



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

División de Ciencias Ambientales

**“Efecto de la estimulación eléctrica sobre el crecimiento de *Pseudomonas
denitrificans* bajo condiciones aerobias en una celda bioeléctrica”**

**Tesis que presenta
Yanet Stephany Toriz García**

**Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Ambientales**

Codirectores de la Tesis:

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz**

San Luis Potosí, S.L.P., 02 Junio del 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***"Efecto de la estimulación eléctrica sobre el crecimiento de Pseudomonas denitrificans bajo condiciones aerobias en una celda bioeléctrica"*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Yanet Stephany Toriz García** y aprobada el **dos de junio de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Codirectora de la tesis

Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz
Codirector de la tesis

Dr. Alessandro A. Carmona Martínez
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Ignacio González Martínez
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Felipe Matriste Mondragón
Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y del Dr. Luis Felipe Cházaro Ruíz.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-299514).

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT-169634 “Materiales de tipo composito para la modificación de electrodos, para su empleo en la detección de iones metálicos en medio acuosos y/o sedimentos” asignado al Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz

ACTA DE EXAMEN

DEDICATORIA

A mi hermosa y valiente madre, quien siempre me ha brindado su apoyo y amor incondicional. A ella quien ha peleado conmigo todas mis batallas, ha llorado, sufrido y reído conmigo todos mis logros, derrotas y tristezas.

A Rafa, quien ha sido como un padre para mí, quien creyó en mí a pesar de ser la persona que yo era y nunca dudo de mí, ni de mis capacidades para llegar hasta donde hoy estoy.

A la Dra. Noemí Andrade, ya que fue quien me alentó a realizar un posgrado, siempre tuvo fe en mí. Ella fue más que mi asesora, fue mi amiga y siempre me enseñó que nada es imposible, sin importar si eres mujer, si quieres o no tener una familia, y sobre todo sin importar que los demás digan que tú no puedes, siempre, cualquier objetivo en la vida es alcanzable cuando se tiene determinación y empeño.

A la memoria de Jessica Márquez, excelente mujer, amiga y un extraordinario ser humano, un ejemplo a seguir, gracias por darme esta gran lección de vida. Te llevaré siempre en mi corazón!! Besos hasta el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada.

Agradezco a la Dra. Berenice Celis y al Dr. Luis Felipe Chazáro por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por la infinita paciencia que tuvieron para conmigo, por sus sabios consejos y por compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

A mi comité tutorial, Dr. Ignacio González, Dr. Alessandro Carmona y el Dr. Felipe Alatraste, agradezco su tiempo y dedicación, su paciencia para escucharme en los tutoriales y fuera de ellos, gracias por sus consejos, aportaciones y sugerencias siempre acertados.

Agradezco a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo, a la M. en C. Dulce Partida, al M. en C. Guillermo Vidriales, a la M. en C. Alejandra Colunga Alvarez, a la I.Q. María del Carmen Rocha Medina y a la Dra. Angélica Aguilar Aguilar por su apoyo técnico y sugerencias.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, muchas gracias, ya que hicieron amenas las horas en él, especialmente a Tona y Alan quienes me enseñaron y ayudaron mucho durante la realización de este trabajo. Gracias a todos, no lo hubiera logrado sin ustedes.

Gracias a mis Ex-romíos Lalo y Aurora quienes también fueron parte importante de esta aventura, gracias por los gratos momentos compartidos y el apoyo que me brindaron mientras estuve lejos de casa.

Agradezco a mi hermosa y extraordinaria familia, quienes a pesar de la distancia me llenan con su gran amor y me motivan a ser mejor cada día, especialmente mi sobrinito Uli, quien es uno de mis motores para seguir, mis padres y mi abue a quien debo cada uno de mis logros.

Agradezco a mi gran amor, amigo, cómplice y compañero en toda esta contrastante aventura, Edgar, quien logro convertir esta etapa de mi vida en una de las más hermosas, gracias por estar siempre a mi lado, por compartir los días felices, los tristes, los difíciles y por soportar todas mis locuras.

Índice General

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURA.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
ABREVIATURAS	xv
GLOSARIO	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 PROCESOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES RESIDUALES	3
2.1.1 <i>Lodos activados</i>	3
2.1.2 <i>Composición y características microbiológicas de lodos residuales</i>	4
2.1.3 <i>Tratamiento y disposición de lodos residuales</i>	5
2.1.4 <i>Reparto del sustrato en el metabolismo microbiano</i>	8
2.1.5 <i>Rendimiento Celular</i>	9
2.2 <i>PSEUDOMONAS DENITRIFICANS</i> COMO MODELO DEL METABOLISMO MICROBIANO.....	10
2.2.1 <i>Generalidades del metabolismo</i>	11
2.2.2 <i>Reacciones redox y la escala de potencial eléctrico</i>	12
2.2.3 <i>Transportadores de electrones en la membrana celular</i>	14
2.3 EFECTO DE UNA CORRIENTE ELÉCTRICA EN LOS MICROORGANISMOS.....	16
2.3.1 <i>Reactores bioeléctricos</i>	17
2.3.2 <i>Aplicación de los reactores bioeléctricos</i>	18
2.3.3 <i>Factores que afectan el rendimiento de los reactores bioeléctricos</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
3.1 JUSTIFICACIÓN	23
3.2 HIPÓTESIS.....	23
3.3 OBJETIVOS	24

3.3.1	Generales	24
3.3.2	Específicos	24
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1	MATERIALES BIOLÓGICOS	25
4.1.1	Inóculo	25
4.1.2	Medio de cultivo	26
4.2	MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.....	27
4.2.1	Reactor cilíndrico rotatorio.....	27
4.2.2	Celda con arreglo de tres electrodos.....	27
4.2.3	Potenciostato/Galvanostato.....	28
4.3	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
4.3.1	Propagación y conservación de la cepa.....	30
4.3.1.1	Métodos de inoculación	31
4.3.1.2	Selección del medio de cultivo	31
4.3.2	Selección de fuente de carbono y energía	32
4.3.3	Estudio de la ventana de electroactividad del sistema electrodo/electrolito ...	32
4.3.4	Selección del potencial eléctrico	33
4.3.5	Experimentos control.....	33
4.3.5.1	Curva de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en el reactor cilíndrico rotatorio	33
4.3.5.2	Control electroquímico abiótico y control biótico	34
4.3.6	Aplicación de potencial eléctrico.....	35
4.4	TÉCNICAS ANALÍTICAS	36
4.4.1	Cuantificación de biomasa.....	36
4.4.2	Sólidos volátiles totales	36
4.4.3	Cuantificación de lactato	37
4.4.4	Técnicas electroquímicas	37
4.4.5	pH	37
4.4.6	Potencial óxido-reducción.....	38
4.5	CÁLCULOS.....	38
4.5.1	Cálculo del consumo de lactato y producción de biomasa.....	38
4.5.2	Cálculo de las velocidades de consumo de lactato y producción de biomasa ...	39
4.5.3	Cálculo del rendimiento (Y) y f_s^0 teórico	39
4.5.4	Cálculo del rendimiento (Y) y f_s^0 experimental	41
5.	RESULTADOS	43
5.1	DESEMPEÑO DE LOS CULTIVOS DE <i>PSEUDOMONAS DENITRIFICANS</i>	43
5.1.1	Curva de crecimiento.....	43

5.1.2	<i>Optimización del medio de cultivo</i>	44
5.1.3	<i>Curva de calibración de biomasa</i>	46
5.1.4	<i>Curvas de crecimiento con distintas fuentes de carbono</i>	47
5.1.5	<i>Crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en el reactor de cilindro rotatorio</i>	48
5.2	EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL MEDIO DE CULTIVO Y ELECTRODOS	50
5.2.1	<i>Estudio de la ventana de electroactividad</i>	50
5.2.2	<i>Selección del voltaje aplicado</i>	51
5.3	DESEMPEÑO DEL SISTEMA BIOELÉCTRICO	53
5.3.1	<i>Experimentos control abiótico y biótico</i>	53
5.3.2	<i>Aplicación del campo eléctrico</i>	55
5.3.3	<i>Perfiles de corriente</i>	56
5.3.4	<i>Análisis de los parámetros del sistema, coeficientes de partición y rendimientos celulares</i>	59
5.3.4.1	<i>ORP, pH y conductividad eléctrica</i>	59
5.3.4.2	<i>Análisis de los cambios en la cinética de <i>Ps. denitrificans</i></i>	60
5.3.4.3	<i>Análisis del rendimiento celular y los coeficientes de partición</i>	62
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
7.	BIBLIOGRAFÍA	65

Índice de tablas

Tabla 2.1 Microorganismos aislados en diferentes procesos de lodos activados, modificada de Lodos Activados - 100 Años y Contando (2014)	5
Tabla 2.2 Ventajas y desventajas de distintas estrategias para la reducción de lodos.	7
Tabla 2.3 Estudios de sistemas bioelectroquímicos, aplicando diferentes intensidades de corriente, modificado de Velasco-Álvarez (2011)	17
Tabla 2.4 BER y REBs aplicados en diferentes procesos y configuraciones para la estimulación del metabolismo microbiano	20
Tabla 2.5 Reacciones abióticas típicas sobre la superficie del electrodo. Modificada de Thrash y Coates, (2008)	21
Tabla 4.1 Medio de cultivo para <i>Ps. denitrificans</i>	26
Tabla 5.1 Desempeño del crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en relación a la densidad óptica. Final Screening Assessment of <i>Pseudomonas sp.</i> ATCC 13867	46
Tabla 5.2 Tasas de crecimiento y producción de biomasa en condiciones aerobias	48
Tabla 5.3 Comparación entre la biomasa producida y el consumo de lactato entre el experimento control y los experimentos con aplicación de un campo eléctrico en el sistema bioeléctrico.	55
Tabla 5.4 Valores de ORP, pH y conductividad en el medio, al inicio y final de las cinéticas, bajo condiciones aerobias con lactato como fuente de carbono a distintos potenciales de celda.	59
Tabla 5.5 Rendimiento celular ($Y_{x/s}$), fracción de equivalentes f_e^0 y f_s^0 para <i>Ps. denitrificans</i> en condiciones aerobias.	64

Índice de figuras

Figura 2.1 Esquema de las unidades del proceso convencional de lodos activados. Modificado de Spearling y Lemos (2007).....	4
Figura 2.2 Esquema de las tecnologías in-situ de disminución de lodos activados. Modificado de Guo et al., (2013).....	6
Figura 2.3 Esquema simplificado del reparto de la energía en el metabolismo bacteriano, entre el anabolismo y catabolismo bajo condiciones aerobias y anóxicas. Modificado de Rittman y McCarty (2001)	9
Figura 2.4 Micrografía de microscopio óptico 100x de <i>Pseudomonas denitrificans</i> . En la micrografía A se muestra a <i>Ps. denitrificans</i> sin tinción, y en la micrografía B se muestra la bacteria teñida, el color rojo corresponde al tipo Gram(-) de la bacteria.	11
Figura 2.5. Escala de potenciales redox de los pares involucrados en la cadena de transporte electrónico de las bacterias aerobias facultativas. Modificado de Madigan et al. (2010).....	14
Figura 2.6 Posible ruta de transporte electrónico para bacterias aerobias facultativas.....	14
Figura 2.7 Cadena de transporte electrónico para la respiración aerobia de <i>Pseudomonas</i> , modificado de Chen y Strous, 2013.	16
Figura 4.1 Configuración del reactor bioelectroquímico	27
Figura 4.2 Sistema bioeléctrico con arreglo de tres electrodos conectado a un potencióstato	29
Figura 4.3 Esquema de las etapas de la estrategia experimental	30
Figura 4.4 Configuración del reactor rotatorio.....	34
Figura 4.5 Celda bioeléctrica con arreglo de tres electrodos, conectada al potencióstato/ galvanostato, inoculada con <i>Ps. denitrificans</i> en medio mineral mínimo, con lactato como sustrato, saturado de aire.	35
Figura 5.1 Curva de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en caldo nutritivo, bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante.....	44
Figura 5.2 Curva de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> con metanol como fuente de carbono, bajo condiciones aerobias y anóxicas, a temperatura 30 °C y agitación constante.	45
Figura 5.3 Curva de calibración de O.D Vs SSV bajo condiciones aerobias para <i>Ps. denitrificans</i> con caldo nutritivo a temperatura de 30 °C y agitación constante.....	46

Figura 5.4 Curva de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en medio mineral mínimo con diferentes fuentes de carbono bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constantes.....	47
Figura 5.5 Curva de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> en medio mineral mínimo, con lactato como sustrato bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante (400 rpm), utilizando el reactor rotatorio.	49
Figura 5.6 Celda electroquímica con arreglo de tres electrodos para estudiar la ventana de electroactividad en medio mineral mínimo.	50
Figura 5.7 Respuestas voltamperométricas cíclicas en dirección anódica y catódica, en soluciones con medio mínimo mineral saturadas de aire a 25 °C, una velocidad de barrido de $v \times 10^{-3}$ mv-s.....	51
Figura 5.8 Curva de polarización con medio mínimo mineral bajo condiciones aerobias.	52
Figura 5.9 Experimento control, con medio mínimo mineral, sin inóculo, aireación continua y potencial constante de 0.5 V.....	53
Figura 5.10 . Cinética de crecimiento de <i>Ps. denitrificans</i> bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante durante 24 h.	54
Figura 5.11 Perfil de potencial y su respuesta en corriente. Potencial aplicado 0.5 V, agitación y aireación constante.	57
Figura 5.12 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.1 V.....	57
Figura 5.13 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.25 V.	58
Figura 5.14 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.5 V.....	58
Figura 5.15 Consumo de lactato y producción de biomasa en los ensayos con y sin estímulo eléctrico, bajo condiciones aerobias, en la celda bioeléctrica, bajo condiciones aerobias.....	61
Figura 5.16 Tasa de utilización de sustrato (lactato) y velocidad de producción celular en los ensayos con y sin estímulo eléctrico, bajo condiciones aerobias, en la celda bioeléctrica.	61
Figura 5.17 Valores de rendimiento celular ($Y_{x/s}$), fracción de equivalentes reductores hacia energía (f_e^0), fracción de equivalentes reductores hacia la síntesis de biomasa (f_s^0) para <i>Ps. denitrificans</i> en condiciones aerobias.....	63

Índice de Anexos

Anexo A. Principios de las Técnicas electroquímicas empleadas en la metodología experimental.....	106
Anexo 2. Cinéticas de crecimiento y curvas de calibración.....	107

Abreviaturas

BER	Siglas en inglés de Reactor bioelectroquímico
DQO	Demanda química de oxígeno
e⁻ eq	equivalentes electrones
kJ	kilo joules k de kilo es minúscula
MFC	Siglas en inglés Celdas microbianas de combustible
mM	mili molar
nm	nanómetros
ORP	Potencial óxido reducción
pH	Potencial de hidrógeno
RBEs	Siglas en inglés Reactor bioeléctrico
rpm	revoluciones por minuto
rut	Velocidad de utilización de sustrato
rx	Velocidad de producción de biomasa
SBEs	Siglas en inglés de sistemas bioelectroquímicos
SVT	Sólidos volátiles totales
SVT	Sólidos volátiles totales
THR	Trihalometanos
$\Delta E_0'$	Diferencia de potencial estándar
ΔG^0	Diferencia de energía libre de Gibbs
Δx	Cambios en la producción de biomasa
μm	micrómetros

Glosario

Aclimatación. Proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a distintos cambios en el medio en que se desarrolla.

