente en el sistema se va removiendo de manera mas eficiente.



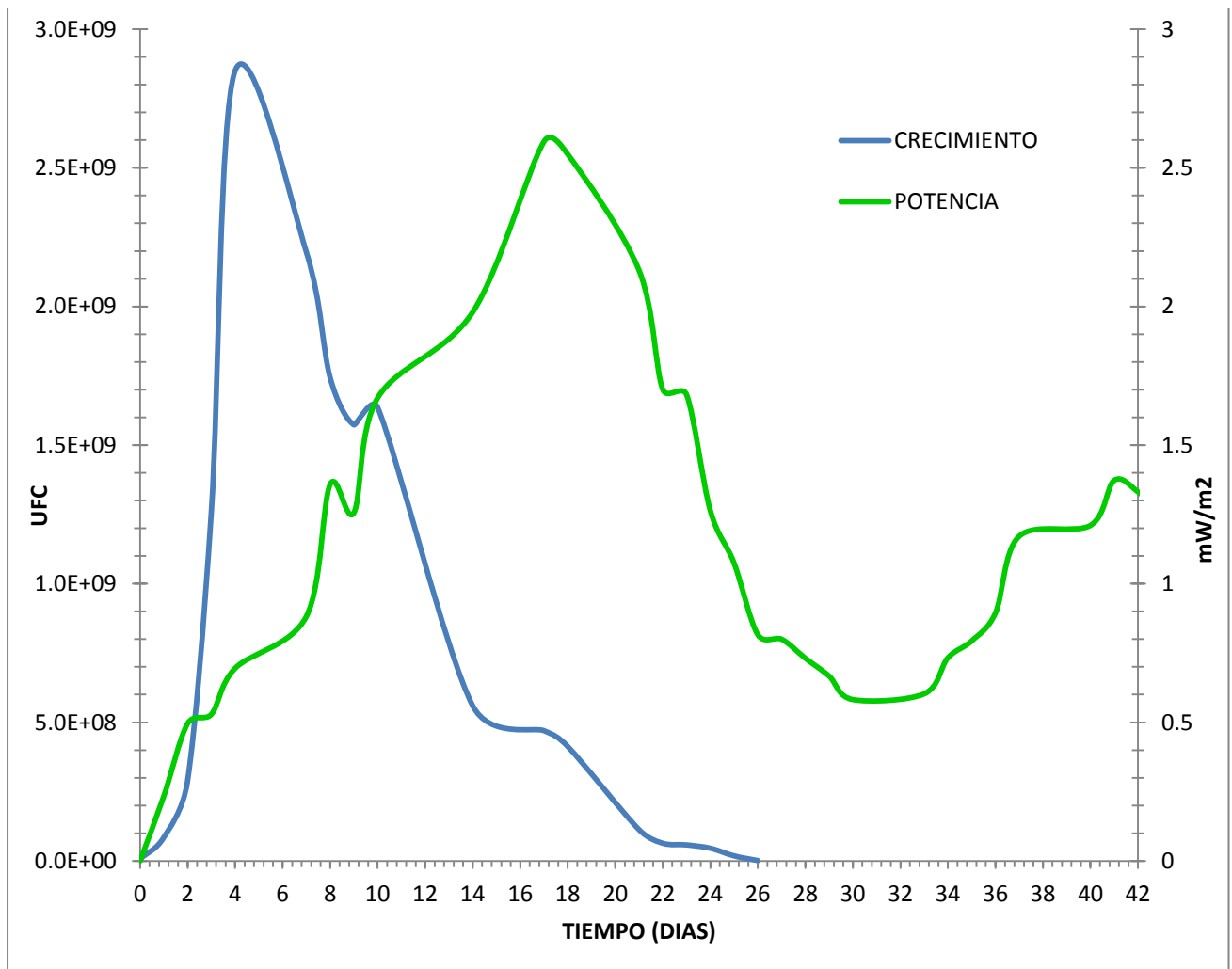
GRÁFICA 3.15. Consumo de sustrato y remoción de DQO en el segundo inóculo liofilizado.

El voltaje generado en el segundo experimento con inóculo liofilizado es el doble que el generado en el primer experimento, esto se debe a que se aumentó el área de contacto de los electrodos, al tener un número mayor de electrodos (de 2 electrodos usados en el primer experimento a 4 usados en este) se incrementó el biofilm creado sobre los electrodos (gráfica 3.16).



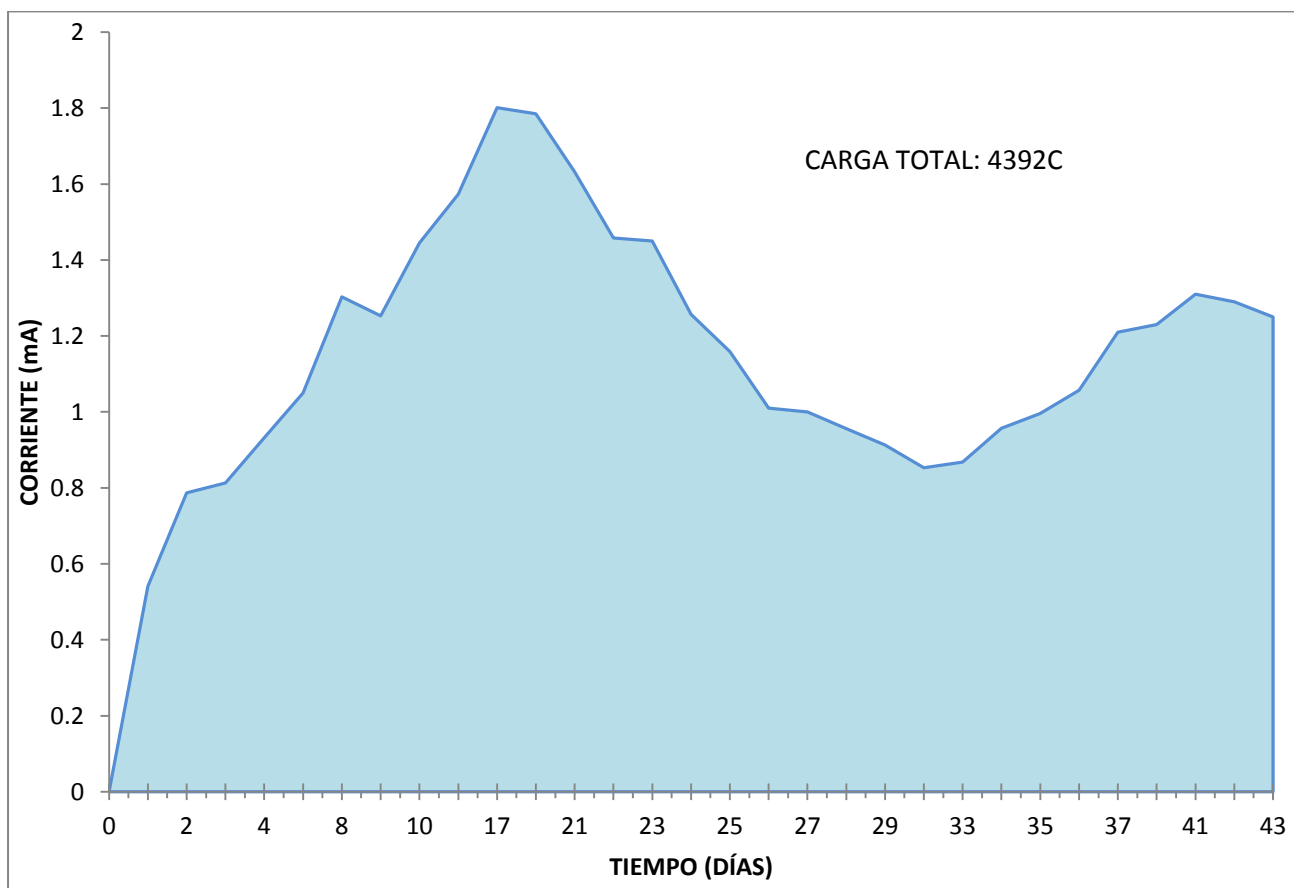
GRÁFICA 3.16. Generación de voltaje y corriente presentada en el segundo inóculo liofilizado.

Debido al aumento de electrodos la potencia también se incremento, pero se vio reflejado también en la etapa anaeróbica, esto podría ser atribuible a que los microorganismos que están generando mayor corriente eléctrica son los anaerobios, y una vez que se les alimenta con materia orgánica, el incremento de voltaje es mayor (gráfica 3.17).



GRÁFICA 3.17. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del segundo inoculo liofilizado.

La eficiencia del segundo experimento se vio afectada de forma directa por la cantidad de electrodos utilizados, ya que el total del área de contacto se incremento, y por lo tanto se esperaba una mayor producción de corriente eléctrica (gráfica 3.18).



GRÁFICA 3.18. Total de coulombs producidos del segundo inculo liofilizado.

Como en el caso anterior se calculo el total de coulombs generados a lo largo de la prueba, para este caso la carga total generada en los 43 días de la prueba es aproximadamente de 4392C, utilizando la siguiente ecuación:

$$E_c = \frac{C_p}{C_{Ti}} \times 100\%$$

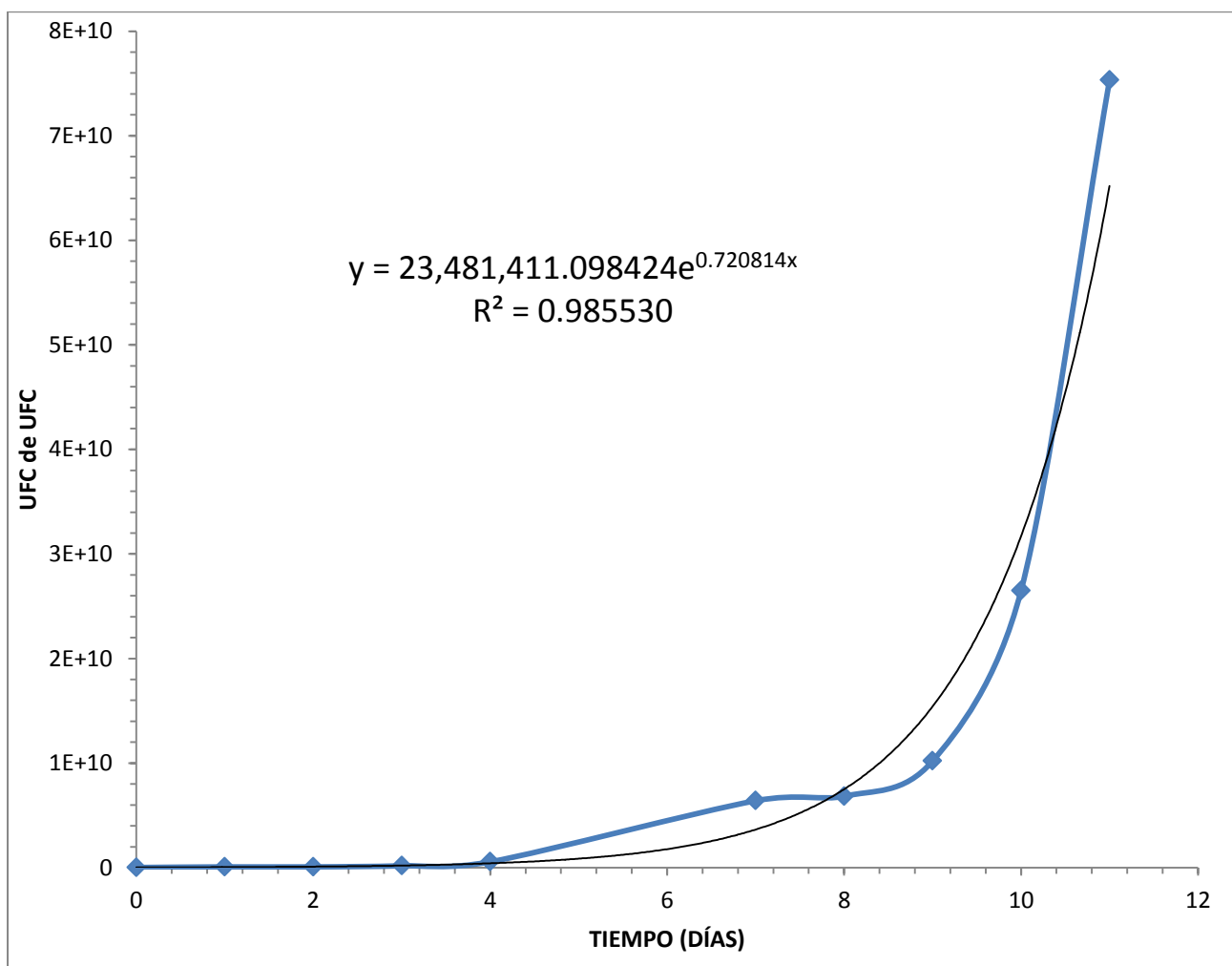
Donde Cp es la carga total calculada a partir del grafico 3.18, y Cti es la carga teórica que se esperaba obtener, para este caso la Cti equivale a 12866.66 C, que es igual a la utilizada en el primer inculo liofilizado utilizado por que se usaron las mismas condiciones de operación y solo se modifico el área de contacto, de tal modo que la eficiencia de este experimento es:

$$E_c = \frac{4392C}{12866.66C} \times 100 = 34.134\%$$

Si se compara la eficiencia de este experimento, con la obtenida en el primer inóculo liofilizado, y tomando en cuenta que se trataron de los mismos microorganismos y las mismas condiciones de operación, solo modificando el área de contacto, se puede deducir que la eficiencia de la MFC esta ligada al área de contacto de los electrodos.

3.5. PRIMER INOCULO DE LODOS ACTIVADOS

A diferencia de la cinética del inóculo liofilizado utilizado en los experimentos anteriores, la cinética de los lodos activados tuvo un tiempo mayor de crecimiento, un poco más del doble de los anteriores, ya que en los primeros dos experimentos utilizando inóculo liofilizado el tiempo para llegar a su máximo crecimiento es de 4 días, mientras que en los lodos activados el tiempo para llegar a su máximo crecimiento es de 11 días.



GRÁFICA 3.19. Cinética de crecimiento para el primer inóculo de lodos activados.

La cinética de los primeros lodos activados (gráfica 3.19) es más lenta si se compara con las obtenidas utilizando inóculo liofilizado, también se puede observar que la cantidad de UFC's obtenida en los lodos activados se incremento considerablemente de 2.8×10^9 a 7.5×10^{10} esto se debe a que los lodos activados contienen una variedad de microorganismos mucho mayor si se compara con el inóculo liofilizado.