Heterótrofo: Se refiere a los organismos que usan sustancias orgánicas como fuente de carbono y energía, para realizar su metabolismo central y como material para sintetizar sus propios compuestos.

Licuefacción de gelatina: Es una prueba que se utiliza como medio de cultivo gelatina nutritiva, en esta prueba se pretende determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación.

Trihalometanos: Los trihalometanos son compuestos orgánicos volátiles provenientes de la reacción de la materia orgánica que transporta el agua sin tratar con el cloro que se emplea en los trenes de tratamiento para su desinfección.

Resumen

Toriz García Yanet S. (2017). Efecto de la estimulación eléctrica sobre el crecimiento de *Pseudomonas denitrificans* bajo condiciones aerobias en una celda bioeléctrica. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

El tratamiento biológico más utilizado para efluentes con altas cargas orgánicas y contaminantes recalcitrantes en sistemas de aguas municipales e industriales, es el proceso de lodos activados. Sin embargo, existe un gran problema, ya que durante este proceso se genera una alta cantidad de lodos residuales que deben disponerse, lo que eleva el costo del tratamiento, además ocasiona un impacto negativo en el ambiente ya que algunos pueden resultar tóxicos si no son tratados adecuadamente. Una posible alternativa para combatir este problema, la cual se propone en la presente tesis, es la estimulación del metabolismo microbiano, a partir de una exposición continua, a un campo eléctrico, ya que se ha observado que dicha estimulación puede disminuir el crecimiento celular e incrementar el consumo de materia orgánica. En este trabajo, se estudió el efecto del suministro de un potencial en el metabolismo de una cepa pura de la especie *Pseudomonas denitrificans*, mediante un sistema bioeléctrico. Primero se hizo un estudio nutricional de *Ps. denitrificans* y se determinó al lactato como la fuente de carbono y energía óptima para su crecimiento bajo condiciones aerobias. Posteriormente se determinaron las condiciones de operación del sistema bioeléctrico abiótico; se delimitó un intervalo de potencial de 0.1-0.9 V, para eludir la electrólisis del medio electrolítico y la degradación del material del electrodo, es decir en este intervalo de potencial no hubo reacciones faradaicas que pudieran proveer compuestos que se comportaran como un mediador redox externo para el intercambio electrónico entre los electrodos y la bacteria. Finalmente se aplicaron tres potenciales de 0.1, 0.25 y 0.5 v y se evaluó la tasa de utilización del sustrato y producción de biomasa; también se hizo un análisis de la relación entre el aumento celular y el consumo de lactato el cual se expresa como rendimiento celular, y se calcularon las fracciones de equivalentes reductores para biomasa y energía. El análisis de los parámetros determinados indicó que el suministro del potencial eléctrico causó un cambio en el rendimiento celular y en la tasa de utilización de sustrato; el rendimiento celular disminuyó después de la aplicación de 0.25 V, obteniéndose un rendimiento final de 0.34 g SVT/ g Lactato, 31% menor respecto del experimento control. Mientras que la tasa de utilización del sustrato creció hasta 2 veces más respecto del experimento control. En conjunto, los resultados presentados aquí indican que la aplicación constante de un potencial eléctrico a bajos voltajes en procesos de lodos activados tiene el potencial de disminuir la producción de lodos y de hacer que los reactores sean más eficientes para el tratamiento de aguas residuales.

Abstract

Toriz García Yanet S. (2017). Master's. Effect of the electrical stimulation on the growth of *Pseudomonas denitrificans* under aerobic conditions in a bioelectrical cell. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

The most used biological treatment for effluents with high organic loads and recalcitrant contaminants for both, municipal and industrial water systems is the activated sludge process. However, there is a big problem, since during this process a high amount of residual sludge is generated, which raises the cost of the treatment, and causes a negative impact on the environment, since some can be toxic if they are not treated properly. A possible alternative to combat this problem, which is proposed in this thesis, is the stimulation of microbial metabolism, from a continuous exposure to an electric field, since it has been observed that such stimulation can decrease cell growth and increase the consumption of organic matter. In this work, we studied the effect of the supply of a potential in the metabolism of a pure strain of the species *Pseudomonas denitrificans*, through a bioelectric system. First, a nutritional study of *Ps. Denitrificans* was made determining lactate as the carbon source and optimum energy for the growth of *Ps. Denitrificans* compared to acetate, methanol and glucose under aerobic conditions. Subsequently, the operating conditions of the abiotic bioelectric system were determined; A potential range of 0.1-0.9 V was delimited to elude the electrolysis of the electrolytic medium and the degradation of the electrode material, i.e. in this potential range there were no faradic reactions that could provide compounds that would behave as an external redox mediator for electronic exchange between electrodes and bacteria. Finally, three potentials of 0.1, 0.25 and 0.5 V were applied and the rate of substrate utilization and biomass production were evaluated. Also, an analysis was made of the relationship between cell growth and lactate consumption, which is expressed as cell yield, and the fractions of reducing equivalents for biomass and energy were calculated. The analysis of the determined parameters indicated that the supply of the electric potential caused a change in the cellular yield and the rate of substrate utilization. The cell yield decreased after application of 0.25 V, showing a final yield of 0.34 g SVT / g lactate, 31% lower than the control experiment. While the utilization rate of the substrate grew up to 2 times more than the control experiment. Overall, the results presented here indicate that the constant application of an electric potential at low voltage in activated sludge processes has the potential to decrease sludge production And to make the reactors more efficient for wastewater treatment.

1. Introducción

Los sistemas de lodos activados, son los más empleados en plantas de tratamiento de aguas municipales e industriales, se calcula que 90% de las plantas de tratamiento de aguas municipales los utiliza como la parte fundamental del tren de tratamiento. Esto debido a que la función básica del proceso es transformar la materia orgánica a dióxido de carbono, agua y células bacterianas. Las células bacterianas son separadas del agua purificada y se eliminan en forma concentrada como lodos residuales. La producción de estos lodos se da en grandes volúmenes, debido a que el coeficiente de rendimiento típico de una planta de lodos activados es 0.5 g lodo/g materia orgánica, dando una producción diaria aproximada de 15-100 L/kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) removida, aproximadamente 0.5 kg de lodo seco (Liu 2003; Metcalf & Eddy 2003) . El procesamiento o reutilización de estos lodos es un gran problema debido a los altos costos de tratamiento, ya que representa alrededor de la mitad e incluso hasta 60% del costo total de operación de la planta (Liu y Tay, 2001). Una manera de remediar este problema es la reducción de lodos durante el tratamiento en el tanque de aireación, en lugar de un post-tratamiento. Por esta razón se han desarrollado diferentes estrategias, tales como el desacoplamiento del metabolismo, depredación de bacterias y cloración (Guo et al., 2013), el problema con estas técnicas es que son costosas, pueden disminuir la tasa de remoción de demanda química de oxígeno (DQO), entre otras cosas. Actualmente se están realizando investigaciones científicas para tratar de disminuir la producción de lodos, mediante sistemas bioelectroquímicos o bioeléctricos, con los cuales se ha observado que la estimulación del metabolismo microbiano después de la aplicación de una corriente o un potencial eléctrico influye directamente en el crecimiento de los microorganismos. Los reactores bioeléctricos se han aplicado tanto en consorcios microbianos como en cultivos puros, por lo cual su alta flexibilidad los coloca como una buena alternativa en la aplicación de soluciones ambientales como tratamiento de residuos, aguas residuales y remediación a partir de la estimulación

del metabolismo microbiano (Thrash y Coates, 2008). Existen evidencias de que la estimulación eléctrica de un microorganismo puede acelerar el proceso metabólico que esté llevando a cabo y modificar el rendimiento de la producción de biomasa, tal como lo reportaron Beschkov y colaboradores (2004). Dichos autores observaron que la aplicación de un estímulo eléctrico a un cultivo de *Pseudomonas denitrificans* tuvo un efecto en la velocidad de reducción de nitrato, que a su vez provocó un retardo en el crecimiento del microorganismo, específicamente en la fase Lag ya que ésta se prolongó. Integrando los aspectos antes mencionados, resulta muy importante desarrollar tecnologías para disminuir la producción de lodos residuales en el proceso de lodos activados, para esto es recomendable partir de sistemas simples para comprender el comportamiento del metabolismo microbiano. En este trabajo se utilizó a *Ps. denitrificans* como modelo de estudio, por su metabolismo facultativo, ya que tiene la capacidad de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones o nitrato (NO_3^-) bajo condiciones anóxicas. Además tiene la capacidad de respirar NO_3^- aún en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, por lo que es muy utilizado en procesos de eliminación completa del nitrógeno, en donde se combinan diversas configuraciones de proceso, por ejemplo alternando los tanques bajo condiciones aerobias y anóxicas o en sistemas de recirculación del licor.

Aunado a lo anterior, existe la necesidad de realizar investigación sobre el efecto de los campos eléctricos en los microorganismos ya que es una tecnología con altas expectativas en un futuro. En consecuencia, el objetivo principal de este estudio fue estudiar el impacto que puede tener el suministro de un potencial eléctrico sobre el crecimiento de *Ps. denitrificans*.

2. Antecedentes

2.1 Procesos microbiológicos para el tratamiento de efluentes residuales

2.1.1 Lodos activados

El proceso de lodos activados es un sistema de tratamiento biológico ampliamente utilizado en tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (Sperling y Lemos, 2007). Generalmente, este proceso es estrictamente aeróbico; sin embargo, se han ido implementando algunas variaciones anóxicas, como la desnitrificación. Este tratamiento biológico, consiste de un reactor o tanque de aireación, un tanque de sedimentación y una línea de purga y recirculación de lodos como se muestra en la Figura 2.1. Dentro del tanque de aireación hay una concentración de agregados microbianos o flóculos, denominados lodos activados. Estos lodos se encuentran en suspensión mediante aireación mecánica y son mezclados con el agua residual que contiene la materia orgánica (sustrato), la cual es utilizada por los microorganismos como fuente de carbono y/o energía. Los microorganismos (biomasa), a partir de una serie de reacciones bioquímicas, consumen y oxidan la materia orgánica, donde este consumo puede ser expresado como demanda química de oxígeno (DQO) o demanda biológica de oxígeno (DBO). Después de un tiempo de retención del líquido, la biomasa consume el sustrato y se reproduce. Entonces el agua y los flóculos microbianos son transferidos al tanque de sedimentación, donde una parte de los lodos es eliminada del agua tratada por sedimentación y otra fracción es reciclada al tanque de aireación, entretanto el efluente clarificado es descargado al ambiente o enviado a otro proceso de tratamiento. Aunque este proceso es efectivo y viable para el tratamiento de aguas residuales también tiene algunas desventajas tales como la composición microbiana del lodo y la alta acumulación del mismo. Estos inconvenientes implican problemas de operación, altos costos de producción y ambientales (Rittman y McCarty, 1968).

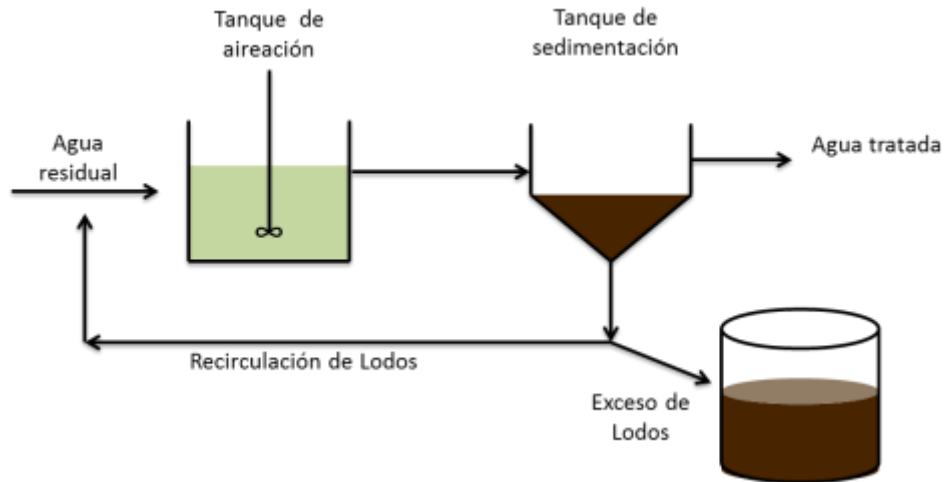


Figura 2.1 Esquema de las unidades del proceso convencional de lodos activados. Modificado de Spearling y Lemos (2007)

2.1.2 Composición y características microbiológicas de lodos residuales

La ecología microbiana y las características de los lodos residuales generados en el proceso de lodos activados, dependen de la composición del agua residual a tratar y el tipo de planta de tratamiento, sin embargo generalmente contienen entre 98.5 a 99.5% de humedad, con un valor típico de 99.2 % (Metcalf y Eddy, 2003). Además de contener metales pesados, también están constituidos por microorganismos como bacterias, virus y parásitos. En la actualidad hay una gran heterogeneidad de procesos para la eliminación de diversas sustancias, las más comunes son compuestos orgánicos e inorgánicos con nitrógeno y azufre en su estructura, los cuales representan sustancias tóxicas. Una gran diversidad de microorganismos emplean distintos mecanismos para efectuar la eliminación de las sustancias antes mencionadas, por lo tanto la ecología microbiana estará regida por los microorganismos que tengan la capacidad de degradar la sustancia en cuestión; sin embargo al ser el carbono orgánico la fuente de energía más abundante, generalmente los microorganismos dominantes en estos procesos son los heterótrofos. La caracterización de las comunidades microbianas que componen estos lodos es compleja; sin embargo, se han realizado algunas investigaciones en

diversos sistemas de lodos activados, para obtener información de las bacterias presentes en distintos procesos como son degradación de hidrocarburos, desnitrificación, anammox, entre otros. En la tabla 2.1 se muestra una serie de bacterias predominantes en diferentes procesos de lodos activados; sin embargo, no son las únicas especies que componen el lodo, como se ha mencionado antes (Kämpfer et al., 1996).

Tabla 2.1 Microorganismos aislados en diferentes procesos de lodos activados, modificada de Lodos Activados - 100 Años y Contando (2014)

Especie	Función	Referencia
<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Procesos Anammox	Strous et al. (2006)
<i>Nitromonas sp</i>	Oxidante de Amonio	Yuichi et al. (2011)
Candidatus <i>Nitrospira</i>	Oxidante de Nitrito	Lücker et al. (2010)
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Filamentosa	Daligault et al. (2011)
Candidatus <i>Microthrix parvicella</i>	Consumidora de lípidos filamentosa	McIlroy et al. (2013)
<i>Tetrasphaera spp.</i>	PAO, denitrifier, fermentador	Kristiansen et al. (2013)
Candidatus <i>Competibacter</i>	GAO, denitrifier, fermentador	Mcilroy et al. (2013)
<i>Pseudomona sp</i>	Degradación de hidrocarburos	Buitron y Gonzalez (1996)
<i>Pseudomona denitrificans</i>	Desnitrificación	Nilsson et al. (1982)

2.1.3 Tratamiento y disposición de lodos residuales

Una desventaja de los sistemas de lodos activados es la alta producción de lodos residuales, ya que estos además de presentar una alta toxicidad para el ser humano y la biota, su adecuada disposición o tratamiento implica un costo muy elevado por los altos volúmenes con que se generan. Para tratar de resolver este problema se han desarrollado una serie de posibles soluciones, como se describe a continuación. El primero es convertir el exceso de lodo en materiales de construcción o de valor agregado, como el carbón activado (Tay et al., 2001; Pan y Tseng, 2001). El segundo es la recuperación de recursos útiles de los lodos, es decir producir combustibles de los subproductos, por ejemplo biogás durante la digestión de lodos residuales o la producción de fertilizantes (Sachdeva et al. 2000; .Stolarek y Ledakowicz, 2005). El tercer enfoque es la gestión innovadora de puntos

de venta existentes para la disposición de lodos(Englande y Reimers, 2001; Hansen et al., 2000), mientras que el último enfoque es disminuir la producción de lodos dentro del proceso de tratamiento de aguas residuales en lugar de un post-tratamiento o la eliminación de los lodos producidos. Este último ha sido muy importante ya que evitar la generación de los lodos dentro del proceso, implica un menor costo que el post tratamiento. Para lograr este objetivo se han desarrollado diversas tecnologías, las cuales se han dividido en dos categorías principales: métodos microbiológicos y fisicoquímicos. En el caso de las estrategias que se han generado para disminuir la producción de lodos, éstas consisten en desviar el sustrato de la asimilación para la biosíntesis, hacia actividades catabólicas y no de crecimiento. Los métodos más utilizados y que se muestran en el esquema de la Fig. 2.2, son: crecimiento por lisis-críptica, desacoplamiento del metabolismo, mantenimiento del metabolismo y la depredación sobre las bacterias.

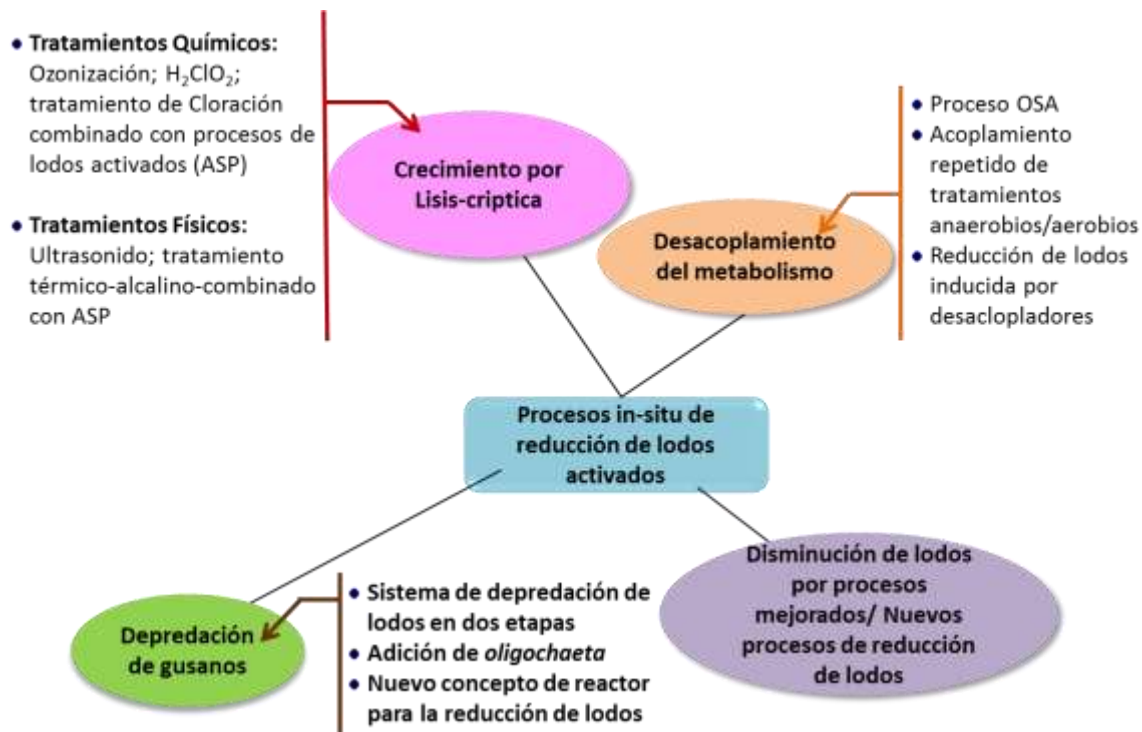


Figura 2.2 Esquema de las tecnologías in-situ de disminución de lodos activados. Modificado de Guo et al., (2013).

Aunque se ha observado una disminución en la producción de lodos cuando se han aplicado estas técnicas, los tratamientos son costosos y tienen un impacto ambiental negativo, debido al uso de sustancias químicas tóxicas como se muestra en la tabla 2.2 (Guo et al., 2013). Por esta razón es importante desarrollar nuevas técnicas para disminuir la generación de lodos.

Tabla 2.2 Ventajas y desventajas de distintas estrategias para la reducción de lodos.

Estrategia	Ventajas	Desventajas e impacto ambiental
Crecimiento lisis-criptica		
Ozonización	Experiencia exitosa a gran escala	Altos costos involucrados en la ozonización; residuos de ozono
Cloración	Más barato que la ozonización	Disminución de la tasa de remoción de DQO, malas características de sedimentación de lodos, formación de THM
Tratamiento térmico o termoquímico	Relativamente simple	Corrosión, posterior neutralización; mal olor
Sistema MBR-ultrasonido	Alta eficiencia de lisis	Energía intensiva
Aumento del oxígeno disuelto (OD)	Simple operación	Alto costo de aireación
Procesos de reducción		
Reactores de membrana de flujo lateral (MBR)	Operación flexible, de alta calidad de los efluentes, ocupa poco espacio.	Altos costos por ensuciamiento de la membrana
Desacoplamiento del metabolismo		
Desacoplador químico	Relativamente simple	Bioaclimatación; tóxico para el medio ambiente
Alto S_0/X_0	Sin adición de materiales y energía	Sólo apto para aguas de alta resistencia
OSA	Sólo la adición de un tanque anaeróbico	Tiempos de alta producción de lodos
Depredación		
Sistema de dos etapas	Operación estable	Altos costos; liberación de nutrientes
Oligoquetos	Relativamente simple	Crecimiento de gusano inestable, liberación de nutrientes

Modificado de Wei et al. (2003)

2.1.4 Reparto del sustrato en el metabolismo microbiano

El metabolismo es la suma de todos los procesos químicos que ocurren dentro de la célula, donde se sintetizan moléculas orgánicas que contienen un alto nivel de energía potencial en forma de enlaces, de los cuales se obtiene energía para los dos procesos metabólicos, denominados catabolismo y anabolismo.

El catabolismo, involucra todos los procesos implicados en la oxidación del sustrato para la obtención de energía en forma de ATP, y el anabolismo es el conjunto de transformaciones para la síntesis de componentes celulares a partir de fuentes de carbono. Por ende, el catabolismo proporciona la energía requerida para el anabolismo y para el movimiento o cualquier otro proceso que requiera energía (Rittman y McCarty, 2001).

Para la obtención de energía ocurren una serie de reacciones químicas de óxido-reducción donde los electrones liberados de la oxidación del sustrato (donador de e^-) son transferidos hacia una molécula (aceptor terminal de e^-) que será reducida (proceso de respiración). Una porción de estos electrones (f_e^0) se transfiere inicialmente al aceptor de electrones para producir energía, a su vez una fracción de esta energía producida (f_s^0) será destinada para la producción de células (biomasa), como se ilustra en la Figura 2.3.

Las suma de las fracciones f_s^0 y f_e^0 dan como resultado la unidad, por lo tanto proporcionan un base para dividir la energía contenida en el sustrato, entre la energía que se usa para el catabolismo (generación de energía) y la síntesis celular. Debido a que este reparto del sustrato está en función de un flujo de electrones que genera energía para las células, se expresa como equivalentes electrónicos (eq e^-).

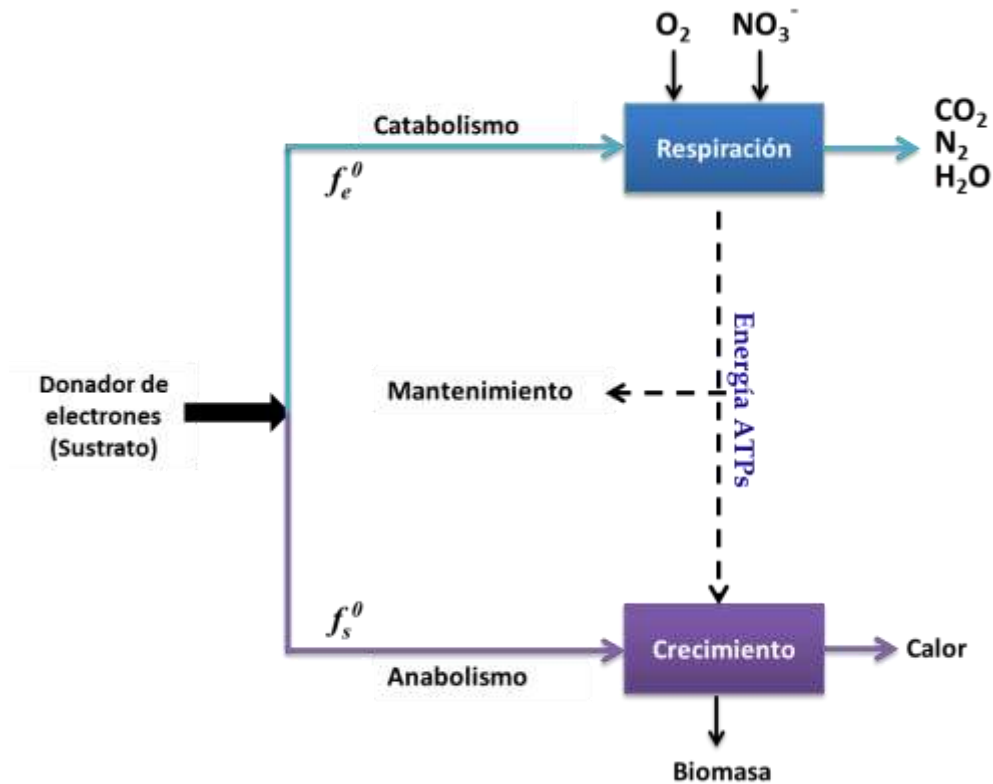


Figura 2.3 Esquema simplificado del reparto de la energía en el metabolismo bacteriano, entre el anabolismo y catabolismo bajo condiciones aerobias y anóxicas. Modificado de Rittman y McCarty (2001)

2.1.5 Rendimiento Celular

La fracción f_s^0 puede expresarse en unidades de masa, tales como g células producidas/g DQO consumido. Cuando la fracción se expresa en unidades de masa, se denomina rendimiento verdadero y se le da el símbolo Y . El valor Y representa el rendimiento de la utilización del sustrato, dado que cuantifica la cantidad de biomasa que puede producirse por unidad de sustrato consumido. La conversión de f_s^0 a Y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{f_s^0 (Mc \text{ g cel/mol cel})}{[(n_e e^- \text{ eq/mol cel})(8 \text{ g COD} / e^- \text{ eq donador})]}$$

Donde M_c es el peso de la fórmula empírica de las células, n_e es el número de equivalentes de electrones en un mol empírico de células, y la masa del donador de electrones se expresa como DQO. Cuando las células están representadas por $C_5H_7O_2N$ y el amonio es la fuente de nitrógeno, el valor de $M_c = 113$ g de células/mol de células y $n_e = 20$ eq/mol de células. Los datos antes mencionados pueden variar en función del microorganismo y la fuente de nitrógeno utilizada.

El rendimiento celular es de suma importancia en los sistemas de lodos activados, debido a que este valor indica la cantidad en kilogramos de lodos que se producirán en el tanque de aireación. Para fines de este trabajo Y , f_s^0 y f_e^0 fueron los parámetros que dieron la pauta para determinar si hubo un cambio en el crecimiento de la bacteria *Ps. denitrificans* (Rittman y McCarty, 2001), después de haber sido estimulada en un campo eléctrico en una celda bioeléctrica, como se explicará más adelante.

2.2 *Pseudomonas denitrificans* como modelo del metabolismo microbiano

En este trabajo se utilizó una cepa pura de *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 como modelo para el estudio del metabolismo microbiano, bajo la influencia de una estimulación eléctrica, y cómo afecta este último su crecimiento.