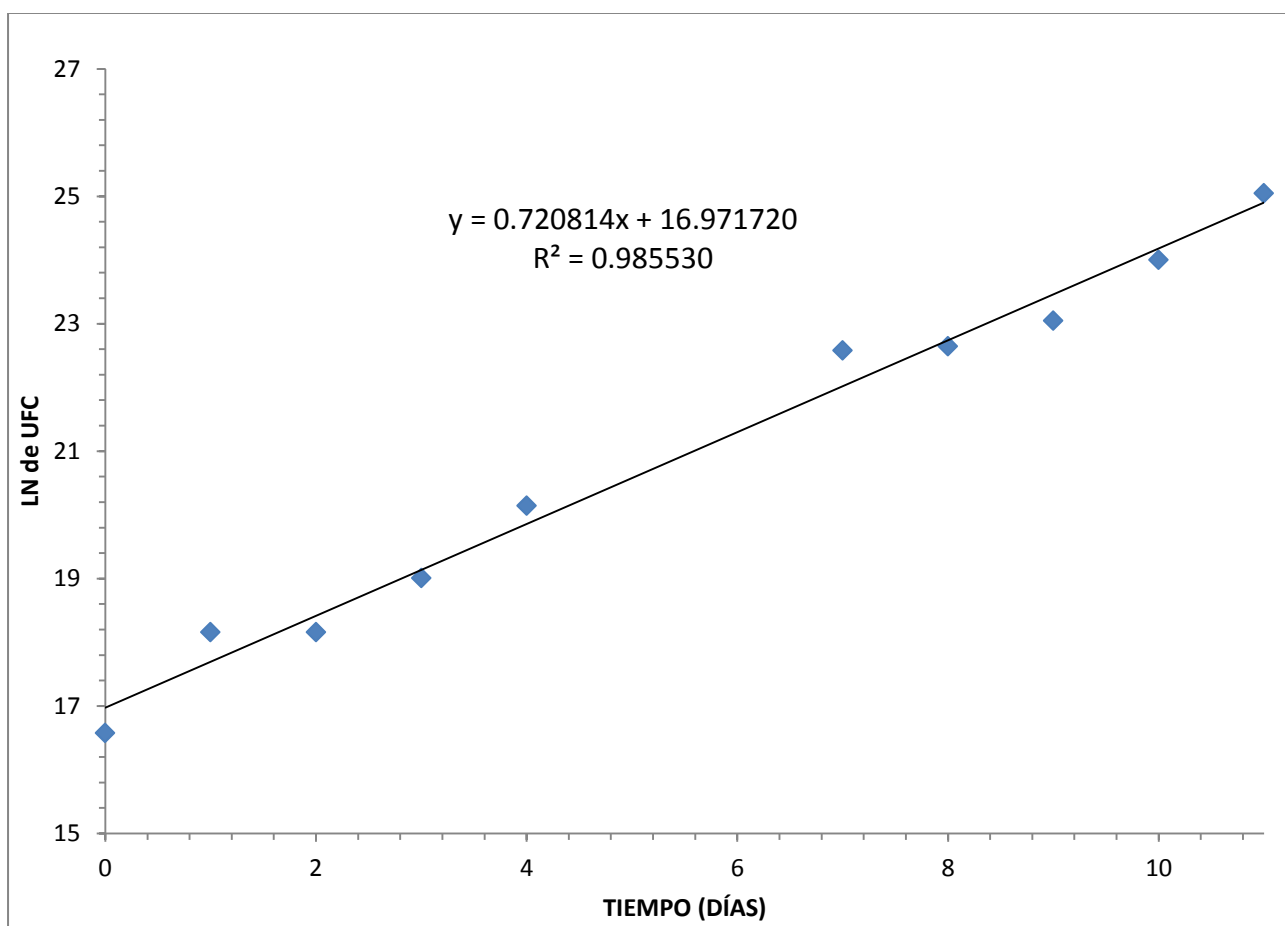
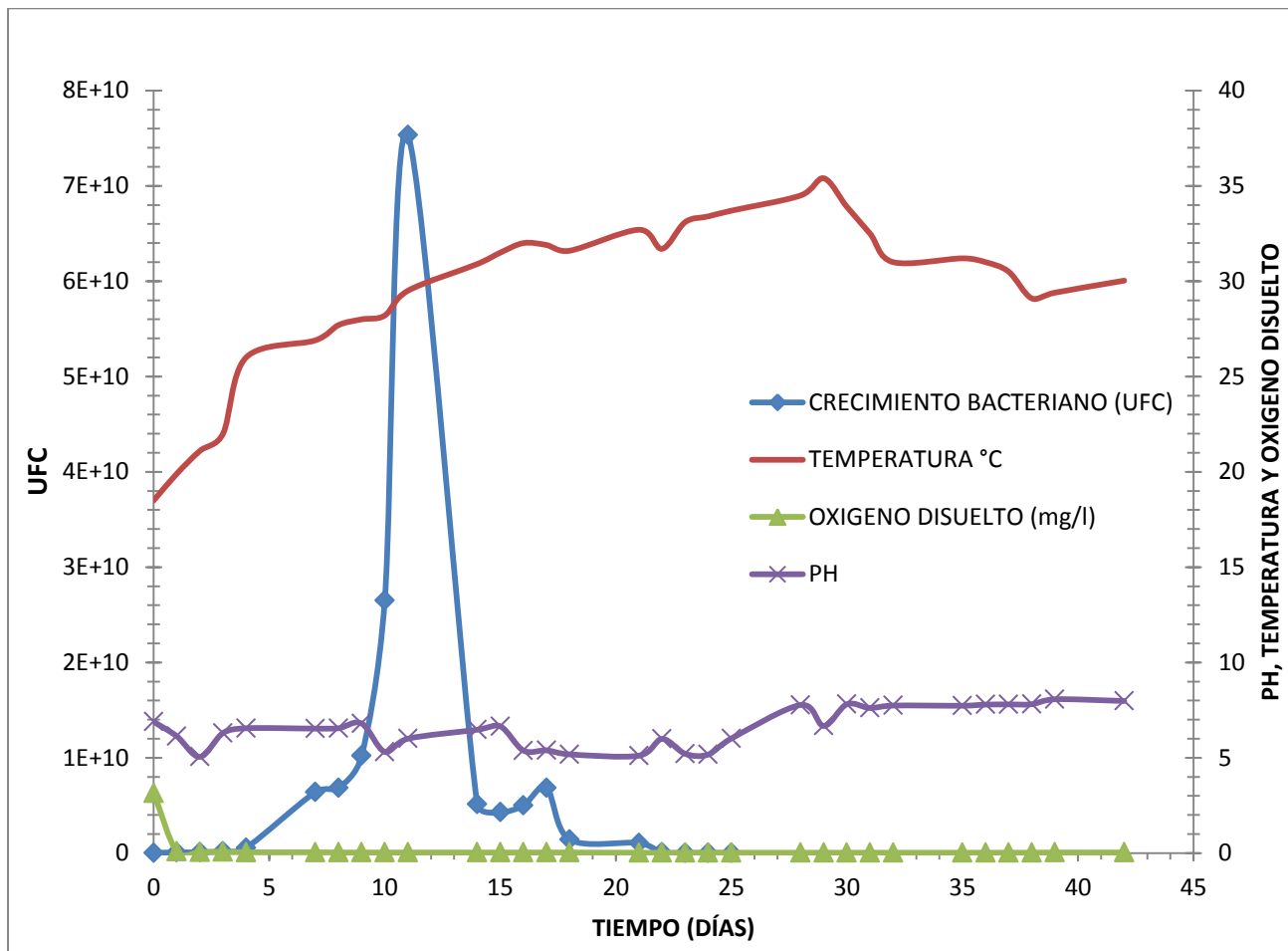


FIGURA 3.20. Gráfica semilogarítmico del primer inóculo de lodos activados

El gráfico semilogarítmico puede indicar la linealidad del crecimiento exponencial de los microorganismos usados, ya que la tendencia de crecimiento es semejante a una recta lineal, y se puede observar en la gráfica 3.20.

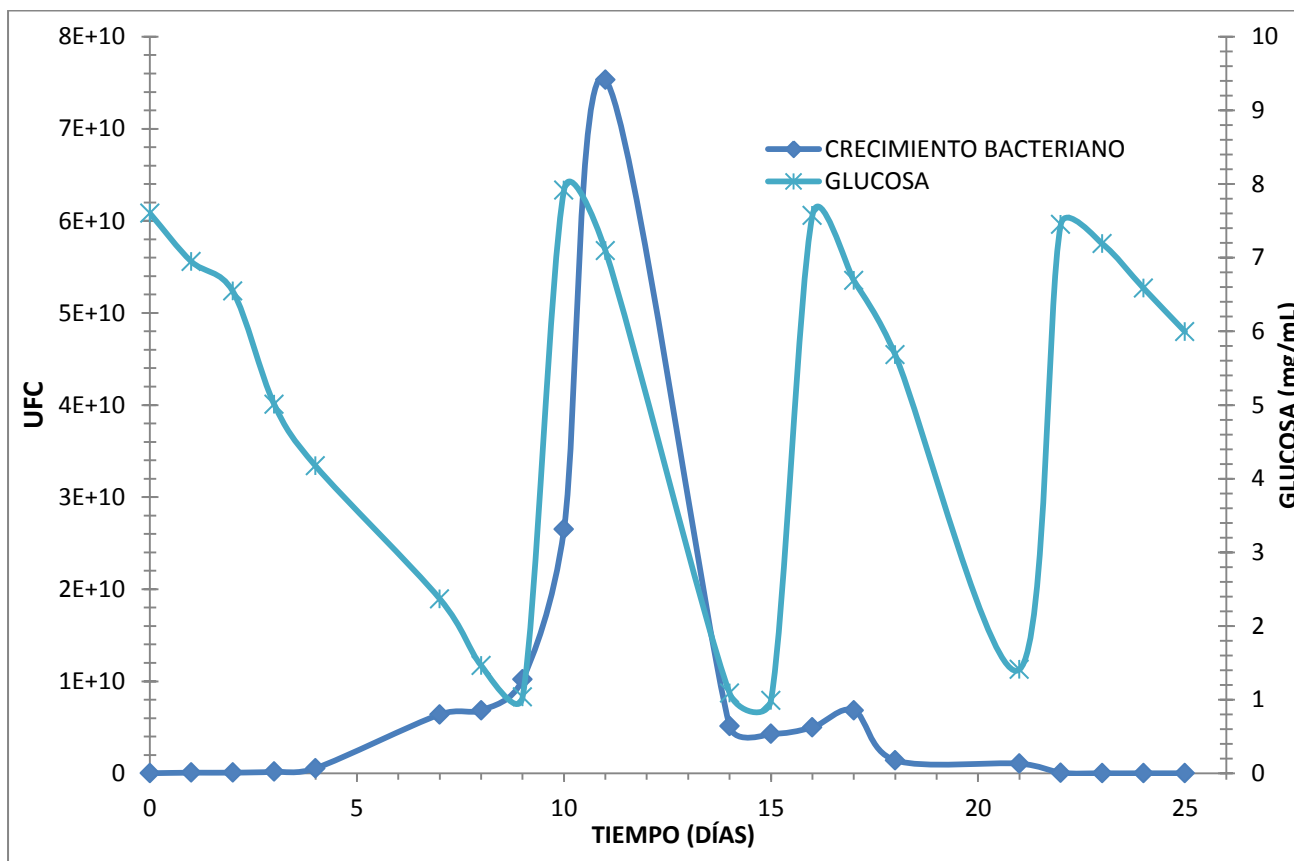
Las condiciones de operación de este experimento son similares a las utilizadas en los otros dos anteriores, el sistema se mantuvo sin oxígeno disuelto y con temperatura cercana a la mesófila para el óptimo crecimiento de los microorganismos y un pH de entre 6 y 7 (gráfica 3.21).

Si comparamos el gráfico 3.21 con el obtenido en los dos experimentos anteriores, se puede observar que las bacterias presentes en los lodos activados, presentan un crecimiento más lento y alargado que el obtenido en los resultados del inóculo liofilizado.



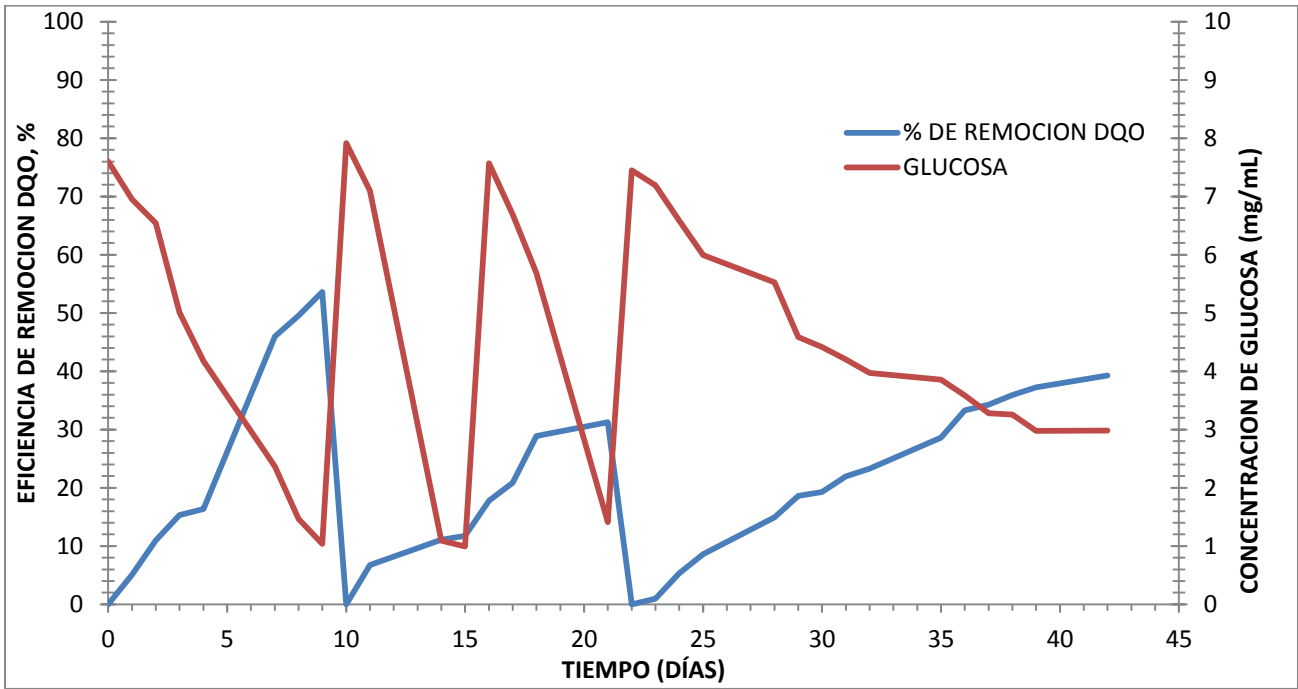
GRÁFICA 3.21. Crecimiento para el primer inóculo de lodos activados y las condiciones de operación.

En la gráfica 3.22 se puede observar el consumo de glucosa en el experimento de lodos activados 1, la glucosa fue monitoreada incluso cuando los microorganismos habían presentado un decremento importante en el conteo de UFC, esto se realizo para saber si las bacterias anaerobias también consumían la glucosa, y se encontró que si degradaban la glucosa.



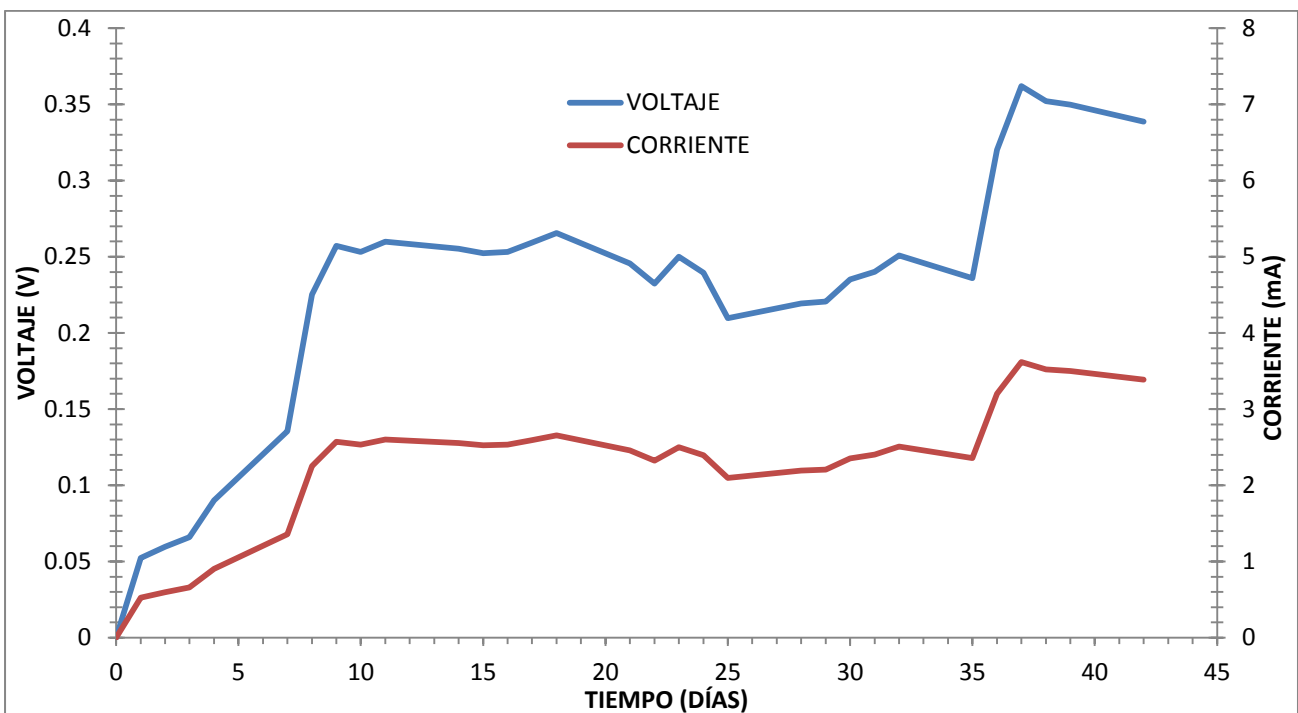
GRÁFICA 3.22. Consumo de sustrato en el primer inóculo de lodos activados.

En este experimento se monitoreo el consumo de glucosa y la eficiencia de remoción en función de la DQO, a diferencia del inóculo liofilizado (gráfica 3.15), se puede observar en la gráfica 3.23 las bacterias contenidas en los lodos activados en la fase donde se presenta el crecimiento aerobio facultativo (hasta el día 24), donde la eficiencia de remoción y el consumo de la glucosa son mas rápidas, pero después de que empieza el crecimiento anaerobio, la glucosa se consume mas lentamente, y también hay una remoción de DQO mas lenta.



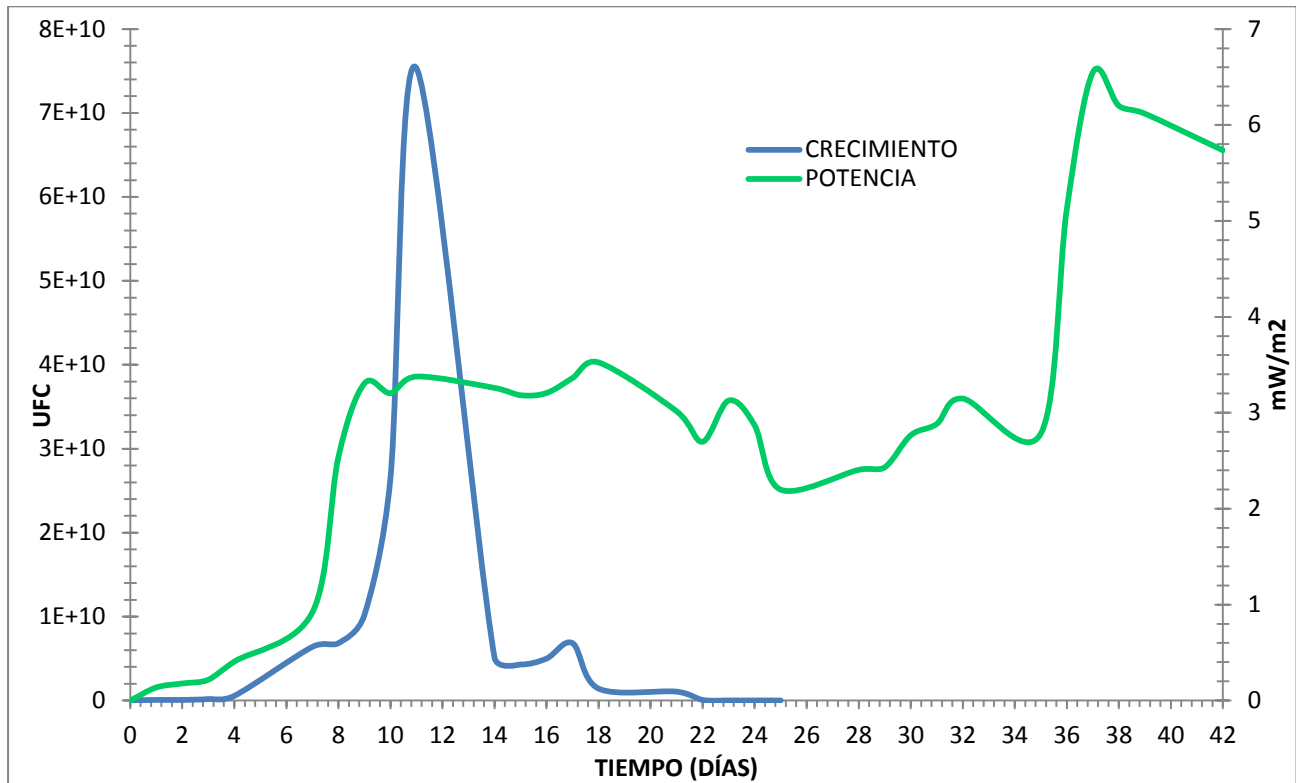
GRÁFICA 3.23. Consumo de sustrato y remoción de DQO en el primer inóculo de lodos activados.

El voltaje generado en este experimento con lodos activados (gráfica 3.24), se incrementó considerablemente si se compara con el que pudo generar el inóculo liofilizado, esto se puede suponer que es debido a que el lodo activado utilizado contiene una mayor cantidad y variedad de microorganismos que los que se encuentran en el liofilizado, por lo que hay una mayor posibilidad de encontrar bacterias que son capaces de producir corriente eléctrica, o de forma más eficiente.



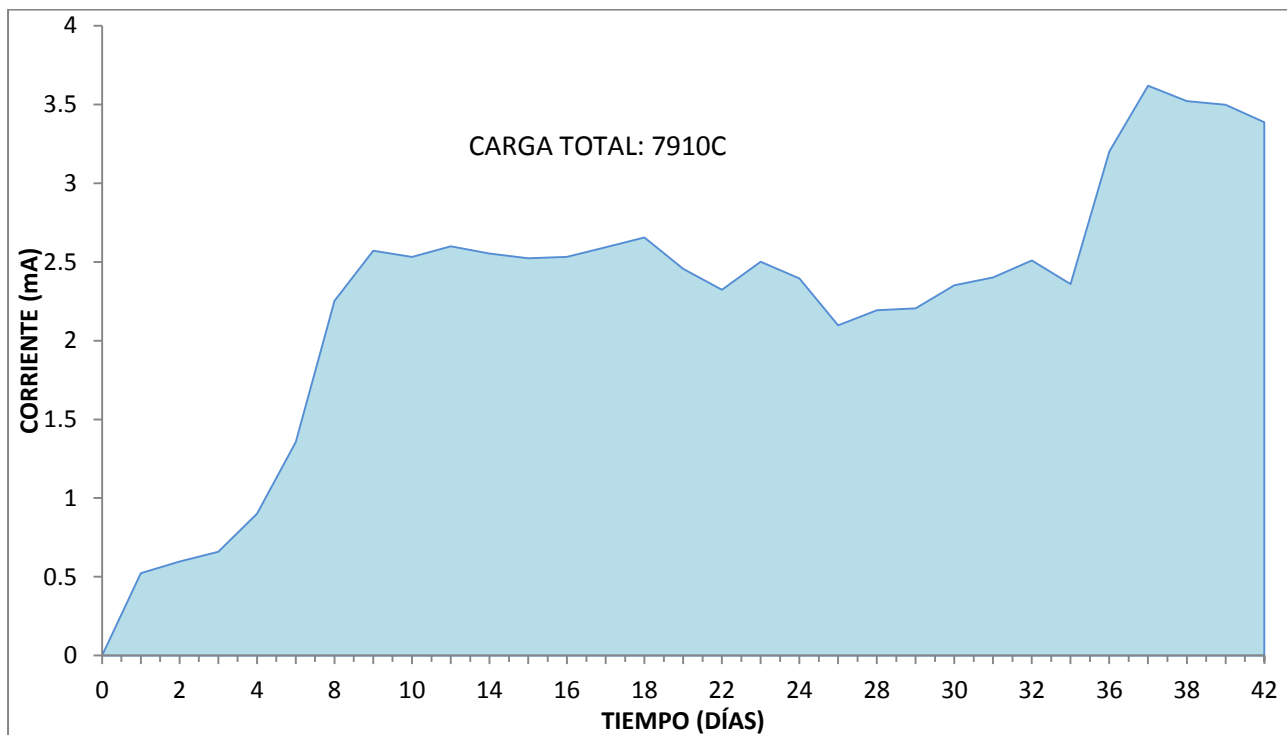
GRÁFICA 3.24. Generación de voltaje y corriente presentada en el primer inóculo de lodos activados.

La potencia generada en este experimento fue mucho mayor que la obtenida en los dos experimentos utilizando inóculo liofilizado y se puede observar en la gráfica 3.25, si embargo la mayor carga de potencia fue encontrada en los días en los cuales las UFC's ya habían reportado un valor menor al inicial, es decir las bacterias aerobias ya habían muerto y las que están produciendo la energía eléctrica son las bacterias anaerobias.



GRÁFICA 3.25. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del primer inóculo de lodos activados.

La potencia que se generó en este experimento fue mayor que en los anteriores, y al generar la gráfica de la carga total generada se obtuvo un número mayor de coulombs como lo muestra la gráfica 3.26.



GRÁFICA 3.26. Total de coulombs producidos del primer inóculo de lodos activados.

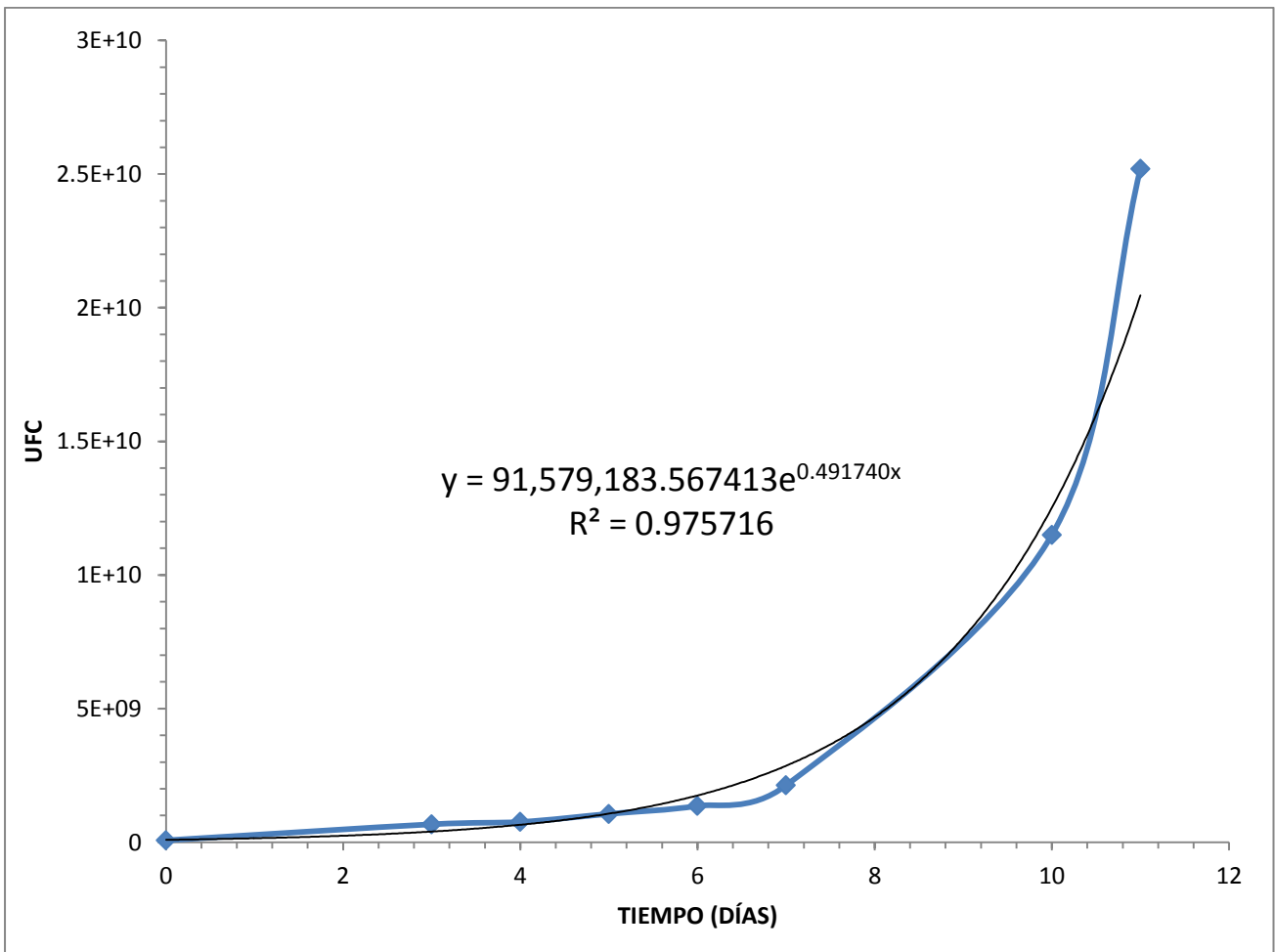
El total de coulombs generados a lo largo de la prueba es aproximadamente de 7910C (gráfica 3.26). Para este caso la C_{ti} equivale a 19300C, este valor teórico de coulombs generados es diferente al utilizado en el primer y segundo inóculo liofilizado, esto se debe a que en los primeros dos experimentos se utilizó un volumen igual de inóculo en la cámara anódica, pero en este caso el volumen se incrementó debido a que se aumentó el área de contacto de electrodos, de tal manera que la eficiencia de este experimento es:

$$E_c = \frac{7910C}{19300C} \times 100 = 40.98\%$$

Si se compara la eficiencia de este experimento, con la obtenida en los primeros dos inóculos liofilizados, y tomando en cuenta que se trataron de diferentes microorganismos y las mismas condiciones de operación, solo incrementando el área de contacto, se puede deducir que la eficiencia de la MFC está ligada al área de contacto de los electrodos y al tipo de microorganismos utilizados.

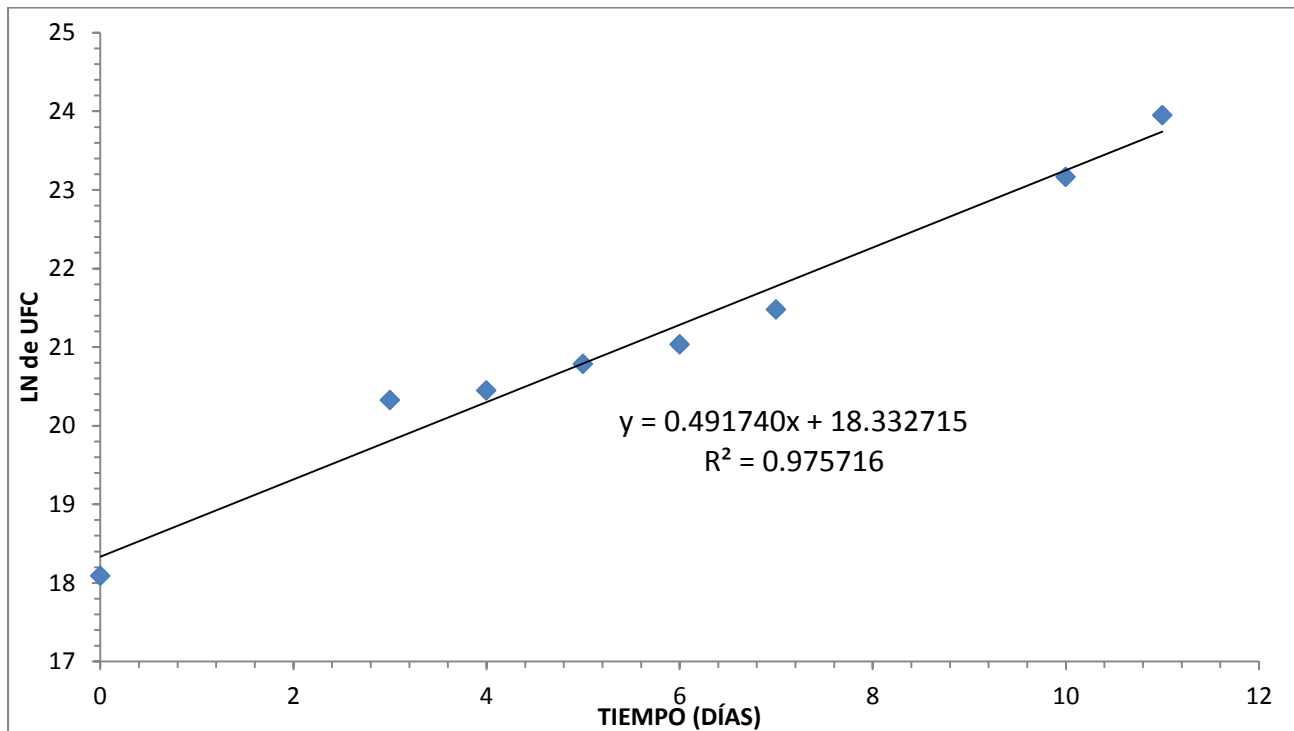
3.6. SEGUNDO INOCULO DE LODOS ACTIVADOS

En el caso del segundo experimento utilizando lodos activados, se trato de mantener las mismas condiciones de operación que se usaron en el primero, para hacer crecer el cultivo de microorganismos de igual manera, sin embargo la cinética mostrada en la gráfica 3.27 nos muestra que el crecimiento máximo se presento al día 11, al igual que el sistema montado anteriormente, pero hubo una diferencia en cuanto a las UFC's presentes en ese día, por lo que a pesar de tratar de tener las mismas condiciones de operación, los microorganismos presentes se vieron afectados en cuanto a su crecimiento y no se presento el mismo crecimiento que en el experimento pasado.



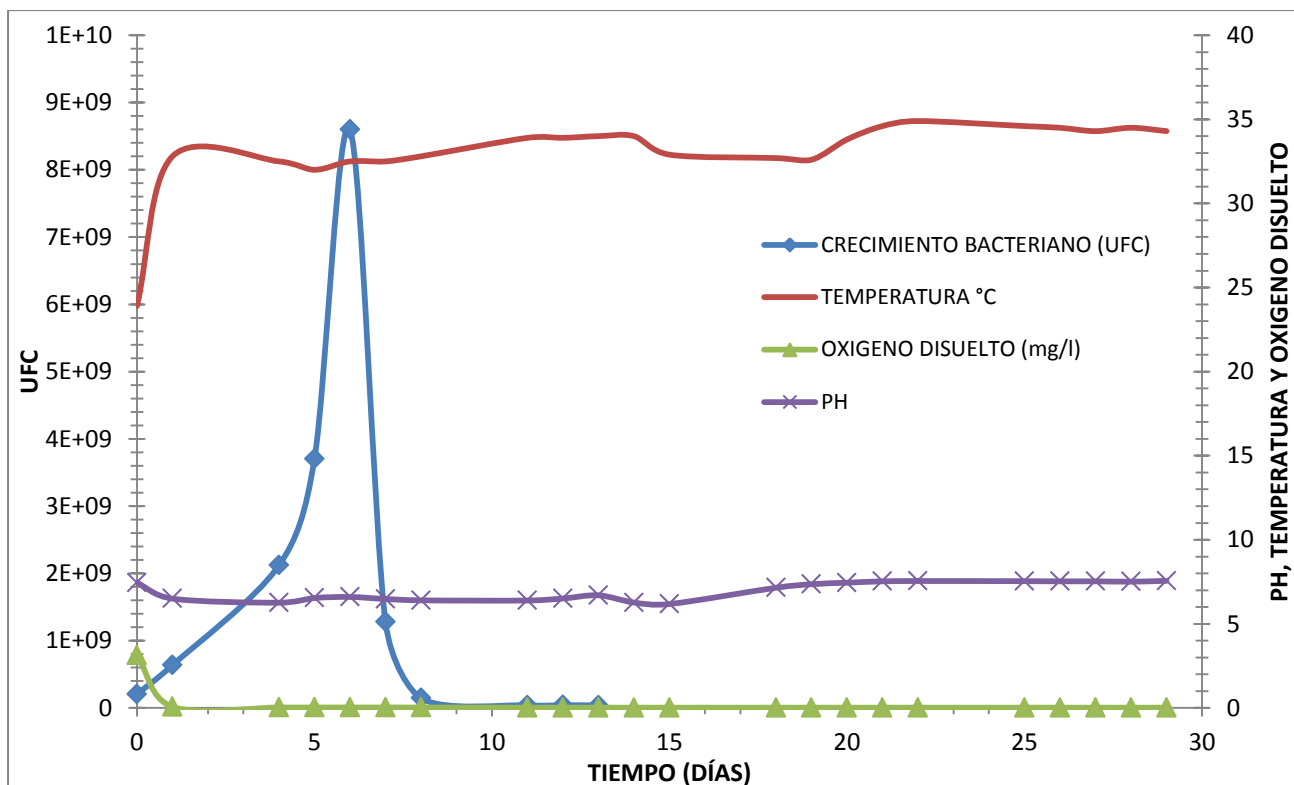
GRÁFICA 3.27. Cinética de crecimiento para el segundo inóculo de lodos activados.