Ps. denitrificans es una bacteria aerobia, gram-negativa clasificada en la familia de las *Pseudomonadaceae*, del género *Pseudomonas* y pertenece al grupo de las pseudomonas pertucinogénas. *Ps. denitrificans* se conoce por la producción de vitamina B12 en condiciones aerobias y fue aislada por primera vez de la tierra de jardín en Viena, Austria (Brenner et al., 2005). Esta bacteria es un bacilo recto o ligeramente curvado (Figura 2.4) que no forma esporas. Su metabolismo es oxidativo de tipo respiratorio y es anaerobia facultativa, es decir puede respirar oxígeno o nitrato. Esta especie además de ser utilizada industrialmente para la producción de vitamina B12, también es encontrada en sistemas de desnitrificación (ver tabla 2.1) (Marazioti et al., 2003).

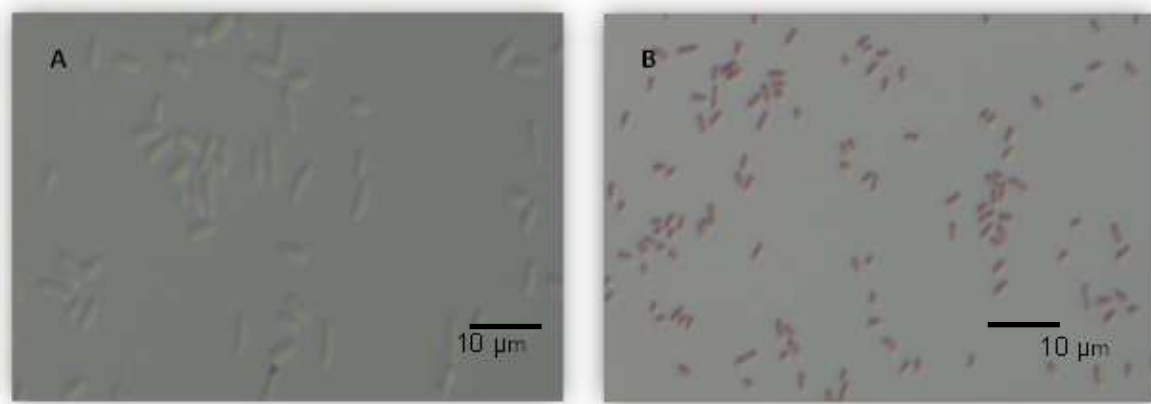


Figura 2.4 Micrografía de microscopio óptico 100x de *Pseudomonas denitrificans*. En la micrografía A se muestra a *Ps. denitrificans* sin tinción, y en la micrografía B se muestra la bacteria teñida, el color rojo corresponde al tipo Gram(-) de la bacteria.

2.2.1 Generalidades del metabolismo

En general las bacterias de género *Pseudomonas* pueden crecer en medios minerales mínimos, con sales de amonio como fuente de nitrógeno y un solo compuesto orgánico como fuente de carbono y energía, algunas cepas pueden requerir pequeñas concentraciones de extracto de levadura para reforzar el crecimiento.

La especie *Ps. denitrificans* fue nombrada y descrita por Bergey et al. (1923), quien le atribuyó las características específicas reportadas por Christensen (1903). Christensen había aplicado el nombre de *Bacillus denitrificans fluorescens* (no publicado válidamente) a dos organismos con diferencias mínimas, pero ambos se caracterizaban por su capacidad desnitrificante, la producción de pigmento fluorescente soluble y su incapacidad en la prueba de licuefacción de gelatina. Sin embargo, existen diversos estudios en donde han utilizado cepas identificadas como *Ps. denitrificans* con características diferentes. Los problemas en su clasificación taxonómica han provocado confusiones nutricionales entre diversas cepas de *Ps. denitrificans* y se han reportado condiciones nutricionales diferentes para cada una.

Por tratar de resolver esta polémica Doudoroff y colaboradores (1974) realizaron un estudio de 18 cepas con características similares para tratar de aclarar estos errores en la clasificación de *Ps. denitrificans*. Dentro de las cuales NCIB 9496 (ATCC 13867, cepa utilizada en este estudio) clasificadas como *Pseudomonas denitrificans*; esta cepa hidroliza gelatina y no produce pigmentos solubles; puede utilizar glucosa, fructosa, gluconato, lactato, acetato, entre otros, como fuente de carbono y energía. NCIB 9496 no puede consumir hexadecano, fenol, naftaleno, metanol, etc como fuentes de carbono o energía. Aún así existen estudios donde se reporta que *Ps. denitrificans* ATCC 13867 puede utilizar metanol como fuente de carbono y energía, sin embargo, Wang et al, (1995) menciona que hay cepas que pueden utilizar metanol como fuente de energía, pero no como fuente de carbono. Debido a esta disparidad en lo reportado en la literatura, en este trabajo se hicieron pruebas con distintas fuentes de carbono como se describe en el capítulo cuatro.

2.2.2 Reacciones redox y la escala de potencial eléctrico

Como se mencionó en la sección anterior, *Ps. denitrificans* es una bacteria facultativa que tiene la capacidad de respirar oxígeno o nitrógeno. Además es una bacteria heterótrofa que a partir de la oxidación de fuentes de carbono orgánicas, genera energía en forma de ATP, energía necesaria para su crecimiento y/o mantenimiento. El mecanismo para obtener dicha energía, implica una serie de reacciones químicas de óxido-reducción, mediante las cuales el sustrato o donador de electrones se oxida. Cuando el donador de electrones se oxida, cede electrones que pueden ser captados por una serie de aceptores intermediarios (transportadores) antes de llegar al aceptor final.

Una forma práctica de visualizar esta cadena de transferencias electrónicas, es mediante la representación de una escala vertical de los potenciales redox asociados con los respectivos pares redox (aceptor/donador) involucrados en la cadena de transferencia de electrones, la cual se muestra en la Figura 2.5. Mientras mayor sea la diferencia de potenciales redox ($\Delta E_0'$) entre el donador y el aceptor de

electrones, mayor será la energía liberada (ΔG^0); en otras palabras, el $\Delta E_0'$ es proporcional al ΔG^0 , es decir, la cantidad de energía liberada de estas reacciones, está en función de la naturaleza del donador y aceptor de electrones; como ejemplo el par $2H^+/H_2$ tiene un potencial de reducción de -0.42 V (bajo condiciones estándar), mientras que para el par $\frac{1}{2} O_2/H_2O$ es de 0.82 V, por lo tanto la oxidación del H_2 (donador de e^-) se acoplará a la reducción del O_2 (aceptor de e^-) liberando una energía libre de -237 kJ. En el caso de que no haya oxígeno en el medio, las bacterias facultativas, como *Ps. denitrificans*, pueden usar NO_3^- como aceptor final, sólo que la energía liberada es menor, de -163 kJ. Es por esta razón que el oxígeno es el aceptor final de electrones más utilizado por las bacterias (Madigan et al. 2010). Para fines de esta investigación sólo se utilizó al oxígeno como aceptor final de electrones.

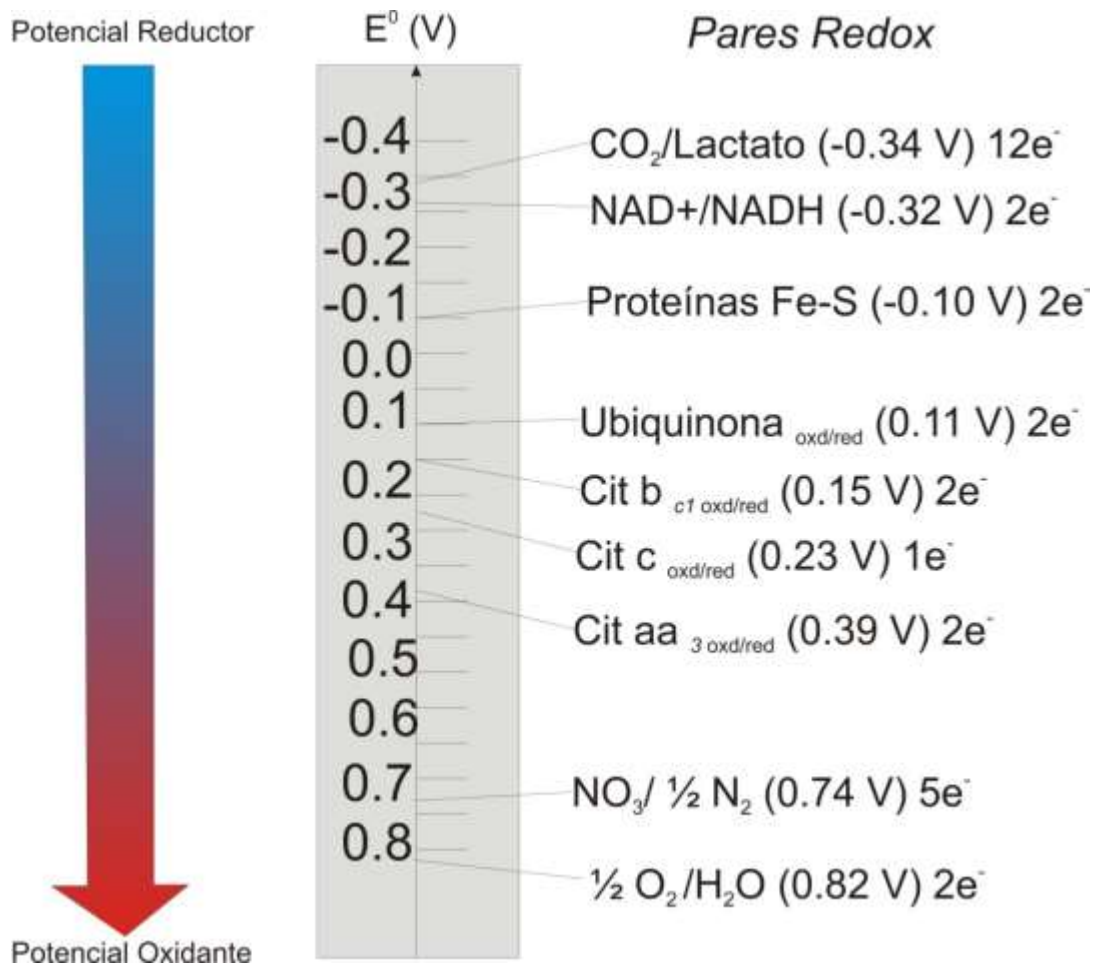


Figura 2.5. Escala de potenciales redox de los pares involucrados en la cadena de transporte electrónico de las bacterias aerobias facultativas. Modificado de Madigan et al. (2010).

2.2.3 Transportadores de electrones en la membrana celular

El primer paso en el proceso de respiración de oxígeno en bacterias desnitrificantes facultativas, como *Ps. denitrificans*, es la oxidación del donador de electrones (Lactato), mediante la glucólisis y ciclo de Krebs, que dará paso a la formación de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), un transportador de protones; estos protones serán transferidos al siguiente transportador que forma parte de una cadena de transporte electrónico, como se observa en la siguiente Figura 2.6.

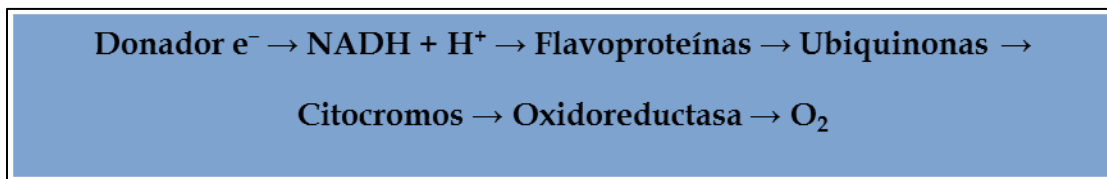


Figura 2.6 Posible ruta de transporte electrónico para bacterias aerobias facultativas.

El transporte de electrones o movimiento del potencial reductor es fundamental en el metabolismo celular; cada tipo de microorganismo debe emplear una estrategia de generación de energía para sobrevivir. Las rutas donde se produce más energía, involucran el establecimiento de una fuerza motriz de protones a través de la membrana citoplasmática para la formación de ATP. Esta membrana está conformada por diferentes complejos de proteínas transportadoras de electrones. Para el caso de bacterias aerobias facultativas como *Ps. denitrificans* la NADH deshidrogenasa, el complejo de quinonas, el complejo III y el citocromo C, constituyen la cadena de respiratoria, como se muestra en la Figura 2.7.

El Complejo I consta de hasta 14 subunidades, donde los electrones se transfieren del NADH (-0.32 V) a la Flavin-mono-nucleótido (FMN), que está compuesto por nueve grupos de hierro asociado al azufre y, finalmente, se transfieren al grupo de ubiquinonas (+0.113 V) (Berrisford et al. 2016).

El cambio conformacional durante el transporte de electrones conduce a la translocación de cuatro protones sobre la membrana celular por cada par de electrones y la reducción de las quinonas acarrea dos protones adicionales del citoplasma (Efremov y Sazanov, 2011).

El complejo III transporta los electrones de las ubiquinonas dentro de la membrana hasta el citocromo c (+0.23 V) en el periplasma (Sazanov y Hinchliffe 2006). Los protones producidos durante la oxidación de los quinoles se liberan en el periplasma (Mitchell 1975). El complejo IV transfiere los electrones del citocromo C (+0.23 V) o ubiquinonas (+0.113 V) a oxígeno (O_2 , +0.8 V). Tres enzimas no homólogas realizan este paso: (a) miembros de la superfamilia hemo-cobre oxidasa, (b) las citocromoxidasas del tipo bd y (c) la oxidasa alternativa. Se requieren cuatro protones para la reducción de oxígeno hasta agua, los cuales son extraídos del citoplasma y contribuyen a la fuerza motriz de protones (Planck et al. 1995, Svensson-ek et al. 2002) Las variedades del complejo IV difieren en su afinidad por el oxígeno. Se utilizan oxidasas terminales de alta afinidad (por ejemplo, las reductasas de oxígeno con grupo hemo cobre de tipo bd y de hembras de cbb3) por microorganismos microaeróbicos.