En la grafica 3.28 se puede observar la linealidad del crecimiento de las bacterias contenidas en el segundo inóculo de lodos activados, esto se debe a que el crecimiento es del tipo exponencial.



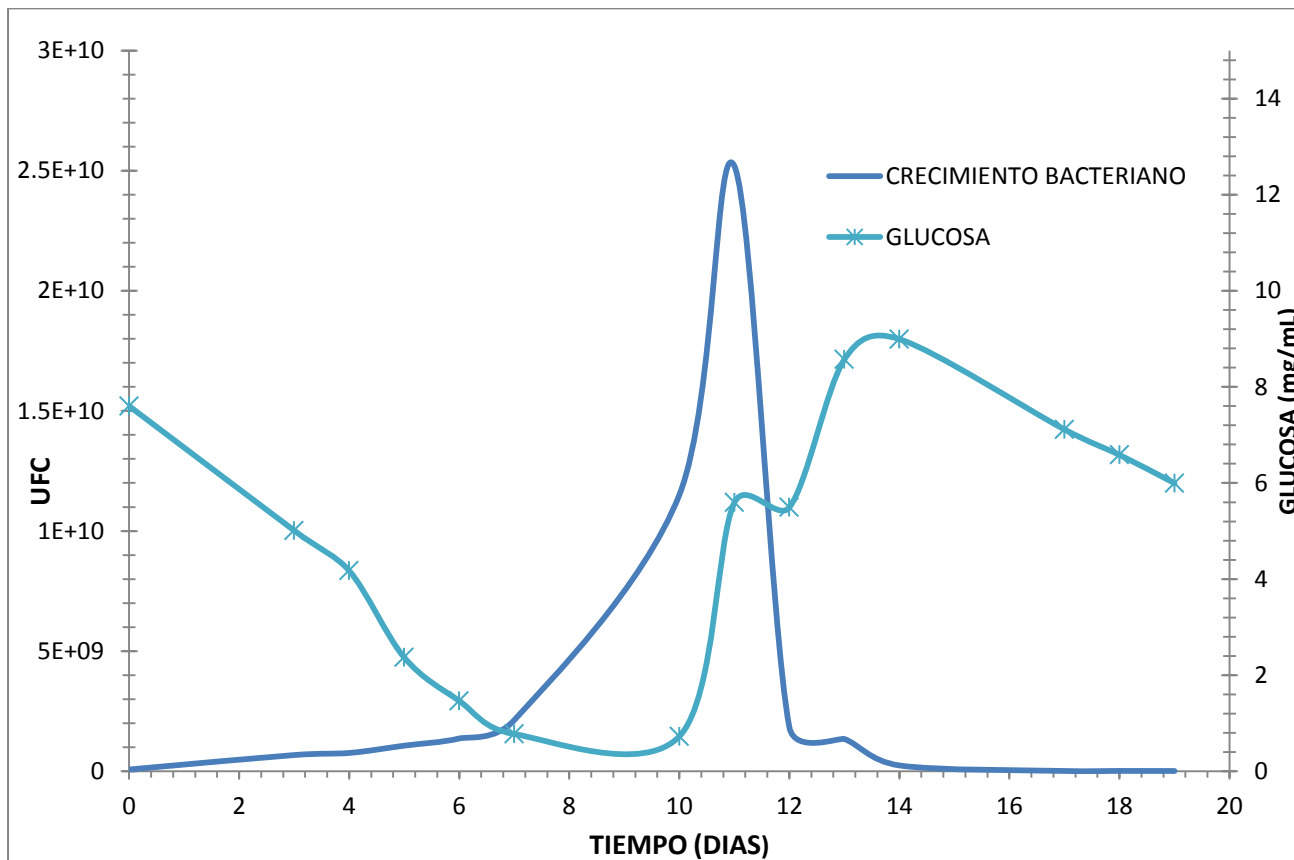
GRÁFICA 3.28. Gráfica semilogarítmica del segundo inóculo de lodos activados.

Las condiciones de operación de este sistema son muy similares a las utilizadas en el primer inóculo de lodos activados, sin embargo el crecimiento de los microorganismos no fue el mismo.



GRÁFICA 3.29. Crecimiento para el segundo inóculo de lodos activados y las condiciones de operación.

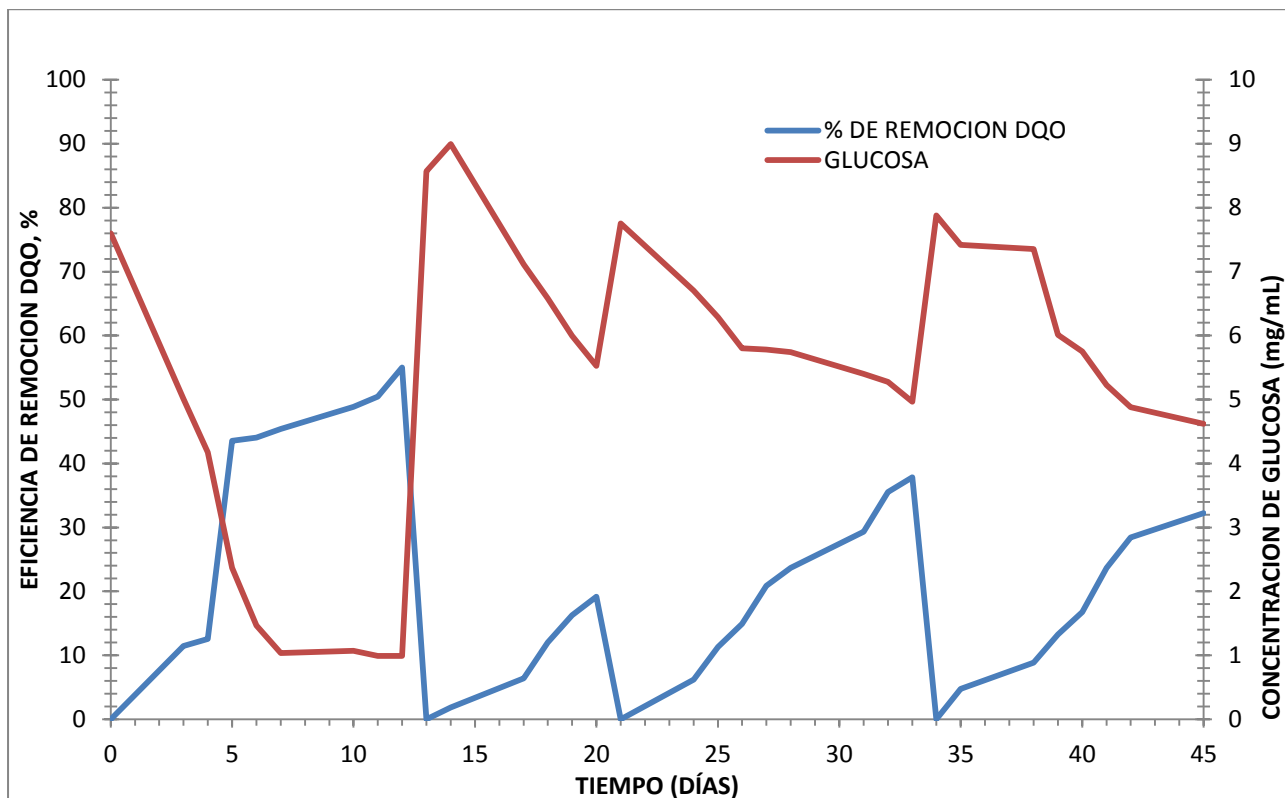
El consumo de sustrato se monitoreo a lo largo de la prueba, y a pesar de que la MFC contaba con glucosa disuelta en el sistema los microorganismos tendían a disminuir después de un tiempo.



GRÁFICA 3.30. Consumo de sustrato en el segundo inóculo de lodos activados.

En la gráfica 3.30 se puede observar que la concentración de glucosa disminuyó drásticamente en los primeros 10 días, lo cual indica un consumo mayor de las bacterias aerobias facultativas, aunque posiblemente se encuentren presentes también las bacterias anaerobias, el mayor consumo se puede decir que es por el incremento de las UFC's en los primeros días de la prueba, ya que después del día 12 la concentración de glucosa se mantuvo casi constante o con muy poco consumo, pero la potencia generada se produjo en este periodo de tiempo, lo que supone que las bacterias anaerobias son las que aportan la mayor cantidad de energía para lograr una mayor potencia.

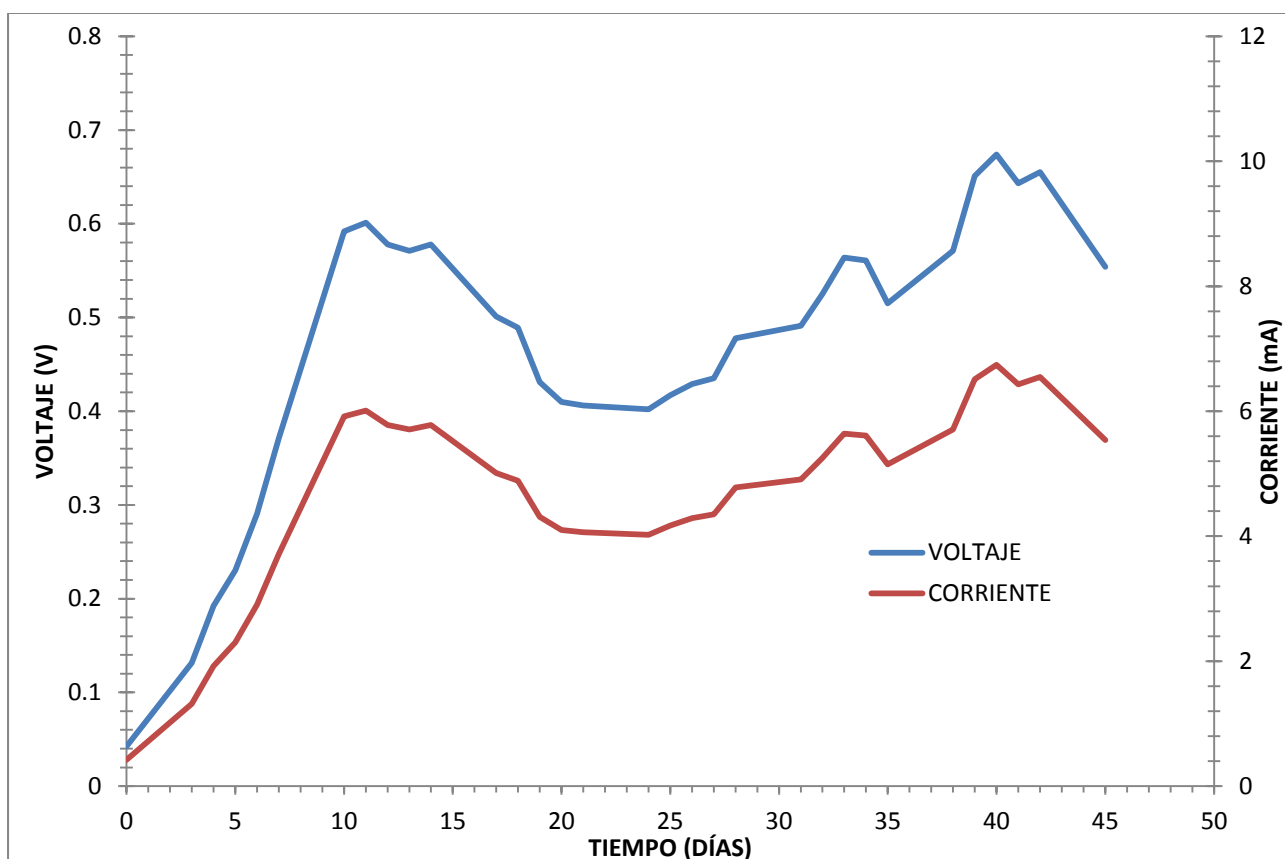
En este experimento se presento una remoción de DQO máxima de 55% lo que indica que los lodos activados no tienen una eficiencia de remoción alta, lo que implica que al medir la eficiencia de remoción no se logre alcanzar un valor alto, pero esto no afecta la producción de energía, ya que las bacterias presentes siguieron produciendo una diferencia de voltaje a través de la resistencia.



GRÁFICA 3.31. Consumo de sustrato y remoción de DQO en el segundo inóculo de lodos activados.

Las bacterias contenidas en los lodos activados usadas en los dos experimentos, removieron una carga mayor de DQO en los primeros días (de 9 a 12) y después de ese periodo de tiempo la concentración de glucosa no se vio muy afectada, es decir casi no disminuyo, en este caso, se puede ver con mayor claridad, ya que a partir del día 13 la concentración de glucosa no disminuyo mucho, por lo que se busco otra fuente de carbono para alimentar el cultivo, y se le agrego acetato.

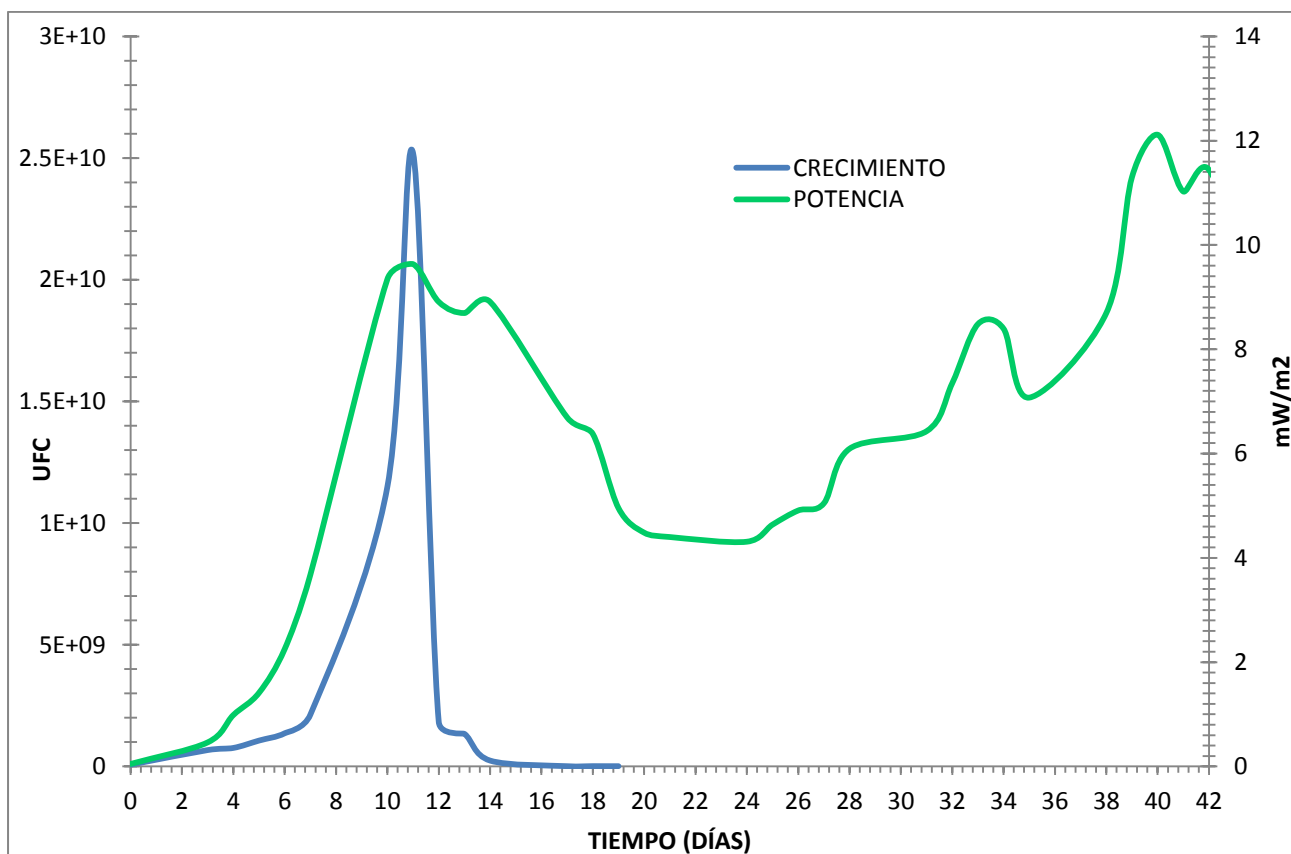
El voltaje generado por este experimento fue el mayor de todos los demás experimentos planteados en este trabajo, se logro obtener 0.6V en el día 11, el día que también se presento el mayor numero de UFC's, pero posteriormente cuando las bacterias aerobias terminaron su ciclo de vida se genero nuevamente un incremento de voltaje, logrando un máximo de 0.64V.



GRÁFICA 3.32. Generación de voltaje y corriente presentada en el segundo inóculo de lodos activados.

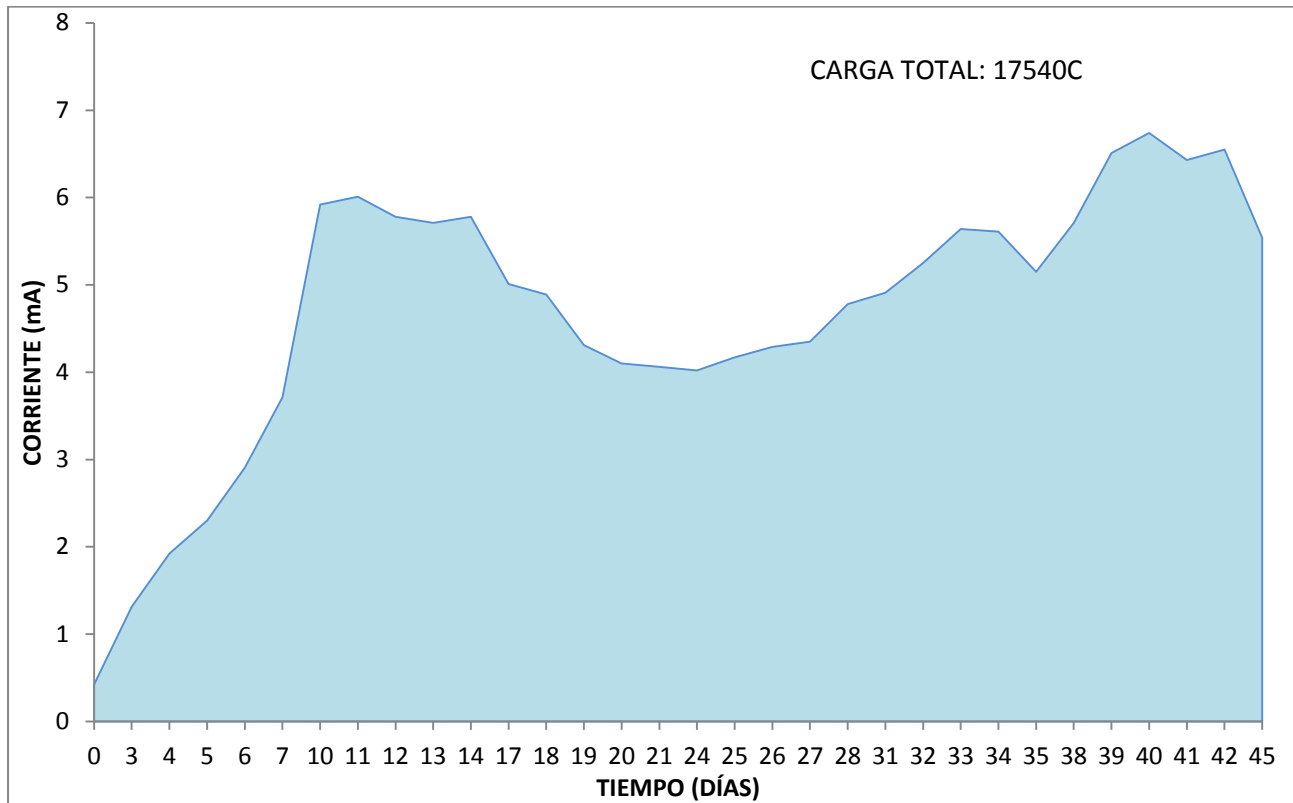
En este experimento se utilizaron 10 electrodos, por lo que el área de contacto se incremento y de igual manera se aumento la superficie donde puede crecer el biofilm, por lo que el voltaje se vio incrementado si lo comparamos con el experimento anterior.

La potencia que se genero en este experimento se incremento conforme las UFC's se incrementaban, pero cuando los microorganismos llegaron a la fase final de su ciclo de vida la potencia se vio afectada y bajo de forma considerable, pero cuando las bacterias anaerobias fueron creciendo y desarrollándose en le MFC la potencia se incremento he incluso supero a la que se cree se genero por las bacterias aerobias, de esta manera podemos decir que las bacterias anaerobias son mejores productoras de energía.



GRÁFICA 3.33. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano del segundo inóculo de lodos activados.

La potencia que se genero en este experimento fue mayor que en los anteriores, y al generar la gráfica de la carga total generada se obtuvo un número mayor de coulombs como lo muestra la gráfica 3.34.



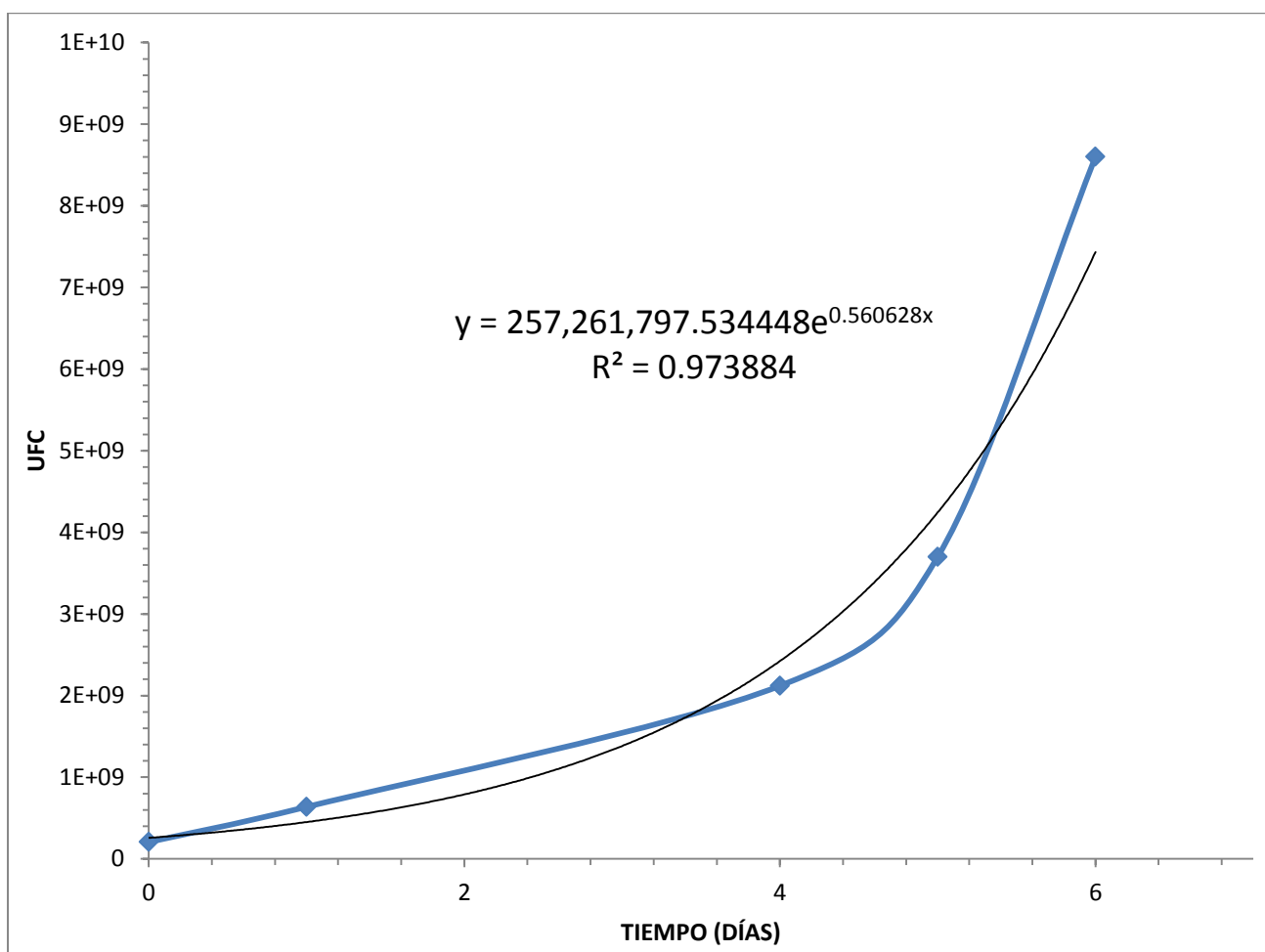
GRÁFICA 3.34. Total de coulombs producidos del segundo inoculo de lodos activados.

El total de coulombs generados a lo largo de la prueba es aproximadamente de 17540C (gráfica 3.34). Para este caso la C_{ti} equivale a 25733.33, este valor teórico de coulombs generados también es diferente al utilizado en el primer inoculo de lodos activados y al primer y segundo inoculo liofilizado, esto se debe a que se modificó el valor del volumen de inoculo utilizado en la cámara anódica, de tal manera que la eficiencia de este experimento es:

$$E_c = \frac{17540C}{25733.33C} \times 100 = 68.16\%$$

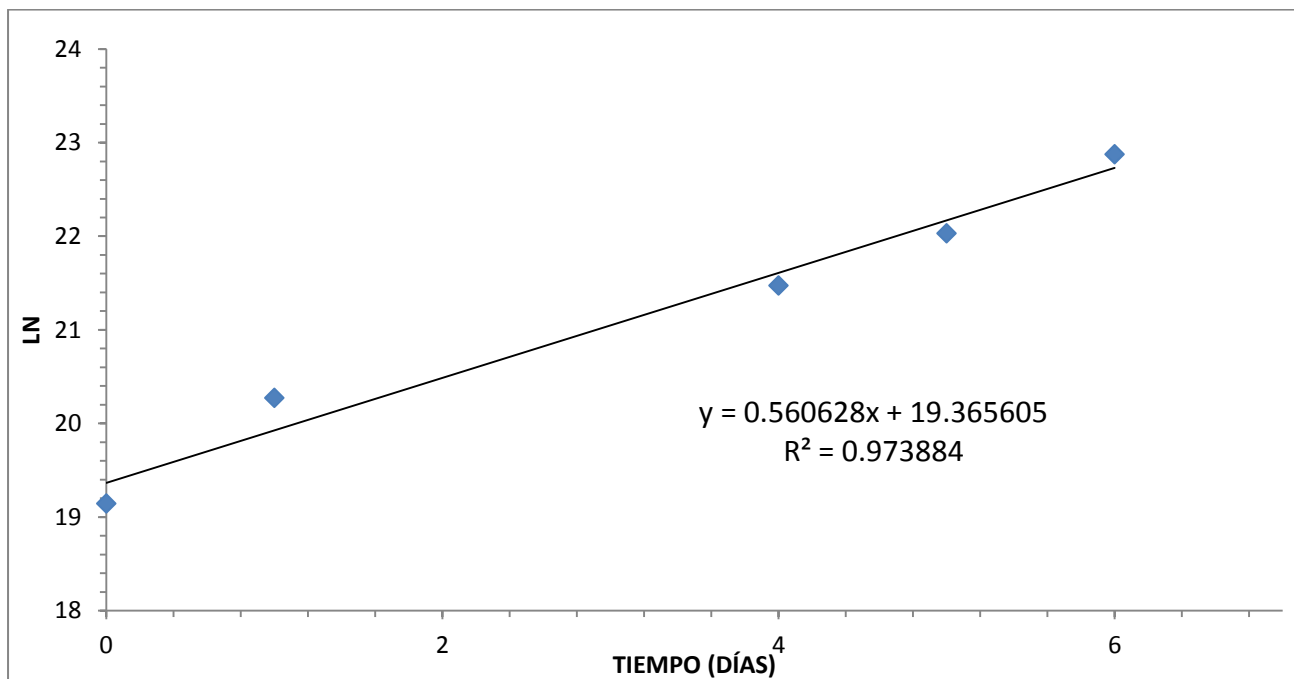
3.7. CEPA ESCHERICHIA COLI ATCC 25922

Para realizar este último experimento se aisló la cepa de *Escherichia coli*, y se le hicieron las pruebas de oxidasa y catalasa para asegurar que la cepa estuviera pura, dando los siguientes resultados: Oxidasa, dando como resultado negativo, y Catalasa, dando como resultado positivo; posteriormente se puso en caldo nutritivo para su crecimiento, después se agregó a la MFC en las mismas condiciones que los experimentos anteriores tratando de no contaminar el sistema para no promover el crecimiento de algún otro tipo de microorganismo. Sin embargo si comparamos la cinética de esta cepa con las demás obtenidas, fue la que presentó el menor crecimiento.



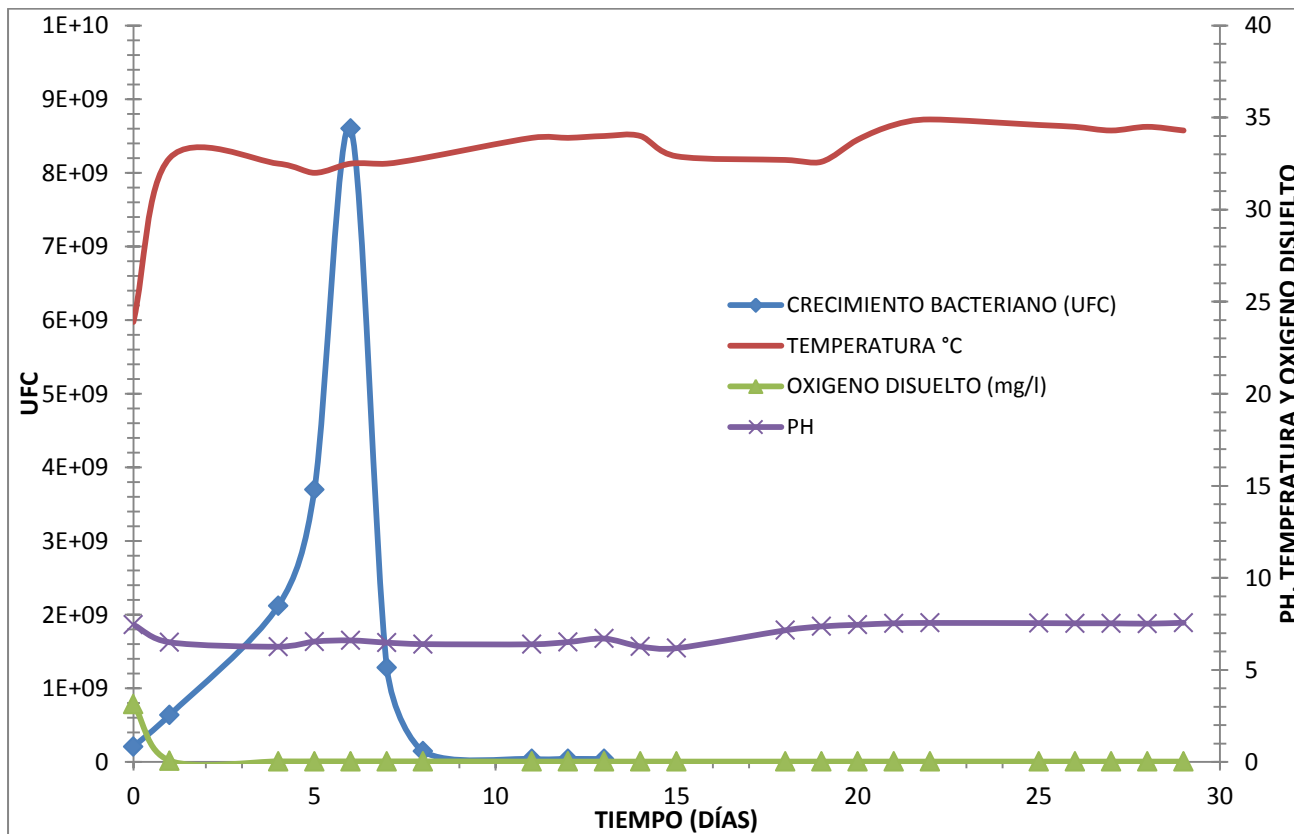
GRÁFICA 3.35. Cinética de crecimiento para *Escherichia coli*.

La gráfica semilogarítmica obtenida de la cepa de *Escherichia coli*, al igual que los experimentos anteriores presenta un crecimiento exponencial, y lo podemos observar en la gráfica 3.36.



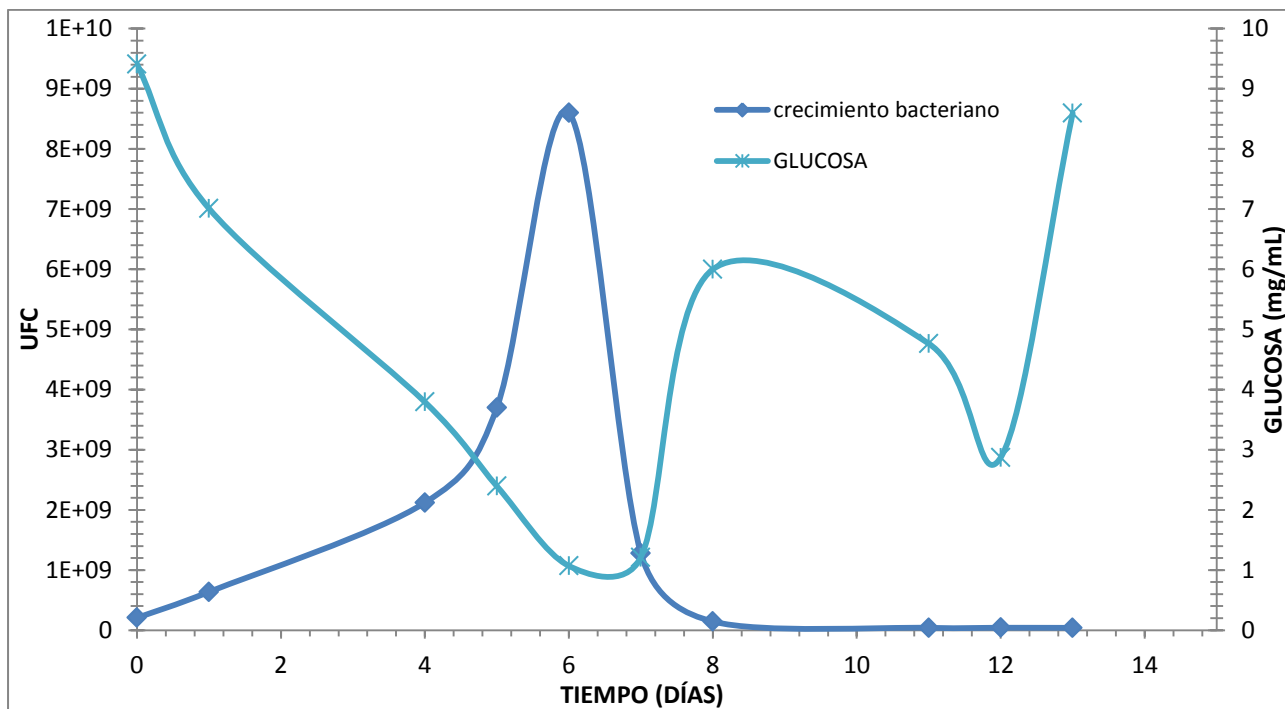
GRÁFICA 3.36. Gráfica semilogarítmico de la Escherichia coli.