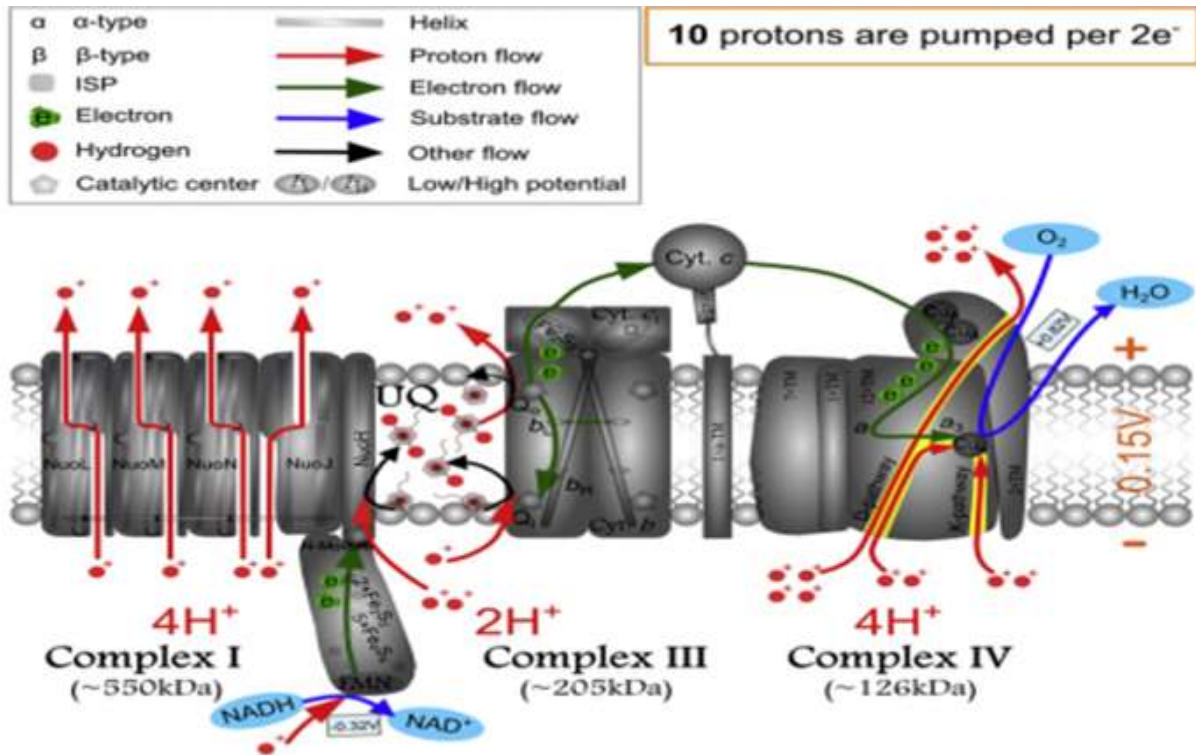


Figura 2.7 Cadena de transporte electrónico para la respiración aerobia de *Pseudomonas*, modificado de Chen y Strous, 2013.

2.3 Efecto de una corriente eléctrica en los microorganismos

Recientemente se han reportado estudios acerca del efecto de un campo eléctrico en el metabolismo de microorganismos, mediante un estímulo eléctrico en forma de una corriente o de un potencial eléctrico. Se ha observado que la respuesta a este estímulo depende del tipo de microorganismo y la naturaleza de su metabolismo. Lageman et al. (1995), observó que al aplicar una corriente eléctrica de 20 amperios en suelos de baja permeabilidad, se presentó un incremento en el crecimiento microbiano, sin efectos perjudiciales observables.

Mientras que Velasco-Alvarez y colaboradores (2011) demostraron que al aplicar una corriente eléctrica de baja densidad (0.42 mA/cm²) por 24 horas sobre *Aspergillus niger* se presentó un estímulo en el metabolismo catabólico (no asimilativo), por la corriente eléctrica impuesta en una celda electroquímica, a pesar de los cambios de pH generados en el medio electrolítico. Este efecto fue

ligado a la disminución de la producción de biomasa, al aumento transitorio de la producción de ATP y a un aumento en la degradación de hexadecano como sustrato modelo, en comparación con un sistema control sin corriente eléctrica.

Thrash y colaboradores, (2007) observaron la degradación de perclorato con eficiencia de 100% en un reactor bioeléctrico en comparación con un grupo control sin corriente eléctrica. Por lo tanto, se puede apreciar que hay evidencias de la estimulación eléctrica del metabolismo de los microorganismos. En la Tabla 2.3 se integran algunos estudios con diferentes voltajes o densidades de corriente eléctrica aplicados, y el tipo de respuesta que presentó el microorganismo al estímulo eléctrico.

Tabla 2.3 Estudios de sistemas bioelectroquímicos, aplicando diferentes intensidades de corriente, modificado de Velasco-Álvarez (2011)

Microorganismo	Resultado	Corriente	Referencia
<i>Consortio microbiano</i>	Crecimiento microbiano 50% más	1.5 V	Shin et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i>	Estimulación en la síntesis de ATP	22.5 V/m	Lageman et al, 1995
<i>Dechlorospirillum</i>	Incremento en la degradación de perclorato	0.42 mA/cm ²	Thrash et al, 2007
<i>Aspergillus niger</i>	Disminución del crecimiento	0.42 mA/cm ²	Velasco-Álvarez et al, 2011

2.3.1 Reactores bioeléctricos

La estimulación del metabolismo microbiano por electricidad se conoce desde hace más de 50 años. El primer estudio reportó la oxigenación del medio, mediante la generación anódica de oxígeno, por electrólisis del agua en 1956. En este tipo de estudios se han utilizado reactores bioeléctricos (RBEs), denominados de este modo, para hacer una distinción de las celdas microbianas de combustible (MFC) (Thrash y Coates, 2008), dado que en una MFC, se crea una diferencia de potencial, y la corriente que fluye a través de una celda electroquímica, la cual se genera por el metabolismo microbiano implicado en la oxidación del sustrato, dicho de otra

forma son un análogo a las baterías químicas; por el contrario, en los RBEs se impone un campo eléctrico a los microorganismos con bajas densidades de corriente o bajas tensiones a través de una celda electrolítica, con el fin de estimular a los microorganismos que se encuentran en un medio de crecimiento el cual a su vez también cumplen la función de ser un sistema electrolítico que provee de la conductividad iónica necesaria para cerrar el circuito eléctrico. Lo que se busca evitar con en estos sistemas es la interacción del microorganismo con el electrodo, ya sea directa o indirecta; icho de otra forma los microorganismos de este sistema no respiran el electrodo, no lo utilizan como un aceptor de electrones, ni intercambian electrones con el electrodo a partir de mediadores redox, como puede ocurrir en las técnicas que forman parte de los sistemas bioelectroquímicos (SBEs).

2.3.2 Aplicación de los reactores bioeléctricos

Los RBEs se han aplicado para distintos propósitos, sin embargo en este estudio sólo nos centraremos en estudiar los trabajos que estudian el efecto del campo eléctrico sobre el crecimiento de los microorganismos (2.4). Yin y colaboradores, (2015), estudiaron el efecto de un campo eléctrico sobre la actividad de oxidación anaerobia de amonio, utilizando bacterias tipo anammox, para la eliminación de nitrógeno. Durante el estudio aplicaron 2 V/cm a distintos intervalos de tiempo, durante 24 h. Para ello utilizaron 2 reactores de flujo ascendente denominados R2 y R3, a los cuales les aplicaron 2h continuas y una hora de descanso, y 9 horas continuas y 3 de descanso respectivamente. Posterior a la aplicación del estímulo eléctrico, observaron un aumento en la oxidación de amonio de 21.9% para R2 y 38.7% para R3, con respecto al control (R1), es decir sin campo eléctrico. Además, se demostró que el aumento de la actividad fue debido a un estímulo en la actividad enzimática, aunado a un incremento en la biomasa. En este caso, el paso óptimo fue la aplicación pausada (en intervalos cortos de tiempo) del campo eléctrico.

Sin embargo Parvanova y Beschkov, (2009) observaron una reacción diferente, puesto que ellos realizaron un estudio en *Ps. denitrificans* bajo la influencia de un campo eléctrico, y observaron un aumento en la desnitrificación, sin que se presentara un incremento en la biomasa, sin embargo las condiciones bajo las que se llevó a cabo el experimento no fueron iguales, dado que en este estudio utilizaron un reactor de tanque agitado, el tiempo de aplicación del potencial fue continuo y utilizaron una cepa pura en lugar de un consorcio.

Por lo antes mencionado, se puede notar que los resultados que se obtengan después de una estimulación eléctrica van a depender de múltiples variables que aún no se han logrado estandarizar, ya que el efecto sobre el metabolismo microbiano después de la imposición de una corriente/potencial no solo dependerá del tiempo de exposición al potencial o corriente, material de electrodo o la intensidad del potencial o corriente aplicado, sino también depende de la especie de microorganismo o comunidad de microorganismos. Por lo tanto hace falta estudiar a fondo el impacto que tiene cada una de estas variables sobre estos sistemas.

Tabla 2.4 BER y REBs aplicados en diferentes procesos y configuraciones para la estimulación del metabolismo microbiano

Tratamiento	Organismo	Tipo de reactor	Volumen	Cátodo	Ánodo	Corriente	Voltaje	Tiempo de aplicación	Año	Referencia
Anaerobia/ Metanogénesis y succinogénesis	<i>A. succinogenes</i> <i>strains</i>	dos cámaras	0.1 L	Grafito	Malla de grafito	0.3-10 mA	1.5 V	Continua	1999	Park et al. (1999)
Anaerobia/Respira- ción electrolítica	<i>T. ferrooxidans</i>	dos cámaras	1 L	Carbón	Malla de Pt	10-15 mA	400 mV	Continua	2002	Natarajan (1992)
Anaerobia/Desnitri- ficación	<i>Pseudomonas</i> <i>denitrificans</i>	una cámara	0.75 L	Acero	Acero	n/a	0.1 V	n/a	2004	Beschkov et al. (2004)
Fermentativo	<i>Enterobacter</i> <i>dissolvens</i>	una cámara	0.1 L	Platino y grafito	Platino y grafito	< 20 mA	n/a	12 h y 24 h	2006	She et al. (2006)
Anaerobio/Reducción de Perclorato	<i>Dechloromonas</i> <i>agitata</i> , <i>D.</i> <i>aromatica</i> , and <i>Azospira suillum</i>	una cámara	0.25 L	Grafito	Grafito	n/a	-450 mV	n/a	2007	Thrash et al. (2007)
Anaerobia/Desnitri- ficación	<i>P. denitrificans</i>	dos cámaras	0.5 L	Acero	Acero	n/a	-0.06 y 0.02 V	n/a	2009	Parvanova y Beschkov (2009)
Anaerobia/Metano- génesis	<i>Methanobacterium</i> <i>palustre</i>	una cámara	0.4 L y 0.3 L	Tela de carbón	Cepillo de grafito	n/a	-0.7 a - 1.2 V	Continua	2009	Cheng et al. (2009)
Anaerobia/Metano- génesis	Lodo de un digestor anaerobio termófilo	una cámara	0.25 L	Placa de carbón	Placa de carbón	n/a	0.3-0.8 V	24 h	2010	Sasaki et al. (2010)
Anaerobia/Anamox	<i>Anammox bacteria</i>	una cámara	0.5 L	n/a	n/a	n/a	2 V/cm	24 hrs.	2014	Qiao et al. (2014)
Anaerobia/Anamox	<i>Anammox bacteria</i>	una cámara	0.5 L	n/a	n/a	n/a	2 V/cm	6 h/día, y 18 h/día	2015	Yin et al. (2015)

2.3.3 Factores que afectan el rendimiento de los reactores bioeléctricos

Debido a que el objetivo final de los reactores bioeléctricos es estimular el metabolismo con bajas densidades de corriente para evitar la interacción con los electrodos, la eficacia de la estimulación está determinada por las reacciones que pudieran ocurrir en este. Es decir el mecanismo de interacción genético y bioquímico exacto entre los microorganismos y el electrodo aún es desconocido, debido a su complejidad, sin embargo, el potencial aplicado en las celdas debe ser en un intervalo donde no puedan llevarse a cabo reacciones de electrolisis sobre la superficie de electrodo. Estas reacciones redox pueden influir de manera importante sobre el comportamiento metabólico de los microorganismos independiente al estímulo eléctrico. La ocurrencia de dichas reacciones abióticas están en función del material del electrodo y el medio electrolítico. En la Tabla 2.4 se enlistan las reacciones de electrólisis más comunes en la superficie del electrodo y sus correspondientes valores de potencial redox estándar al que se llevan a cabo. Una reacción frecuente es la electrólisis del agua, que puede tener efectos sobre el pH debido a la formación de iones H^+ u OH^- ; además que algunos microorganismos pueden utilizar el hidrógeno, liberado de la oxidación catódica del agua, como fuente de electrones. Por otro lado, el peróxido de hidrógeno y gas de cloro, son potentes inhibidores del metabolismo de algunos microorganismos (Bard et al. 1944; Sadoff et al. 1956; Sethuraman et al. 2008).

Tabla 2.5 Reacciones abióticas típicas sobre la superficie del electrodo. Modificada de Thrash y Coates, (2008) .

Reacción	E° (V) vs SHE	Referencia
$O_{2(g)} + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	1.23	Bard et al. (1944)
$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_{2(g)} + 2OH^-$	-0.828	Bard et al. (1944)
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_{2(g)}$	0	Bard et al. (1944)
$O_{2(g)} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	0.695	Bard et al. (1944)
$Cl_{2(g)} + 2e^- \rightarrow 2Cl^-$	1.358	Bard et al. (1944)
$CO_{2(g)} + 4H^+ + 4e^- \rightarrow C + 2H_2O$	-0.213	Kinoshita et al. (1988)

Aunado a lo anterior es imperante hacer un estudio electroquímico para evitar la generación de estas reacciones y así minimizar en la medida de lo posible las reacciones farádicas o de transferencia de carga abióticas, y aquellas en las que se pudiera inducir la respiración del microorganismo sobre el electrodo, ya que no es lo que se pretende con estos sistemas.