Las condiciones de operación se muestran en la figura 3.37, se trato de mantener las mismas condiciones para poder comparar los resultados obtenidos en este experimento con los obtenidos en los otros cuatro anteriores.



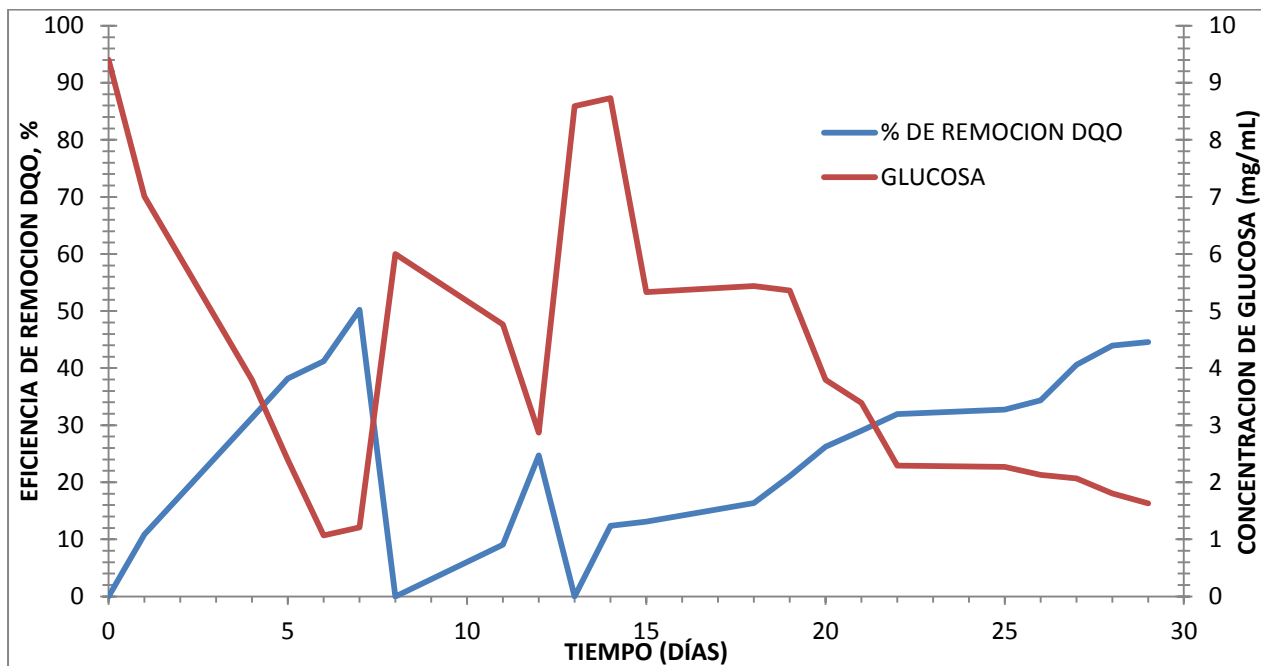
GRÁFICA 3.37. Crecimiento para la cepa de Escherichia coli y las condiciones de operación.

El consumo de glucosa se monitoreo todos los días de la prueba, y se le agrego más glucosa cuando se detecto un nivel bajo de concentración de glucosa disuelta en el sistema.



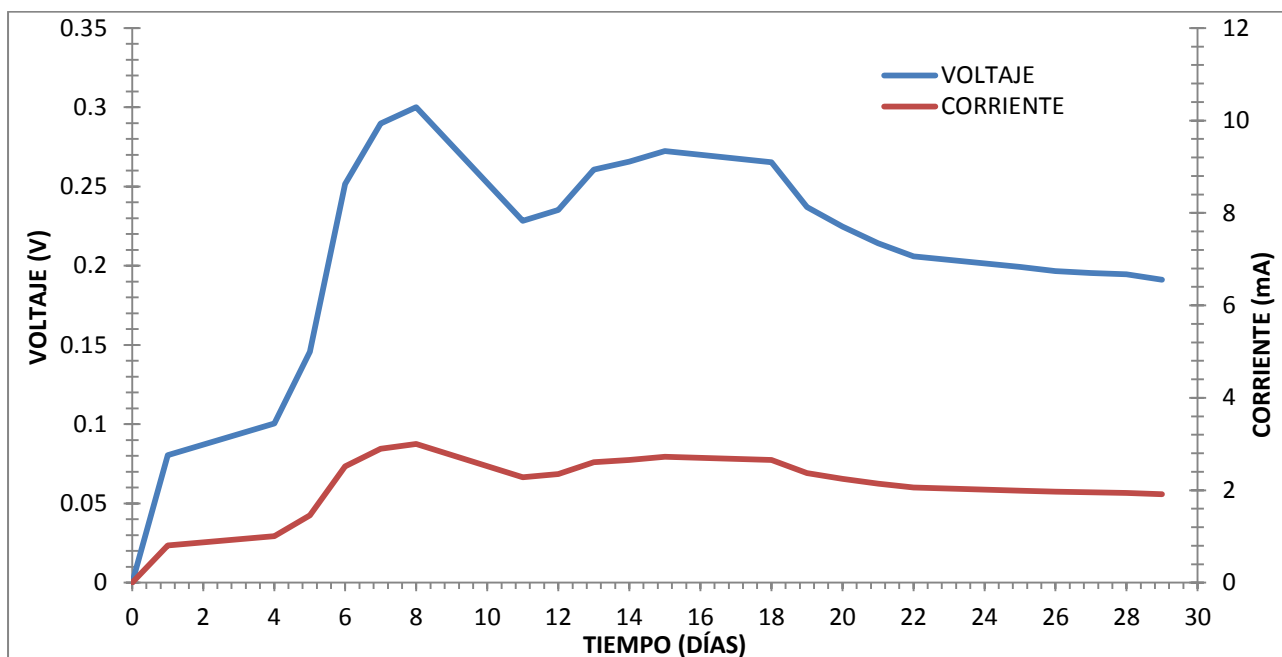
GRÁFICA 3.38. Consumo de sustrato en la cepa de *Escherichia coli*.

La cepa de *Escherichia coli* no fue capaz de remover una gran cantidad de DQO, esto se puede observar en la figura 3.39. El consumo de glucosa en los primeros días de la prueba fue más rápido, pero al pasar los días este comportamiento se fue modificando, ya que se volvió más lento, y el porcentaje de remoción de DQO, fue más lento.



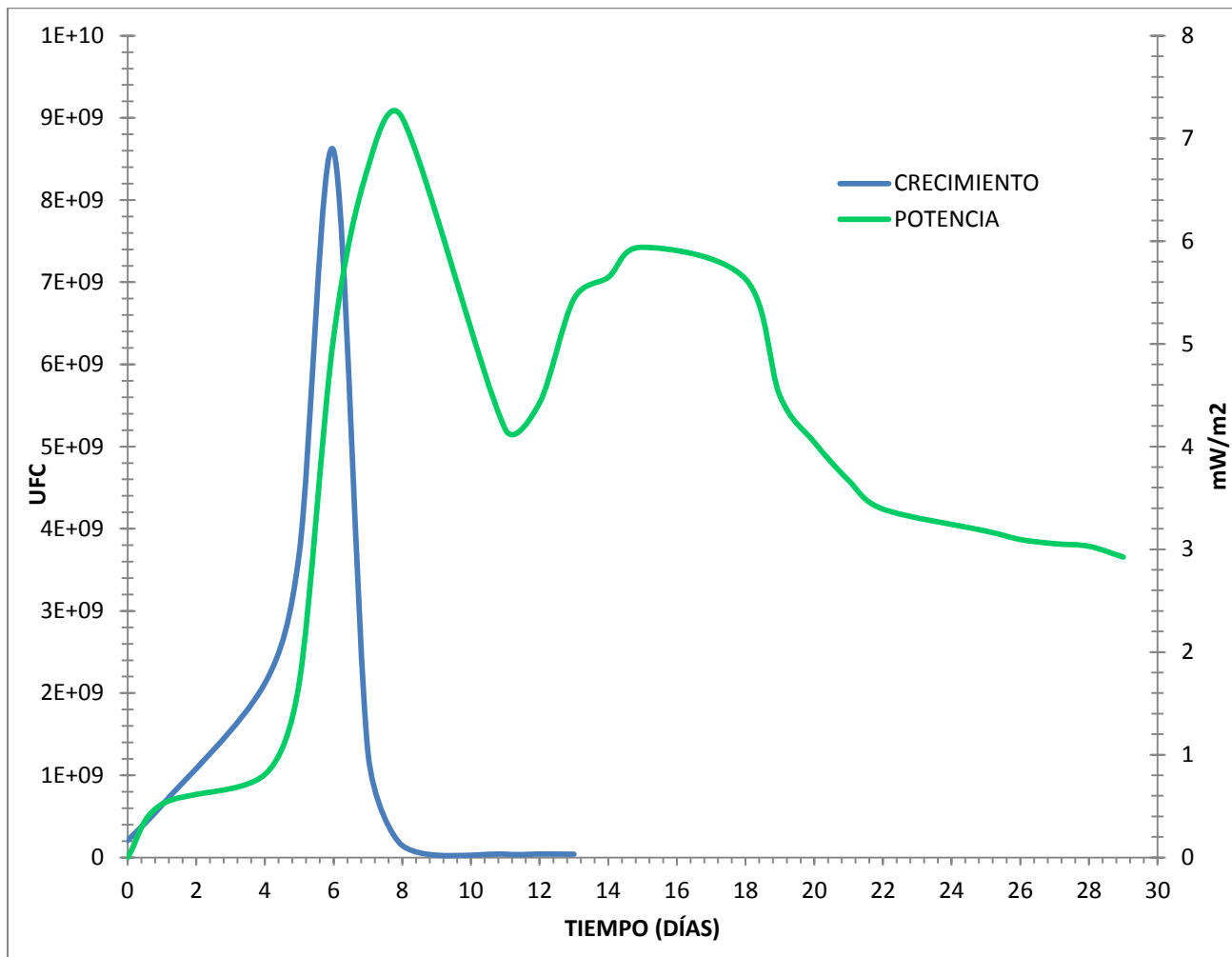
GRÁFICA 3.39. Consumo de sustrato y remoción de DQO en la cepa de *Escherichia coli*.

El voltaje se vio afectado por el bajo crecimiento de la cepa, ya que solo alcanzó un máximo de 0.3V en el día 8 de la prueba, y cabe destacar que para ese día las UFC's ya habían reportado un decremento y se considera empezaba el crecimiento anaerobio.



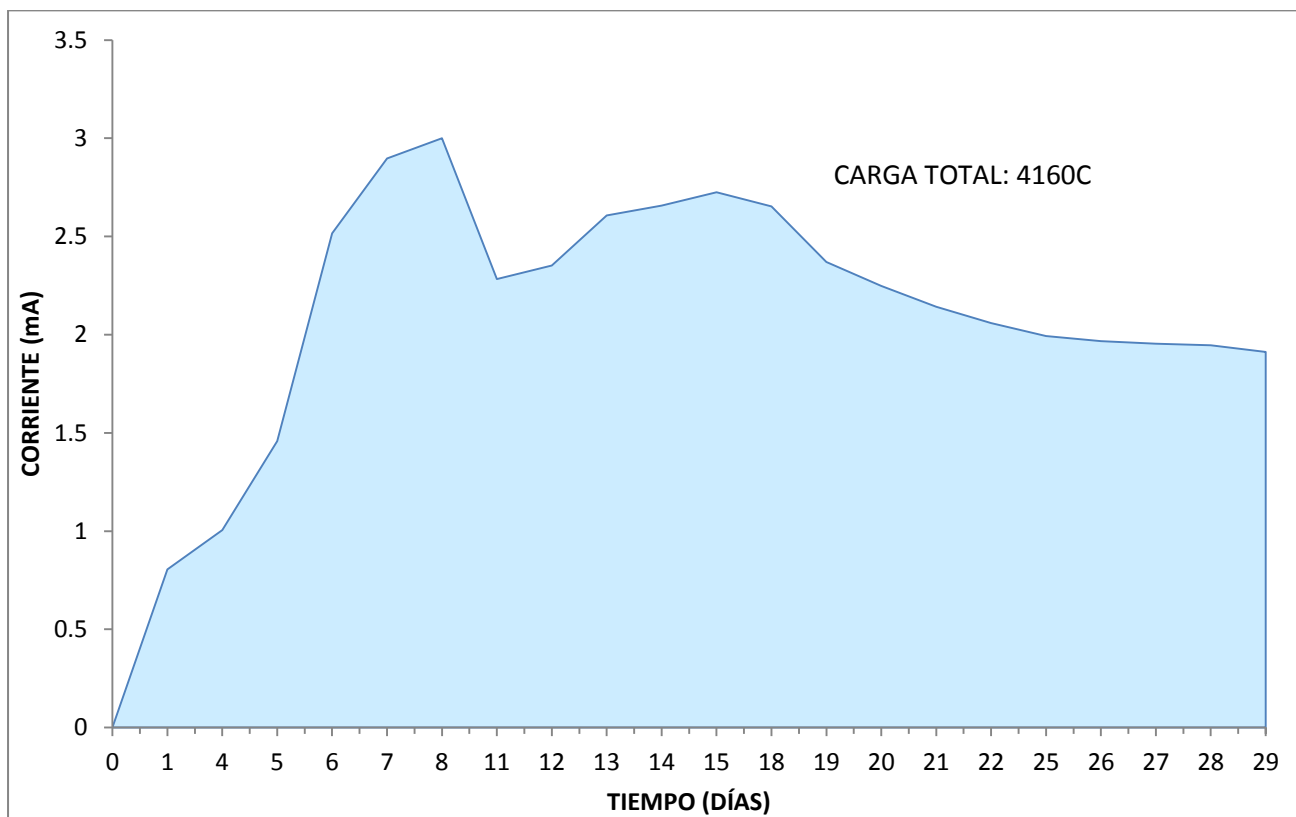
GRÁFICA 3.40. Generación de voltaje y corriente presentada en la cepa de *Escherichia coli*.

Como en los experimentos anteriores la mayor potencia que se reporto fue en los días de crecimiento anaerobio, y esto se puede observar en la figura 3.41 donde en la fase de crecimiento de UFC's se ve un incremento de la potencia pero disminuye en los días en los cuales ocurre la muerte celular de la cepa de *Escherichia coli*, y después se vuelve a incrementar en los días en los que se presenta el crecimiento anaerobio.



GRÁFICA 3.41. Potencia generada comparada con el crecimiento bacteriano en la cepa de *Escherichia coli*.

La cantidad de coulombs generados en este experimento se ilustra en la figura 3.42, y la carga total en los 29 días de la prueba fue de 4160C.



GRÁFICA 3.42. Total de coulombs producidos en la cepa de *Escherichia coli*.

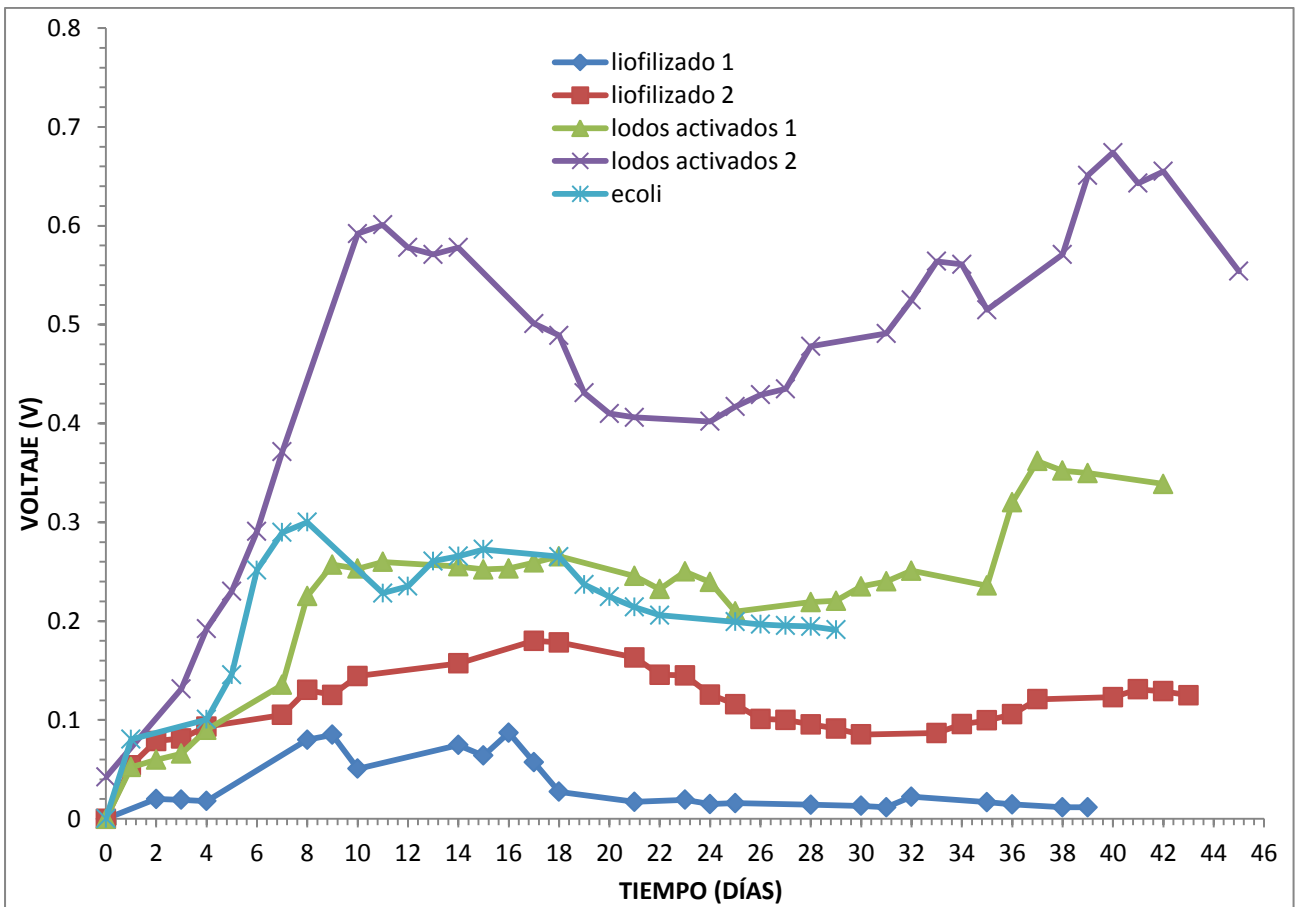
El total de coulombs generados a lo largo de la prueba es aproximadamente de 4160C (figura 3.42). Para este caso la C_{ti} equivale a 21866.66C, este valor teórico es igual al utilizado en los primeros dos experimentos ya que se usó el mismo volumen de inóculo y se mantuvo las mismas condiciones de operación que en los experimentos anteriores, de tal manera que la eficiencia de este experimento es:

$$E_c = \frac{4160C}{12866.66C} \times 100 = 32.33\%$$

Como se puede observar la eficiencia de este inóculo es menor a la obtenida en los lodos activados, esto puede ser porque solo se trata de una sola bacteria y no un consorcio microbiano.

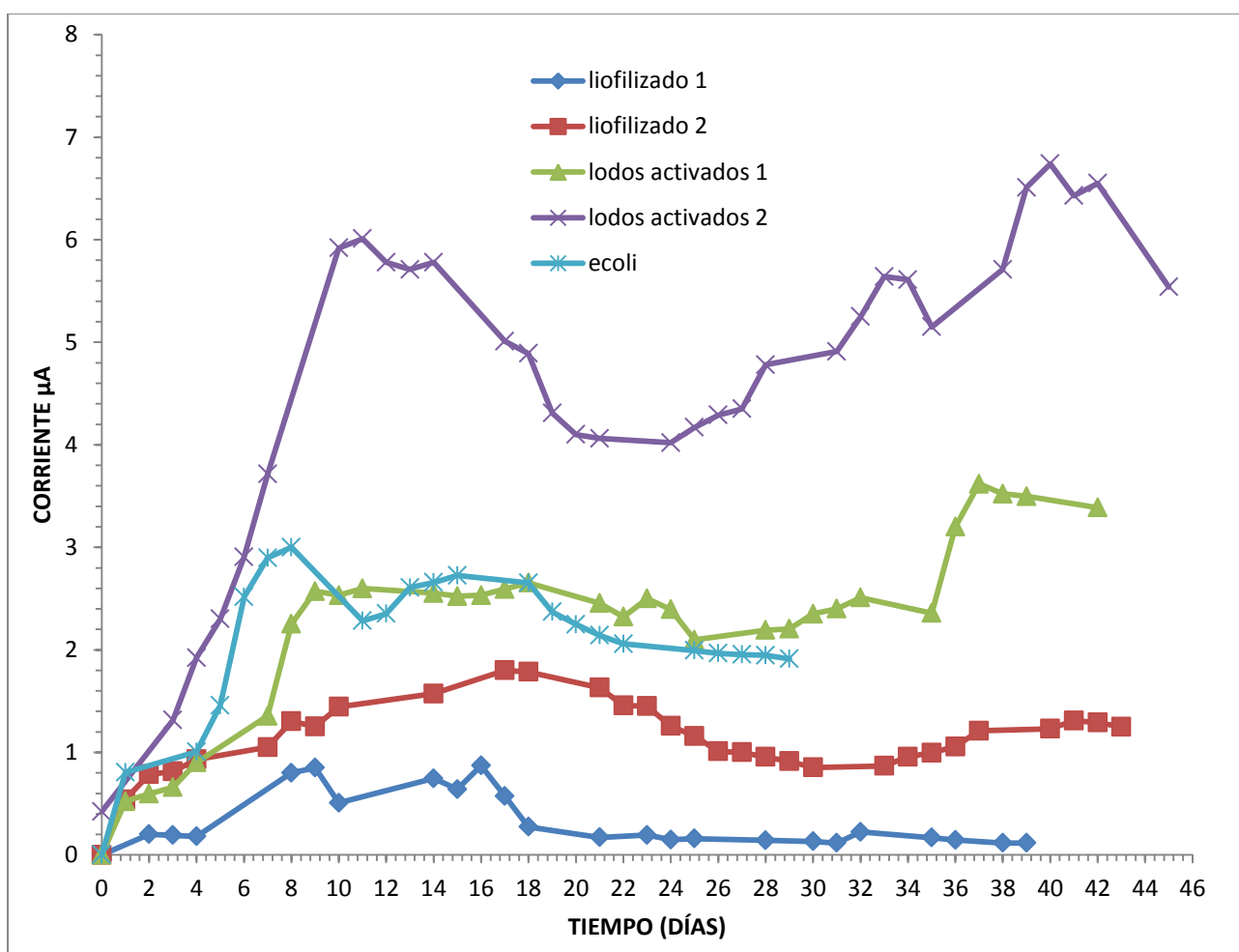
3.8. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Si comparamos las gráficas de voltaje obtenidas nos podemos dar cuenta que la MFC que funciono con el inoculo de lodos activados fue la que genero una mayor potencia y voltaje, también se puede observar que la generación de energía esta ligada al área de contacto con de electrodos, ya que al aumentar el numero de electrodos se genero un mayor voltaje, esto se puede apreciar si comparamos los inóculos liofilizado en ambos experimentos y lodos activados también en ambos experimentos, el voltaje va aumentando (gráfica 3.43).



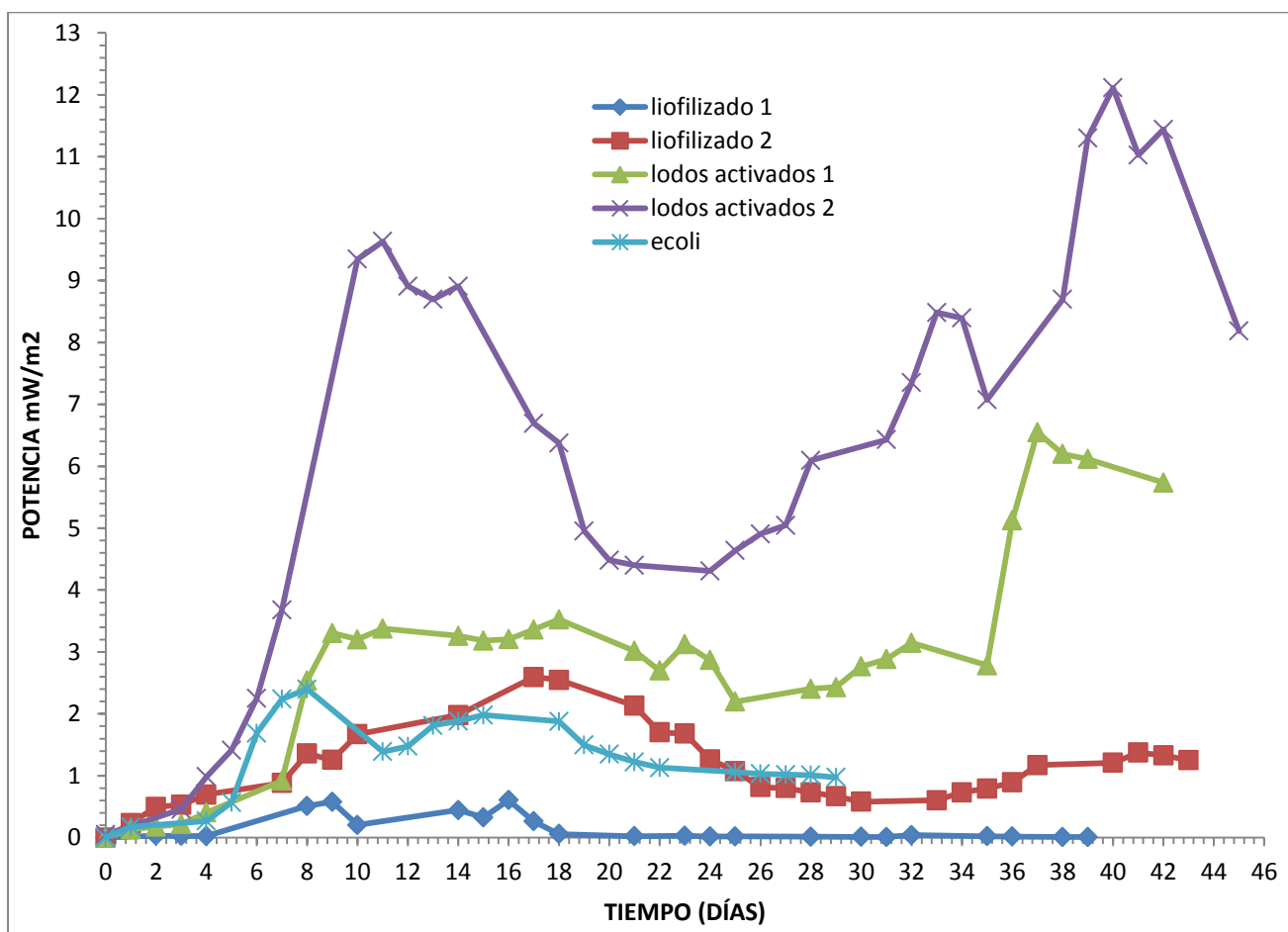
GRÁFICA 3.43. Generación de voltaje de los inóculos utilizados.

Al comparar la densidad de corriente obtenida en los cinco experimentos, se puede observar que la mayor generada fue por el inóculo de lodos activados, en el caso donde se usaron 10 electrodos (línea morada) y se incremento el área de contacto, se puede apreciar que se incremento la corriente si se compara con el primer experimento con lodos activados (línea verde). De igual manera se puede ver que la cepa de *Escherichia coli* genero una densidad de corriente con tendencia similar a el primer experimento de lodos activados, solo que la cepa de *Escherichia coli* conto con 10 electrodos y los lodos activados con 6.



GRÁFICA 3.44. Generación de corriente de los inóculos utilizados.

La mayor potencia generada fue reportada por el inóculo de lodos activados donde se usaron 10 electrodos, pero al reportar la potencia por unidad de área, en los experimentos donde se usaron un número mayor de electrodos la potencia generada se ve afectada, tal es el caso de la cepa de *Escherichia coli* (línea azul claro), que genero un valor de voltaje y corriente mayor al de los dos experimentos usando inóculo liofilizado (línea azul marino y rojo), pero al usar una área mayor de contacto la potencia disminuyo.



GRÁFICA 3.45. Generación de potencia por unidad de área de los inóculos utilizados.

Al mostrar los cinco experimentos vistos en este trabajo, se puede deducir que la eficiencia de una MFC esta ligada a varios factores como al área de contacto de los electrodos, entre una mayor área una mayor producción de energía, y al tipo de inculo utilizado, ya que los lodos activados contienen una gran diversidad de microorganismos que pueden aportar una mayor cantidad de conversión de sustrato en energía eléctrica, esto se puede observar en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Tabla comparativa de los experimentos realizados.

Inoculo o cultivo utilizado	Sustrato empleado	Eficiencia (%)	Electrodos usados	Potencia máxima (mW/m ²)	Crecimiento máximo aerobio (UFC)	Crecimiento máximo anaerobio (celulas/mL)
Liofilizado 1	Glucosa	8.11	2	0.60	2893333333	S/N
Liofilizado 2	Glucosa	34.13	4	2.59	2850000000	10 ⁻⁸
Lodos activados 1	Glucosa/Acetato de sodio	40.98	6	6.54	7533333333	10 ⁻¹²
Lodos activados 2	Glucosa/Acetato de sodio	68.16	10	12.11	2520000000	10 ⁻¹⁵
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Glucosa	32.33	10	2.4	8600000000	10 ⁻¹⁰

De acuerdo con el análisis hecho por el programa estadístico Estat-Fid, se encontró que los datos correspondientes a cada inculo se ajustaban mejor a una distribución lognormal que a una normal, exceptuando el experimento de lodos activados 2, el cual se ajusta mejor a una distribución normal, presentando los resultados que se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tabla comparativa de los resultados estadísticos.

Inoculo o cultivo utilizado	Sustrato empleado	Distribución Normal*	Distribución Lognormal*	Varianza
Liofilizado 1	Glucosa	0.283	0.219	0.0008026
Liofilizado 2	Glucosa	0.132	0.119	0.0007294
Lodos activados 1	Glucosa/Acetato de sodio	0.291	0.262	0.00195
Lodos activados 2	Glucosa/Acetato de sodio	0.138	0.147	0.007124
<i>Escherichiacoli</i> ATCC25922	Glucosa	0.137	0.137	0.0012183

*Constante de kolmogorov-smirnov. La constante de kolmogorov-smirnov sirve para poder escoger la distribución que mejor se ajusta a los datos analizados, entre una menor constante la distribución se ajusta mejor.

Los resultados de los voltajes obtenidos en la fase experimental de cada inculo se analizaron con el software ANOVA OriginPro, y se encontraron los resultados que se muestran en la tabla 3.5.

Inoculo o cultivo utilizado	Tamaño de muestra	Media	Deviación estándar
Liofilizado 1	35	0.03544	0.02833
Liofilizado 2	40	0.12333	0.02701
Lodos activados 1	40	0.26331	0.04416
Lodos activados 2	41	0.52778	0.0844
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	29	0.23489	0.03491

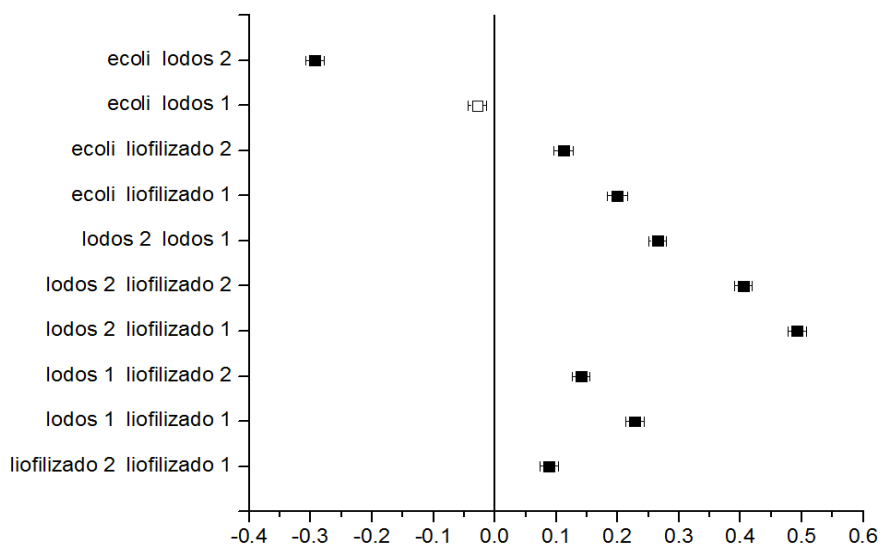
Con el mismo software ANOVA, se realizo el análisis de las medias para compararlas entre si, y poder observar cual es la diferencia entre cada experimentación, y si había una relación entre ellas. Los datos fueron sometidos a una comparación de medias por medio de los métodos: Bonferroni, Scheffe, Tukey, Sidak, Fisher, Bonholm, Sidakholm, y en todos los métodos se encontró que no había una diferencia significativa de 5% entre cada experimentación, por lo que solo se muestran los resultados arrojados por el método Bonferroni; solo al comparar la cepa de *Escherichia coli* con el inoculo de lodos activados 1, se encontró que había una diferencia mayor al 5%, esto se puede observar en la tabla 3.6.

	Dif media	SEM	T	Prob	Alfa	Sig
Liofilizado2-liofilizado1	0.08789	0.01498	5.86618	4.76958E-7	0.05	1
Lodos 1-liofilizado1	0.22787	0.01511	15.07901	1.56447E-27	0.05	1
Lodos 1-liofilizado 2	0.13998	0.01411	9.92094	5.93319E-16	0.05	1
Lodos 2- liofilizado 1	0.49233	0.01498	32.86199	1.05738E-57	0.05	1
Lodos 2- liofilizado 2	0.40445	0.01397	28.94978	2.86024E-52	0.05	1
Lodos 2- lodos 1	0.26446	0.01411	18.74361	4.94908E-35	0.05	1
Ecoli- liofilizado 1	0.19945	0.01637	12.18727	3.85761E-21	0.05	1
Ecoli- liofilizado 2	0.11156	0.01545	7.22326	7.016E-10	0.05	1
Ecoli- lodos 1	-0.02842	0.01557	-1.82499	0.70716	0.05	0
Ecoli- lodos 2	-0.29288	0.01545	-18.9628	1.85873E-35	0.05	1

Con la diferencia anterior encontrada entre *Escherichia coli* y los lodos activados 1, se puede concluir que a pesar de que ambos experimentos se realizaron con 10 electrodos, la cepa de *Escherichia coli* produjo un voltaje mucho menor que los lodos activados.