3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

Existen estudios donde se demuestra que la aplicación de un campo eléctrico puede incrementar o disminuir la producción celular de una población microbiana o cepa, además también se ha reportado un incremento en el consumo del sustrato o DQO, resultado de la estimulación eléctrica. En estos trabajos se presentan distintas respuestas al estímulo del campo eléctrico, dicha respuesta está en función del microorganismo o microorganismos utilizados, la intensidad de corriente o el voltaje aplicado, tiempo de exposición al campo y configuración del sistema bioeléctrico. Al ser un sistema complejo, comprender lo que pasa dentro del organismo celular es difícil y hasta el momento no se ha reportado un análisis o descripción del por qué se modifica el metabolismo microbiano. En algunos estudios se ha especulado que el potencial aplicado modifica la actividad enzimática de las bacterias o la cadena respiratoria, ya que ambas trabajan a un potencial eléctrico determinado. Sin embargo no se han realizado estudios que lo demuestren. Entender lo que sucede en estos sistemas podría ayudar a optimizar los sistemas bioeléctricos y así desarrollar tecnologías que en un futuro cercano, puedan ayudar a resolver problemas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, tal como el de lodos activados.

3.2 Hipótesis

La aplicación de un potencial eléctrico sobre *Pseudomonas denitrificans*, a través de un reactor bioeléctrico, causara un efecto en los procesos de transferencia de carga en la cadena de transporte de electrones, modificando el reparto de los mismos. Esta modificación se verá traducida en la disminución del rendimiento celular, así como en el aumento de la fracción de equivalentes electrónicos hacia la producción de energía, dicho en otras palabras el metabolismo será desviado hacia reacciones de tipo catabólico más que de tipo anabólico.

3.3 Objetivos

3.3.1 Generales

Evaluar y comprender los cambios en el metabolismo y crecimiento de *Pseudomonas denitrificans* en respuesta a la estimulación mediante la aplicación continua de un pulso de potencial eléctrico, bajo condiciones aerobias.

3.3.2 Específicos

1. Determinar la influencia del tipo de sustrato en el crecimiento de *Pseudomonas denitrificans*
2. Evaluar la influencia del medio mineral de crecimiento de *Pseudomonas denitrificans* en el sistema electrolito-electrodo en una celda electroquímica, para establecer las condiciones de estimulación eléctrica adecuadas.
3. Evaluar el efecto del grado del estímulo eléctrico en la cinética de crecimiento de *Pseudomonas denitrificans* en condiciones aerobias.
4. Realizar un análisis de balance energético y rendimiento celular de la bacteria.

4. Materiales y Métodos

En este capítulo se describen las condiciones experimentales así como las diferentes técnicas y metodologías utilizadas para alcanzar los objetivos de este trabajo. Este capítulo se divide en tres secciones. En la primera parte se describen los materiales biológicos. En la segunda parte se explica el tipo de celda bioeléctrica empleada y la manera en la que se seleccionaron los estímulos eléctricos. Por último, en el tercer apartado, se describe la estrategia experimental para el estudio del sistema bioeléctrico.

4.1 Materiales Biológicos

4.1.1 Inóculo

La cepa utilizada como modelo para este estudio fue *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867, seleccionada por su metabolismo facultativo y debido a que ha sido utilizada previamente en estudios con reactores bioeléctricos. La cepa se adquirió liofilizada, dentro de un vial de vidrio. Para re-hidratarla se siguieron las recomendaciones de la American Type Culture Collection. Al vial se le añadieron 0.5 mL de caldo nutritivo compuesto por 5 g/L triptona y 3 g/L de extracto de carne y se mezcló con agitación suave. Toda la suspensión fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 6 mL de caldo nutritivo, este tubo se denominó tubo primario. De dicho tubo se tomó 1.0 mL de muestra para inocular 5 tubos secundarios; además del tubo primario se transfirieron varias gotas a una placa petri con agar nutritivo. Los tubos secundarios y las placas se incubaron por 24 horas a 30 ± 1 °C para promover el crecimiento de la biomasa. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se retiraron de la incubadora para su conservación. Cuatro de los tubos secundarios se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL con una solución de glicerol (50% v/v) considerando que en cada uno de estos tubos se colocaron 0.5 mL de la biomasa, estos tubos son preservados a una temperatura de -85 °C. Por otro lado, se repitió el proceso anterior para un quinto tubo secundario para su conservación a -22 °C. Dichos tubos eppendorf fueron se emplearon como

fuente de inóculo para los experimentos bioelectroquímicos. Por último, las cajas de petri fueron selladas y almacenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para utilizarlas como fuente de inóculo en los estudios del desempeño de *Ps. denitrificans*. Todo el proceso se efectuó dentro de una campana de flujo laminar para conservar condiciones estériles.

4.1.2 Medio de cultivo

Ps. denitrificans fue cultivada en medio líquido sintético (medio mínimo mineral), cuyos componentes se muestran la Tabla 4.1. Este medio mínimo mineral fue utilizado para la obtención de biomasa y en los experimentos realizados en la celda bioelectroquímica, el pH se ajustó a 7. El medio fue separado en dos lotes antes del tratamiento en autoclave para evitar las reacciones químicas entre los diversos nutrientes como lo ha reportado (Kornaros et al. 1996).

Tabla 4.1 Medio de cultivo para *Ps. denitrificans*

	Componentes	g/L
1.- Sales Inorgánicas	NaCl	5
	NH ₄ Cl	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.026
	Metales Traza	0.50%
	Extracto de levadura	2
2.- Buffer de fosfatos	K ₂ HPO ₄	5
	KH ₂ PO ₄	1.5
Fuente de carbono	Lactato (C ₃ H ₅ O ₃ ⁻)	2
Aceptor de electrones	Oxígeno (O ₂)	exceso

Una gota de una solución 0.5% (p/v) de cada uno de los siguientes metales traza: CuSO₄, FeCl₃, FeCl₂, Na₂MoO₄·2H₂O.

4.2 Métodos electroquímicos

4.2.1 Reactor cilíndrico rotatorio

Para el tratamiento electroquímico inicialmente se propuso un biorreactor que fue adaptado con un electrodo cilíndrico rotatorio de acero inoxidable como electrodo de trabajo (cátodo), una carcasa de acero inoxidable como contra electrodo (ánodo) y un puerto para insertar un electrodo de referencia. El reactor cilíndrico rotatorio (RCR) tiene una capacidad de 1 litro, cuenta con un sistema de recirculación para mantener la temperatura y un puerto para la aireación. El RCR debería cerrar herméticamente sin embargo durante su funcionamiento ocurrieron una serie de fugas e inconvenientes para esterilizarlo, dichas fallas se discutirán en el capítulo de los resultados.

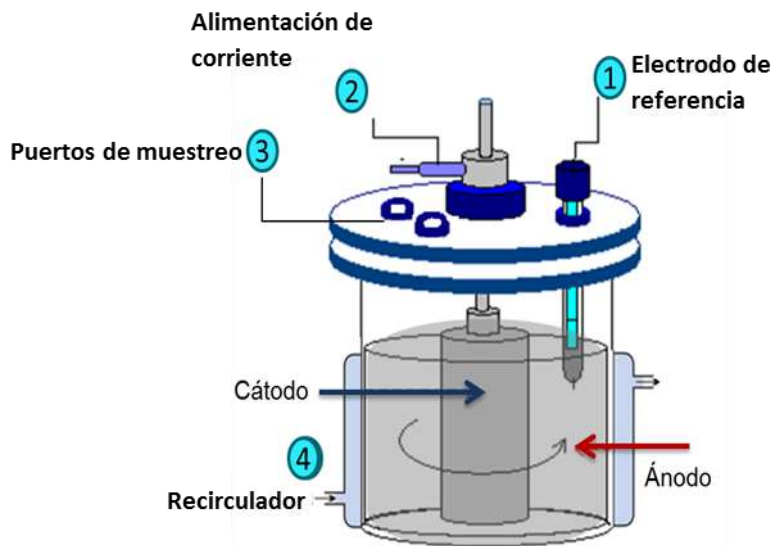


Figura 4.1 Configuración del reactor bioelectroquímico

4.2.2 Celda con arreglo de tres electrodos

Por causa de las dificultades que se tuvieron con el reactor bioelectroquímico rotatorio, se decidió emplear una celda electroquímica de menor volumen, 100 mL, con arreglo de tres electrodos, donde el cátodo y el ánodo fueron placas de acero inoxidable que se colocaron de forma paralela, en las paredes de la celda; el

tamaño de los electrodos para el caso del cátodo fue de 1.2 cm², y para el ánodo de 30 cm². El área se impuso de esa forma para tratar de simular el área de los electrodos en el reactor rotatorio. Dicha celda soporta temperaturas y presiones de una autoclave para cumplir con los parámetros de esterilidad que se requiere para trabajar con una cepa pura. En la parte superior, la tapa es hermética y cuenta con orificios para colocar los tres electrodos. Las placas de acero inoxidable se colocaron de manera paralela aislando las caras posteriores de las placas, para que solo las caras frontales estuvieran en contacto con el medio electrolítico. Como electrodo de referencia se utilizó un sistema de Ag|AgCl|NaCl 3 M, el cual se colocó dentro de una prolongación de vidrio (puente) que contenía el mismo medio electrolítico sin microorganismos. En el puerto de la base de la celda se colocó un burbujeador para la aireación del sistema.

4.2.3 Potenciostato/Galvanostato

Para la aplicación del potencial eléctrico en los sistemas bioeléctricos, se utilizó un Potenciostato/Galvanostato, modelo VMP3 Bio-logic SAS controlado por el software EC-Lab versión 10.23. Este equipo se utilizó en modo potenciostato, ya que permitió imponer un potencial controlado en el electrodo de trabajo, respecto del electrodo de referencia. En la Figura 4.2 se observa cómo se acopla la celda electroquímica al equipo mencionado.

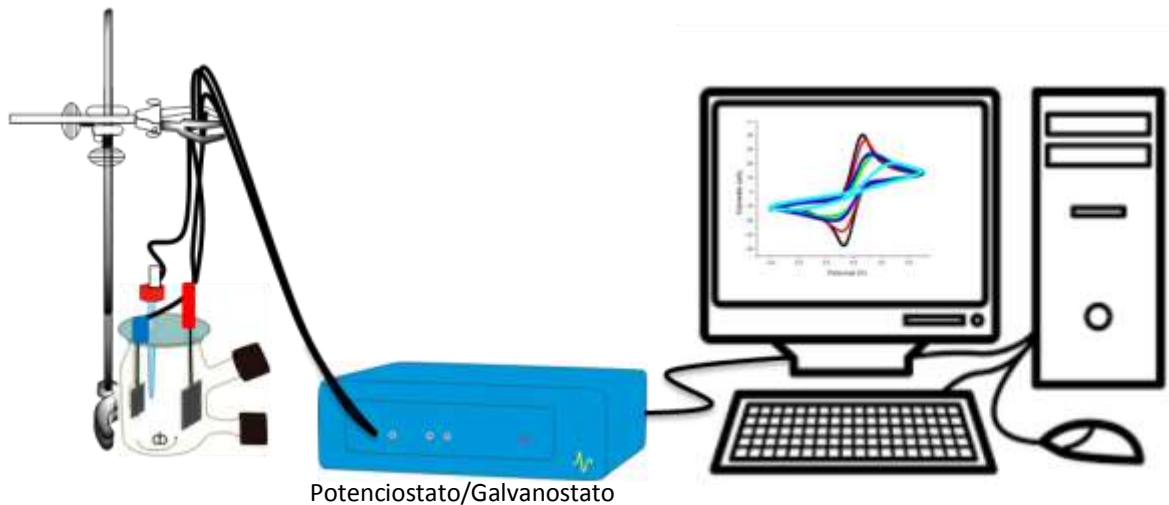


Figura 4.2 Sistema bioeléctrico con arreglo de tres electrodos conectado a un potencióstato

4.3 Estrategia experimental

En la Figura 4.3 se presenta un diagrama de flujo que resume la estrategia experimental seguida en el desarrollo de esta investigación. El trabajo se realizó en tres etapas: la primera fue una parte biótica, la segunda sección fue abiótica y la tercera fue el sistema bioeléctrico. En la primera etapa se realizó la selección del medio mínimo mineral y el sustrato como fuente de carbono y energía para *Ps. denitrificans*, a través de la evaluación de su crecimiento. En la segunda fase se hizo un estudio de la ventana de electroactividad del medio mineral mínimo, y la selección de los potenciales eléctricos. Durante la tercera etapa, los potenciales eléctricos seleccionados fueron aplicados a los cultivos, cuantificando el consumo de lactato y la producción de biomasa.

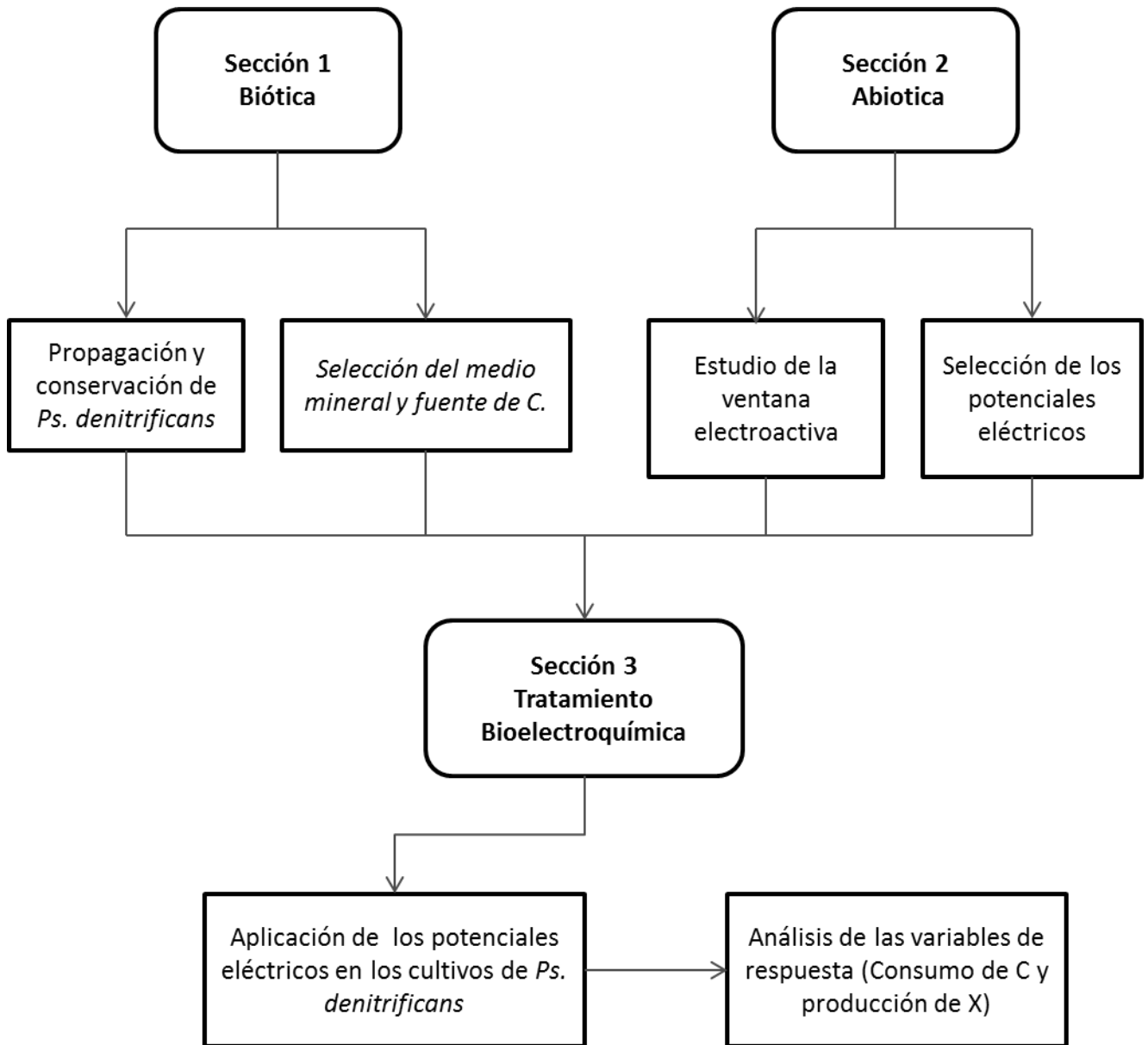


Figura 4.3 Esquema de las etapas de la estrategia experimental

4.3.1 Propagación y conservación de la cepa

Para la propagación de *Ps. denitrificans*, se descongeló uno de los tubos eppendorf que había sido preservado a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. El contenido del tubo fue transferido a un tubo de ensayo con 4 mL de caldo nutritivo (Ver sección 4.1.1). El tubo se incubó durante 24 h a $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación y temperatura constante. Pasadas las 24 h de incubación, con un asa microbiológica se tomaron varias muestras del tubo para