La diferencia entre las medias se puede observar en la gráfica 3.46, donde se encuentran graficadas la diferencia entre si de cada una de los inóculos, si la diferencia es muy grande, el valor se separa cada vez mas del cero y la diferencia entre las medias es mucho mayor; siendo los puntos de color negro los valores con una diferencia mayor de 0.05, solo se encontró un valor cercano al cero, el cual corresponde

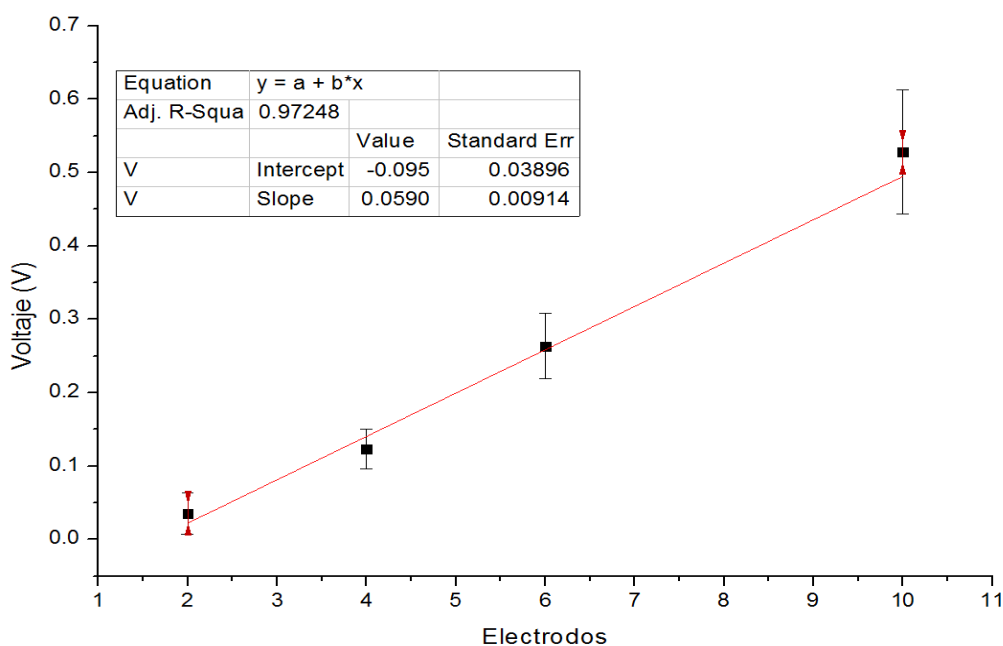
a la diferencia entre la cepa de *Escherichia coli*, y el inoculo de lodos activados 1.



GRÁFICA 3.46. Diferencia entre las medias de los inóculos y cepa utilizados.

Si se grafican las medias de cada inoculo se puede observar que el inoculo que más voltaje produjo fue el inoculo de lodos activados 2, donde se usaron 10 electrodos, y al comparar ese resultado con la media obtenida en la cepa de *Escherichia coli*, que también utilizo 10 electrodos, se puede concluir que un inoculo con una mayor variedad de microorganismos genera una mayor cantidad de voltaje.

Al graficar el promedio del voltaje obtenido (gráfica 3.47) en cada uno los experimentos donde se utilizó diferente número de electrodos, se encontró una relación lineal entre el voltaje y la cantidad de electrodos, para el caso de los inóculos mixtos.



GRÁFICA 3.47. Relación entre el número de electrodos usados y el voltaje generado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Después de hacer el análisis de resultados y observar detenidamente los datos obtenidos y el comportamiento de la MFC durante todos los experimentos estudiados en este trabajo, se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ La generación de electricidad en una celda microbiana de combustible, está ligada al tipo de inóculo utilizado, ya que al utilizar un inóculo mixto, con una variedad de microorganismos es posible generar una mayor cantidad de voltaje en comparación con una cepa pura utilizada, como fue el caso de *Escherichia coli*, comparándola con los lodos activados, usando el mismo número de electrodos, por lo que la hipótesis es cierta.
- ❖ La eficiencia de una celda microbiana de combustible, se incrementa cuando el número de electrodos aumenta, esto se debe a que se aprovecha una mayor área de contacto donde se puede generar una biopelícula, en la cual los microorganismos empleados pueden generar un valor mayor de voltaje, y así hacer más eficiente la conversión del sustrato empleado directamente en energía, tal es el caso si se comparan los experimentos donde se utilizó inóculo liofilizado y lodos activados, en ambos experimentos se incrementó la eficiencia de forma considerable, como es el caso del inóculo liofilizado 1 con una eficiencia de 8.11% comparándolo con el inóculo liofilizado 2 con una eficiencia de 34.13% y solo se aumentaron 2 electrodos, el caso de lodos activados es similar, donde se incrementó de 40.98% a 68.16% con un incremento de 4 electrodos.
- ❖ A través de un análisis ANOVA se obtuvo una tendencia estadísticamente lineal del voltaje generado en la MFC con respecto al número de electrodos, hecho que sirve para el diseño y predicción del funcionamiento al proponer una nueva celda de combustible microbiana.
- ❖ Con base en el comportamiento lineal encontrado entre el voltaje y la cantidad de electrodos, con inóculos mixtos y carga orgánica suficiente, se puede diseñar un MFC piloto y determinar de manera sencilla la cantidad de electrodos y/o superficie para satisfacer un voltaje requerido en aplicaciones reales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Altman, D.G. and Bland, J.M. (1996). *Statistics Notes: Comparing several groups using analysis of variance*. Br Med J. p: 1472-1473.
2. Alzate-Gaviria L, Sebastian P, Perez-Hernandez A. (2007). Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 32: 3141-3146.
3. Alzate-Gaviria L, Sebastian P, Perez-Hernandez A. (2008). Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. *Int. Sci. Interciencia*. 38: 503-509.
4. Bland, J.M. and Altman, D.G. (1995). *Multiple significance tests: the Bonferroni method*. Br Med J. p:170.
5. Colpan, C.O., Dincer, I. and Hamdullahpur, F. (2008). Portable fuel cells – fundamentals, technologies and applications. *Springer Science+Business Media B.V.* 2008, 87-101
6. Heilmann J, y Logan B. (2006). Production of electricity from proteins using a single chamber microbial fuel cell. *Water Env. Res.* 78: 531- 537.
7. Kim J, Min B. Logan B. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 23-30.
8. Liu H, y Logan B (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Env. Sci. Technol.* 38: 4040-4046.
9. Liu H, Ramnarayanan R, Logan B. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Env. Sci. Technol.* 38: 2281-2285.
10. Logan B, y Regan J. (2006a). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14: 512-518.
11. Logan B, Regan J. (2006b). Microbial fuel cells - challenges and applications. *Env. Sci. Technol.* 40: 5172-5180.
12. Logan B, Hamelers B, Rozendal R, Schroder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, verstraete W, Rabaey K. (2006c). Microbial Fuel Cell: Methodology and technology. *Env. Sci. Technol.* 40(17): 5181-5192.
13. Logan B, Cheng S, Watson V, Estadt G. (2007). Graphite fiber brush anodes for increased power production in air- cathode microbial fuel cells. *Env. Sci. Technol.* 41: 3341-3346.
14. Lovley D, Phillips E. (1998). Novel of microbial energy metabolism: Organism carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese. *Appl. Env. Microbiol.* 54: 1472-1480.
15. Martínez González, M.A., Sánchez-Villegas, A., and Faulín Fajardo, F.J. (2006), Comparación de k

- medias. *Bioestadística Amigable*. 2ª Edición. España. Díaz de Santos. p: 419-469.
16. Mayandía A.A. (2009). *Descripción y modelado de una pila de combustible de membrana de intercambio protónico*. Tesis Licenciatura, Madrid, Universidad de Madrid, Facultad de Ingeniería. 241.
 17. Michel T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. (1999). *Brock Biología de los microorganismos*, 8ª edición. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. p: 1064.
 18. Min B, Logan B. (2004). Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Env. Sci. Technol.* 38: 5809-5814.
 19. Min B, Cheng S, Logan B. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res.* 39: 1675-1686.
 20. Oh S, Min B, Logan B. (2004). Cathode Performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Env. Sci. Technol.* 38: 4900-4904.
 21. Poggi-Varaldo HM, Alzate-Gaviria LM, Nevarez-Morillon VG, Rinderknecht-Seijas N. (2005). A side by side comparison of two systems of sequencing coupled reactors for anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Manag. Res.* 23: 270-280.
 22. Rabaey K, Boon N, Siciliano S, Verhaege M, Verstraete W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Env. Microbiol.* 70: 5373-5382.
 23. Rabaey K, Lissens G, Siciliano S, Verstraete W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* 25: 1531-1535.
 24. Ringeisen B, Henderson E, Wu P, Pietron J, Little B, Biffinger J, Jones-Meehan J. (2006). High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Env. Sci. Technol.* 40: 2629-2634.
 25. Park D, Zeikus J. (2003). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 348-355.
 26. Roller S, Bennetto H, Delaney G, Mason J, Stirling J, Thurston C. (1984). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34: 3-12.
 27. Southgate, D.A.T. (1990). Determination of Food Carbohydrates. *Elsevier Applied Science*. 35:154-163.
 28. Stockburger, D.W. ANOVA. (1998). Why Multiple Comparisons Using t-tests is NOT the Analysis of Choice. Rescatado de: http://davidmlane.com/hyperstat/intro_ANOVA.html.
 29. Suzuki S. (1976). Fuel cells with hydrogen forming bacteria. *Hosp. Hyg. Gesundheitswes. Desinfekt.* 68: 159.

ANEXOS

APENDICE A

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO ANAEROBIO POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN POR EXTINCIÓN EN VIALES BREWER.

Reactivos por litro de solución

- Extracto de levadura 2g.
- Peptona de caseína 5g.
- Dextrosa 5g.
- Extracto de carne 1g.
- Cloruro de Sodio 10g, se puede usar una cantidad mayor o menor dependiendo de la salinidad deseada.
- Tiosilicato de Sodio 1.1g.
- Azul de metileno 1 gota.

Equipo y materiales

- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Agitador magnético.
- Matraz kitazato de 1L.
- Papel filtro de poro de 1mm.
- Embudo bushner.
- Matraz erlenmeyer de 1L.
- Dosificador.
- Viales con tapa de baquelita.
- Engrapadora para viales.
- Nitrógeno en gas.
- Jeringa de 1ml estéril.
- Mecheros para siembra microbiológica.

Procedimiento

Se agrega 1L de agua bidestilada al matraz erlenmeyer y se coloca en la parrilla de agitación con el agitador magnético, y se agregan poco a poco los reactivos antes mencionados, se utiliza un poco de calor en caso de que los reactivos no se disuelvan por completo.

Una vez disueltos todos los reactivos en el matraz y la solución a temperatura ambiente, se filtra 2 veces a través del papel filtro con ayuda de vacío en el matraz kitazato.

Después del filtrado, la solución se burbujea con nitrógeno para eliminar la presencia de oxígeno. Posteriormente se dosifican 9mL de la solución en cada vial. Antes de sellar los viales se burbujean nuevamente con nitrógeno y se sellan inmediatamente. Después de sellados los viales se ponen a esterilizar por calor húmedo en autoclave. Los viales se utilizan a temperatura ambiente para determinar anaerobias totales.

Para hacer la siembra por extinción en condiciones de esterilidad se toma 1mL de muestra y se siembra en el primer vial, sin sacar la aguja de la jeringa se agita el vial y se toma otra vez 1mL y se pasa al vial número 2, así sucesivamente hasta sembrar el número de viales donde se crea que ya no crecerán las bacterias anaerobias.

Posteriormente los viales se ponen a incubar a 34.5°C por 24 horas, se toman como positivos los viales que presenten turbiedad, y se reporta el resultado en la última dilución en que se presento la turbidez.

APENDICE B

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR MEDIO DE UFC DEACUERDO A LA NORMA NOM-092-SSA1-1994

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales y de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994. Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

4. Definición

Para fines de esta norma se entiende por: Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a las siguientes abreviaturas y símbolos se entiende por:

g=gramo

l=litro

ml=mililitro

°C=grado Celsius

pH=potencial de hidrógeno

%=por ciento

UFC=unidades formadoras de colonias

h=hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico. Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5g

Triptona 5,0g

Dextrosa 1,0g

Agar 15,0g

Agua 1,0l

Preparación del medio de cultivo.

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500mL, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

6.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requieren, los materiales mencionados en la NOM-110-SSA1-1994.

7. Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, los siguientes:

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta $1,0^{\circ}\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

8. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir la NOM-110-SSA1-1994.

9. Procedimiento

9.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación, la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

9.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

9.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

9.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

9.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano	Temperatura, Tiempo de Incubación
Termofílicos aerobios	$55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios	$35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 h
Psicrotróficos	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 7 - 10 días

9.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250UFC, para disminuir el error en la cuenta.

9.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

10. Expresión de resultados

10.1 Cálculo del método

10.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, contar el número de colonias por placa, y calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

10.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro.

10.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas, se presentan las siguientes guías:

10.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado".

10.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado".

10.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

10.1.3.3.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

10.1.3.3.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

10.1.3.3.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

10.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

APENDICE C

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

Método reflujado cerrado o método espectrofotométrico de acuerdo a la norma **NMX-AA-030-SCFI-2001**.

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
 - Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
 - Sulfato mercúrico ($HgSO_4$)
 - Sulfato de plata (Ag_2SO_4)
 - Biftalato de potasio patrón primario ($HOOC C_6H_4 COOK$)
- Disolución estándar de biftalato de potasio (1mL = 1mg de DQO). Deshacer los grumos y secar el biftalato de potasio a 120°C. Pesar aproximadamente y con precisión 0,851 g de biftalato de potasio, disolver en agua y aforar a 1L. Es estable hasta por 3 meses cuando se mantiene en refrigeración y si no se observa crecimiento biológico.
- Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Pesar aproximadamente y con precisión 15g de sulfato de plata y disolver en 1L de ácido sulfúrico concentrado. El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa disolución. La disolución formada debe mantenerse en la obscuridad para evitar su descomposición.
- Disolución de digestión A (alta concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 10,216 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103°C por 2h, y añadirlos a 500mL de agua, adicionar 167mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33,3g de sulfato mercúrico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1L con agua.
- Disolución de digestión B (baja concentración). Pesar aproximadamente y con precisión 1,0216g de dicromato de potasio previamente secado a 103°C por 2h, y añadirlos a 500mL de agua. Adicionar 167mL de ácido sulfúrico concentrado y 33,3g de sulfato mercúrico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1L con agua.

Equipo y materiales

- Placa de calentamiento con perforaciones para los tubos de reacción de DQO que alcance una temperatura de 150°C ± 2°C, también conocido como reactor para DQO.
- Espectrofotómetro que pueda utilizar un rango de 190nm a 900nm y equipado con celdas de 1cm de paso óptico de luz o tubos de 16mm x 100mm de calidad espectro.
- Tubos para digestión, 16mm x 100mm con tapa con cubierta interior de TPF.
- Balanza analítica (0.0001g).

Procedimiento

- Precalentar a 150°C el digestor de DQO.
- Colocar en los tubos de reacción 1,5mL de la disolución de digestión A.
- Tomar cuidadosamente 2,5mL de muestra previamente homogeneizada dentro de los tubos de reacción.
- Añadir cuidadosamente 3,5mL de la disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico.

- Cerrar inmediatamente para evitar que se escapen los vapores, asegurarse de que están herméticamente cerrados. Suavemente invertir los tubos varias veces destapando después de cada inversión para liberar la presión.
- La disolución es fuertemente ácida y el tubo se calienta en este proceso, trabajar con guantes aislantes.
- Para la determinación del blanco de reactivos realizar los pasos anteriores pero colocando 2,5 mL de agua en un tubo de reacción, en lugar de la muestra.
- Colocar todos los tubos en el digestor previamente calentado a 150°C y reflujar por 2h.
- Retirar los tubos del digestor y dejar que los tubos se enfríen a temperatura ambiente, permitiendo que cualquier precipitado se sedimente.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm, previamente calibrado, frente a una solución blanco.
- Para aguas que contengan una DQO baja (5mg/L a 75mg/L), utilizar la disolución de digestión B. Si el valor de la DQO determinado es más alto que 75mg/L después de usar estos reactivos, reanalizar la muestra, utilizando la disolución A de alta concentración (100mg/L a 1000mg/L).

APENDICE D

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO CONSUMIDO POR EL SISTEMA

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Glucosa (grado analítico)
- Fenol (grado analítico)
- Solución de fenol al 5%. Se pesan aproximadamente y con precisión 5.00g de fenol y aforarlos a 1L con agua.

Equipo y materiales

- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μ L.
- Vortex marza Fisher
- Gradilla
- Espectrofotómetro que pueda utilizar un rango de 190nm a 900nm y equipado con celdas de 1cm de paso óptico de luz o tubos de 16mm x 100mm de calidad espectro.
- Tubos de ensaye, 16mm x 100mm con tapa con cubierta interior de TPF.

Procedimiento

- Realizar las diluciones necesarias a la muestra para que la absorbancia entre en el rango de la curva de calibración, tomando 1mL de la muestra directa de la MFC y aforándola a 10mL, sucesivamente hasta que entre en el rango de la curva al ser medida en el espectrofotómetro.
- Posteriormente, colocar 1ml de la muestra en un tubo de ensaye.
- Adicionar 1ml de la solución de fenol al 5%.
- Por último se agregan 5ml de ácido sulfúrico concentrado, adicionándolos lentamente por la pared del tubo, se deja enfriar la reacción antes de agitar el tubo, una vez que se enfrió el tubo se homogeniza en el vortex,

Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 490nm, previamente calibrado, frente a una solución blanco.