resembrarlas por estría en cajas de Petri, que contenía agar nutritivo. Después las cajas se incubaron durante 24 h a 30 ± 1 °C. Estas cajas de Petri se conservaron a -4 °C; para su posterior utilización ya que fueron la fuente de inóculo de los precultivos como se describe a continuación. Al cabo de una semana, las cajas se desechaban y el procedimiento se repetía. Todo el proceso se efectuó dentro de una campana de flujo laminar para conservar condiciones estériles.

4.3.1.1 Métodos de inoculación

Todos los experimentos con y sin potencial eléctrico, se hicieron en lote y fueron inoculados a partir de stocks en placas de agar almacenadas a -4 °C. Con un asa se tomó una colonia de la placa y se inoculó en un matraz erlenmeyer de 125 mL para su propagación. El matraz contenía 75 mL del medio mineral mínimo y lactato como única fuente de carbono y energía; se incubó con agitación constante a 30 ± 1 °C, bajo condiciones aerobias. Después de que las células alcanzaban la etapa exponencial, se tomaba una porción de este matraz denominado preinoculo, y se transfería a la celda, reactor o matraz en una proporción de 10% con respecto al volumen de trabajo.

4.3.1.2 Selección del medio de cultivo

Estos ensayos se desarrollaron en lote, bajo condiciones aerobias y anóxicas. En el caso de las condiciones aerobias se inocularon tres matraces erlenmeyer con 80 mL de medio mineral sin levadura, 3 matraces con 80 mL de medio mineral con extracto de levadura y metanol como única fuente de carbono y energía para ambos casos. Para los experimentos en condiciones anóxicas se colocaron los mismos sistemas que los aerobios, pero con 0.5 g/L de NO_3^- como aceptor de electrones, en botellas serológicas de 120 mL con un volumen de trabajo de 70 mL y atmosfera de argón. Ambos sistemas aerobios y anóxicos se incubaron durante 24 horas a una temperatura 30 ± 1 °C y agitación constante. Durante la incubación

se siguió el crecimiento, y se tomaron muestras de 1 mL cada 3 horas, con una jeringa previamente esterilizada.

4.3.2 Selección de fuente de carbono y energía

Las fuentes de carbono empleadas en este ensayo fueron, acetato, lactato, glucosa y metanol, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a lo reportado por Doudoroff et al (1974). Estas pruebas se efectuaron bajo condiciones aerobias y anóxicas. Para el caso de los experimentos aerobios se inocularon cuatro matraces Erlenmeyer de 125 mL, ajustándolos a un volumen de 80 mL. El contenido del matraz fue medio mineral mínimo y las cuatro fuentes de carbono antes mencionadas (una en cada matraz), a una concentración de 10 mM. Para los ensayos en condiciones anóxicas se colocaron los mismos sistemas antes mencionados, pero utilizando botellas serológicas de 120 mL, ajustadas a un volumen de trabajo de 70 mL, además se añadió 0.5 g/L de NO_3^- como aceptor final de electrones y una atmosfera de argón para desplazar el oxígeno. Ambos sistemas se incubaron por 24 horas a una temperatura de 30 ± 1 °C y agitación constante.

4.3.3 Estudio de la ventana de electroactividad del sistema electrodo/electrolito

Para evaluar las posibles reacciones de transferencia de carga en el medio electrolítico (medio mínimo mineral) y los potenciales eléctricos a los cuales ocurre la oxidación de los electrodos, se hizo un estudio voltamperométrico para evaluar la ventana de electroactividad en el sistema. Los experimentos se realizaron en la celda electroquímica (Figura 4.2), con un volumen de trabajo de 80 mL. La celda contenía 2 g/L de lactato y la solución con medio mineral saturada de oxígeno. Para la obtención de los voltamperogramas, se realizaron barridos de potencial a partir del potencial de circuito abierto, en sentido catódico hasta alcanzar diferentes potenciales de inversión $E_{\lambda} = -1.0$ y 0.0 V, -0.5 a 0.0 V, -1.0 a 1.0 V, y -0.5 a 0.5 V. De igual manera, se efectuaron distintos barridos de potencial a partir del potencial de circuito abierto, en sentido anódico, en

función de los siguientes valores de potenciales de inversión $E_{\lambda} = 1.0$ a 0.0 V, 0.5 a 0.0 V, 1.0 a -1.0 V, y 0.5 a -0.5 V, todos a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

4.3.4 Selección del potencial eléctrico

Para determinar el intervalo de potencial eléctrico que se aplicó en los sistemas bioeléctricos, se hizo una curva de polarización. Los experimentos se realizaron en la misma celda con arreglo de tres electrodos con un volumen de trabajo de 80 mL. La celda contenía 2 g/L de lactato y solución con medio mineral saturada de oxígeno. Durante el ensayo se midió la temperatura y se mantuvo una agitación constante de 1000 rpm, con un agitador magnético de 0.5 cm de largo y 0.2 cm de ancho. Para la obtención de la curva de polarización, se aplicó un barrido de potencial lineal de 0 a 1.5 V, a una velocidad de barrido de 0.2 mV/s. De este experimento se obtuvo una gráfica de corriente eléctrica (mA) vs potencial de celda (V), que se utilizó para determinar los potencial eléctrico que se aplicaron en el sistema bioeléctrico.

4.3.5 Experimentos control

Antes de realizar los experimentos bioelectroquímicos se hicieron pruebas en el reactor rotatorio para establecer las condiciones óptimas de operación y se hicieron ensayos control abióticos para descartar la reducción electroquímica de lactato, y ensayos bióticos para tener un parámetro comparativo del crecimiento de *Ps. denitrificans* sin aplicación de campo eléctrico.

4.3.5.1 Curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* en el reactor cilíndrico rotatorio

La curva se realizó por duplicado en el reactor cilíndrico rotatorio, el cual fue adaptado para implementar un sistema de aireación, ya que la curva se realizó bajo condiciones aerobias como se muestra en la Figura 4.4. El volumen de trabajo fue de 0.85 L, 2 g/L de lactato como fuente de carbono y agitación constante a una velocidad de 400 rpm. La temperatura se controló mediante un baño recirculador a

30 °C ± 1 y el sistema fue aireado durante todo el experimento, con una bomba de aire; donde el aire pasaba por un filtro de 0.22 µm estéril, para evitar la contaminación del cultivo. Se tomaron 10 mL cada 3 horas para medir el crecimiento de *Ps. denitrificans* durante 24 horas. Todo el material utilizado incluso el reactor, fueron esterilizados en la autoclave antes de ser utilizados y la inoculación del reactor fue dentro de la campana de flujo laminar.

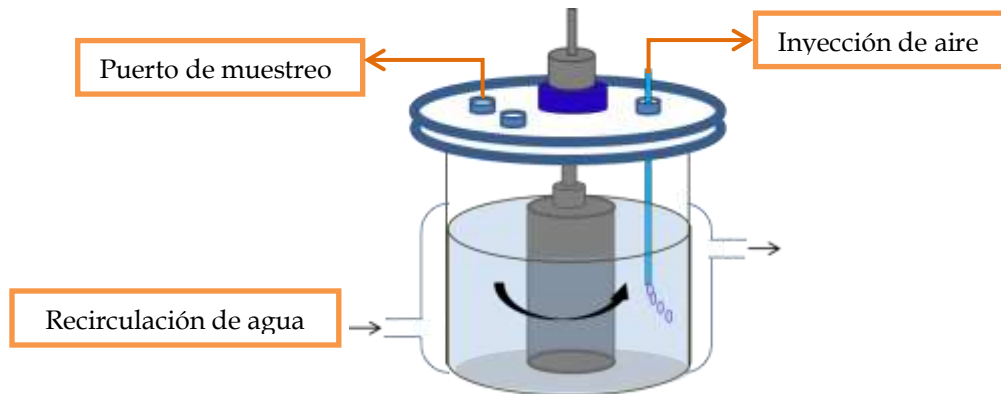


Figura 4.4 Configuración del reactor rotatorio

4.3.5.2 Control electroquímico abiótico y control biótico

Se hicieron dos experimentos control, un control abiótico y un biótico. El control electroquímico abiótico consistió en montar una celda con medio mineral mínimo y lactato, pero sin inóculo. En este ensayo se impuso un potencial de celda de 0.5 volts durante 24 horas. Para el control biótico, se montó la misma celda con inóculo, pero sin aplicación de potencial. Ambos experimentos se hicieron por duplicado. De cada celda se tomó 1 mL de muestra, cada tres horas durante 24 h, para medir densidad óptica y concentración de sustrato. Todo el material y compuestos utilizados fueron previamente esterilizados y la inoculación fue dentro de la campana de flujo laminar.

4.3.6 Aplicación de potencial eléctrico

Los ensayos donde se evaluó el efecto del potencial sobre el crecimiento de *Ps. denitrificans*, se realizaron de la siguiente manera: las celdas se montaron con los electrodos un ánodo y un cátodo, después se sellaron y esterilizaron en la autoclave. Posteriormente se introdujo en la celda el puente y el electrodo de referencia previamente estériles. Para esterilizar el puente de vidrio, se introdujo en un frasco con etanol grado industrial y se expuso a luz UV dentro de la campana de flujo laminar por 20 minutos, mientras que el electrodo de referencia se expuso durante 1 hora a la luz UV. Una vez esterilizada, la celda se inóculo, y se conectó al potencióstato/galvanostato (Figura 4.5) para imponer el potencial de celda de 0.1, 0.25 y 0.5 V, respecto al electrodo de referencia de Ag | AgCl | NaCl 3 M, durante 24 horas. La manipulación de la celda después su esterilización y antes de ser conectada al potencióstato fue dentro de la campana de flujo laminar, además todo el material utilizado fue esterilizado en la autoclave con el fin de mantener la pureza del cultivo. Cabe mencionar que aunque la celda tiene una configuración de tres electrodos, el potencial impuesto fue de celda, el electrodo de referencia fue utilizado para medir la respuesta en corriente al potencial aplicado.



Figura 4.5 Celda bioeléctrica con arreglo de tres electrodos, conectada al potencióstato/galvanostato, inoculada con *Ps. denitrificans* en medio mineral mínimo, con lactato como sustrato, saturado de aire.

4.4 Técnicas Analíticas

4.4.1 Cuantificación de biomasa

El crecimiento de *Ps. denitrificans* se midió mediante la absorbancia inicial del medio de cultivo a 550 nm y posteriormente tomando muestras por intervalos de tiempo regulares, con un espectrofotómetro. Después de un tiempo transcurrido entre 8 y 20 horas después de la inoculación, las muestras fueron diluidas 1:2 ó 1:3 en agua desionizada dependiendo de la concentración de la biomasa, para obtener valores dentro del intervalo lineal de densidad óptica (O.D) de 0.50 a 0.60 A. Para saber la concentración de biomasa se hizo una aproximación, haciendo una curva de calibración de sólidos volátiles totales *vs.* densidad óptica (Marazioti et al. 2003), como se describe a continuación.

4.4.2 Sólidos volátiles totales

La concentración de sólidos volátiles totales (SVT) fue determinada de un cultivo de *Ps. denitrificans* en caldo nutritivo. Los SVT se determinaron conforme el método gravimétrico de evaporación y secado de muestra a 105 °C; los sólidos volátiles (SV) hacen referencia a la cantidad de sólidos que se volatilizan por el efecto de la calcinación a 550 °C. Estas determinaciones se realizaron como lo indican los métodos estándar (Standard Methods for Examination of Water and Wastewater APHA, 1988)

El contenido de sólidos volátiles totales se calcula de la siguiente forma:

$$SVT = (ET - MT) \times 1000/V$$

Donde:

STV: Sólidos Volátiles Totales (mg/L)

ET: peso de la cápsula con el residuo seco en mg

MT: peso de la cápsula con el residuo calcinado mg

V: volumen de la muestra en mL

4.4.3 Cuantificación de lactato

El consumo de lactato se determinó por electroforesis capilar, empleando un equipo Agilent 1600 A (Waldbronn, Germany). El equipo cuenta con una columna capilar de sílica fundida (Agilent, id =50 μm , L=80.5 cm, longitud efectiva =72 cm). El voltaje aplicado fue de -25 kV y la temperatura en el capilar 20 °C. Se usó el buffer básico de aniones como electrolito (Agilent, pH = 12.1). La determinación del analito se realizó mediante detección indirecta UV usando un detector de arreglo de diodos. La señal de longitud de onda fue de 350 nm con una referencia a 230 nm. Previo a la medición las muestras se centrifugaron en una centrífuga de 15 a 25 minutos a 12,000 rpm y se filtraron con una membrana de 0.22 μm .

4.4.4 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas utilizadas en este estudio fueron, voltamperometría lineal, cíclica, y cronoamperometría; para imponer el pulso de potencial eléctrico y medir el perfil de corriente eléctrica generado. Para aplicar estas técnicas se utilizó un potencióstato/galvanostato el cuál se describió en la sección 4.2.3. La voltamperometría cíclica fue utilizada para explorar la ventana electroactiva de electroactividad que ofrece el sistema electrodo/medió electrolítico, empleando a uno de los electrodos como electrodo de trabajo, por lo que la respuesta obtenida fue una respuesta voltamperométrica de dicho electrodo, como un sistema de semicelda. La voltamperometría lineal fue usada para realizar una curva de corriente-potencial de celda. Los detalles de las técnicas electroquímicas se muestran en el anexo A.

4.4.5 pH

El pH se determinó al inicio y al final de cada uno de los experimentos. Para realizar la medición al inicio se utilizaron botellas sacrificables, para no afectar la esterilidad de la celda sellada. La medición final se realizó después de las 24 horas de aplicación del pulso eléctrico, donde la celda es abierta para medir el pH final. Las mediciones del pH se realizaron con un potenciómetro marca Thermo

Scientific™ Orion™ Versastar A211 equipado con un electrodo 8302BNUMD ROSS Ultra Triode glass-body pH/ATC.

4.4.6 Potencial óxido-reducción

Las mediciones se efectuaron al final y al inicio de los experimentos como se describió en la sección anterior. Las mediciones se efectuaron con un equipo Thermo Scientific™ Orion™ Versastar A211 equipado con un electrodo (Redox/ORP Thermo Scientific), para calibrar el electrodo se utilizó una solución estándar (ORP Estandar, Orion Application solution, 967901, Thermo Electro corporation, 30 °C, +415 mV).

4.5 Cálculos

4.5.1 Cálculo del consumo de lactato y producción de biomasa

A partir de las curvas de producción de biomasa y consumo de sustrato, que se presentan como cinéticas de crecimiento, se calcularon las velocidades de crecimiento y consumo de sustrato así como la producción de biomasa y sustrato consumido.

$$\text{Consumo de sustrato} = S_{inicial} - S_{final} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde:

$S_{inicial}$ = Concentración de sustrato inicial (tiempo = cero) en g/L

S_{final} = Concentración de sustrato final (tiempo = 24 horas) en g/L

$$\text{Producción de biomasa} = X_{inicial} - X_{final} \quad \text{Ec. 4.2}$$

Donde:

$X_{inicial}$ = Concentración de biomasa inicial (tiempo = cero) en g SVT/L

X_{final} = Concentración de biomasa final (tiempo = 24 horas) en g SSV/L

4.5.2 Cálculo de las velocidades de consumo de lactato y producción de biomasa

Para el cálculo de las velocidades se utilizó la pendiente obtenida en las fases exponenciales de las curvas correspondientes, concentración de sustrato *vs.* tiempo ó concentración de biomasa *vs.* tiempo.

$$\text{Velocidad de consumo de lactato} = mLac \quad \text{Ec. 4.3}$$

Donde:

$mLac$ = Pendiente del consumo de lactato en la fase exponencial (g/L·h)

$$\text{Velocidad de producción de biomasa} = mBiomasa \quad \text{Ec. 4.4}$$

Donde:

$mBiomasa$ = Pendiente de la producción de biomasa en la fase exponencial (g SSV/L·h)

4.5.3 Cálculo del rendimiento (Y) y f_s^0 teórico

Para obtener más información respecto a la eficiencia del sistema y los efectos del campo eléctrico sobre el metabolismo de *Ps. denitrificans*, se calculó el rendimiento teórico de biomasa ($Y_{x/s}$), dicho rendimiento es una medida de la cantidad de biomasa que se produce por cada gramo de sustrato consumido y se estimó a partir de la estequiometría como se describe a continuación (Rittman y McCarty, 2001):

Suma de reacciones para la producción de energía

$$Re = Ra - Rd \quad \text{Ec. 4.5}$$

Donde:

Re = Reacción global para la producción de energía

Ra = Semirreacción del aceptor de electrones

Rd = Semirreacción del donador de electrones

El balance de ecuaciones se hace en función de un equivalente electrónico como lo propuso Rittman y McCarty, (2001), donde el donador de electrones es lactato y el aceptor final es oxígeno. Cada mol de lactato oxidado completamente hasta dióxido de carbono dona 12 electrones ó equivalentes reductores, por lo tanto los coeficientes estequiométricos deben dividirse entre 12 para que la reacción quede en función de un electrón equivalente como se muestra a continuación:

		KJ/e⁻ eq
Ra	$O_2 + H^+ + e^- \rightleftharpoons H_2O$	-78.72
Rd	$CH_3CHOHCOO^- + H_2O \rightleftharpoons CO_2 + HCO_3^- + H^+ + e^-$	-32.24
Re	$O_2 + CH_3CHOHCOO^- \rightarrow CO_2 + HCO_3^- + H_2O$	-111

Suma de reacciones para la síntesis celular

$$R_s = R_c - R_d \tag{Ec. 4.6}$$

Donde:

R_s = Reacción global para la síntesis celular

R_c = Semirreacción de la producción celular

R_d = Semirreacción del donador de electrones

Rc:	$0.19CO_2 + 0.048HCO_3^- + 0.048NH_4 + H^+ + e^- \rightleftharpoons 0.048C_5H_8O_2N + 0.43H_2O$	KJ/e⁻ eq
Rd:	$0.083CH_3CHOHCOO^- + 0.33H_2O \rightleftharpoons 0.16CO_2 + 0.083HCO_3^- + H^+ + e^-$	-32.24
Rs:	$0.83CH_3CHOHCOO^- + 0.024CO_2 + 0.048NH_4^+ \rightarrow 0.048C_5H_8O_2N + 0.036HCO_3^- + 0.1H_2O$	-32.24

Reacción global de producción de energía y síntesis celular

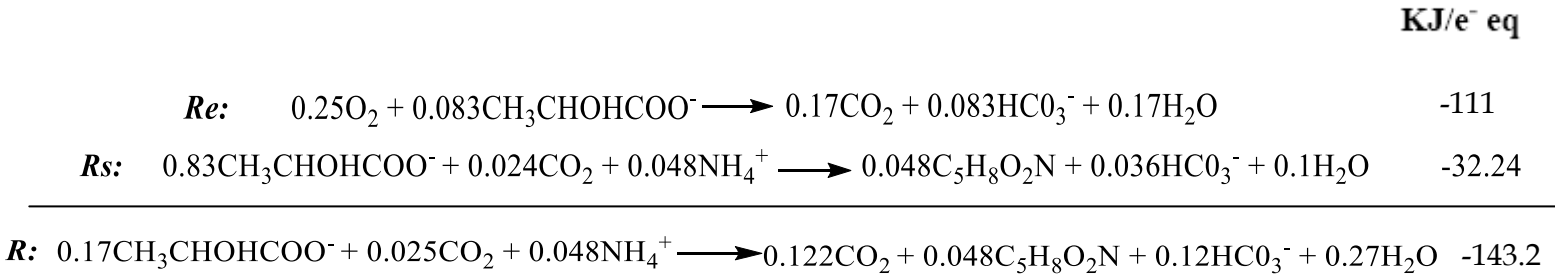
$$R = R_e - R_s \tag{Ec. 4.7}$$

Donde:

R = Reacción global

Re= Reacción global para la producción de energía

Rs= Reacción global para la síntesis celular



4.5.4 Cálculo del rendimiento (Y) y f_s^0 experimental

El rendimiento experimental se calculó a partir de la producción de biomasa y el consumo de lactato

Rendimiento experimental =

$$Y_{obs} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{S_{inicial} - S_{final}} \text{ en g SV/ g Lac} \quad \text{Ec. 4.8.}$$

Para calcular el f_s^0 , que es la fracción de electrones del donador utilizados para síntesis de biomasa se siguió la fórmula propuesta por Rittman y McCarty (2001).

Con el Y_{obs} antes calculado, se obtuvo el valor para f_s^0 observada de la siguiente forma:

$$f_s^0 = Y_{obs} \times \frac{8 \text{ g DQO}}{1 \text{ e}^- \text{ eq}} \times \frac{21 \text{ e}^- \text{ eq cells}}{114 \text{ g SSV}} \times \frac{1 \text{ g Lac}^-}{1.08 \text{ g DQO}}$$

Donde:

$\frac{8 \text{ g DQO}}{1 \text{ e}^- \text{ eq}}$ = Factor de conversión de un electrón equivalente (e⁻ eq) a demanda química de oxígeno (DQO)

$\frac{21 \text{ e}^- \text{ eq cells}}{114 \text{ g SSV}}$ =Factor de conversión de electrones equivalentes a gramos de SSV

$\frac{1 \text{ g Lac}^-}{1.08 \text{ g DQO}}$ =Factor de conversión de gramos de lactato a gramos de DQO

Este valor representa la fracción del costo energético invertido para la síntesis celular. Como se describió en la sección 2.1.4. La fracción restante de los electrones del donador, son consumidos para obtener la energía para el mantenimiento celular, este parámetro denominado f_e^0 , se calculó con la siguiente ecuación:

$$f_e^0 + f_s^0 = 1 \quad \text{Ec. 4.9}$$

5. Resultados

5.1 Desempeño de los cultivos de *Pseudomonas denitrificans*

5.1.1 Curva de crecimiento

En la Figura 5.1 se muestra la curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* en caldo nutritivo bajo condiciones aerobias a 30 °C, donde se aprecian las distintas etapas de su crecimiento. La primera etapa presenta un periodo inicial donde aparentemente no hay crecimiento, a ésta se le denomina fase Lag o de latencia, la cual tuvo una duración aproximada de 4 horas; enseguida se manifiesta la fase Log o exponencial, la cual corresponde al crecimiento exponencial de la población bacteriana, que comenzó a las 5 horas y terminó a las 20 horas, es decir una duración de 15 horas aproximadamente. En esta fase se alcanzó una densidad óptica (O.D) de 1.3, lo cual es un valor normal para esta bacteria cuando crece en un medio enriquecido. Por último la fase estacionaria que comenzó a partir de las 20 horas. La fase de latencia es un periodo de adaptación que requieren las bacterias, ya que han sido transferidas de un medio a otro. En esta fase se producen las enzimas necesarias para adaptarse a este nuevo ambiente. En esta fase aunque no hay incremento de células si hay una gran actividad metabólica, ya que comienzan a preparar el proceso de división celular. En la fase exponencial inicia la división celular por lo que se observa un rápido incremento de la población bacteriana, donde la velocidad de crecimiento depende de las condiciones y la composición del medio al que está expuesta. Para la fase estacionaria se aprecia un cese del crecimiento, puesto que en cultivos en lote no puede haber un crecimiento indefinido de forma exponencial debido a las limitaciones por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, o porque se alcanzó un número de células elevado para el espacio disponible, o por una combinación de las causas anteriores (Madigan et al. 2010). Para este estudio fue muy importante identificar el tiempo que dura cada etapa, ya que con ello se realiza una planeación de los experimentos con la

bacteria. Desde el punto de vista de un sistema bioelectroquímico, la determinación de la duración de dichas fases es de suma importancia, ya que el estímulo que se aplica mediante pulsos de voltaje en la celda electroquímica, puede modificar el tiempo de duración de las fases exponencial y estacionaria principalmente.

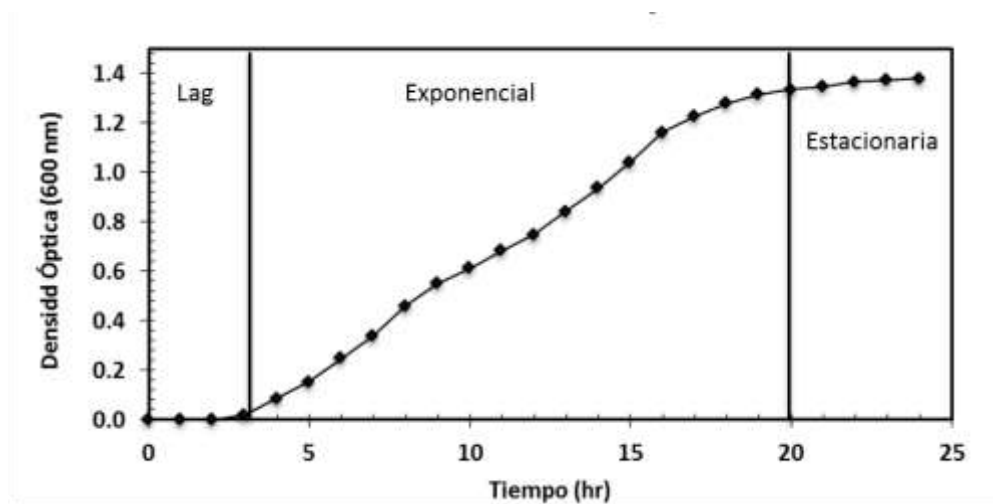


Figura 5.1 Curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* en caldo nutritivo, bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante.

Aunado a lo anterior, también fue necesario realizar otra curva de crecimiento de la bacteria en donde se apreciara el efecto del medio mínimo mineral, para de esta manera descartar un retardo en la aparición de las fases debido a factores de cambios en el ambiente, lo cual se describe a continuación.

5.1.2 Optimización del medio de cultivo

En la Figura 5.2 se muestra que *Ps. denitrificans* no presentó crecimiento en condiciones aerobias y anóxicas en un medio mineral mínimo sin extracto de levadura y metanol como fuente de carbono en un período de 24 horas, que es el tiempo correspondiente a la duración de la curva de crecimiento (Figura 5.1). Por otro lado, el crecimiento si se manifestó bajo las mismas condiciones en medio mínimo mineral con extracto de levadura. Este estudio confirmó que *Ps. denitrificans* requiere de los nutrientes que provee el extracto de levadura para su

crecimiento en un medio mínimo, de lo cual no se tenía certeza, dado que algunos de los estudios con esta bacteria, no reportaron lo indispensable que es el extracto de levadura para su crecimiento. Además, tampoco coinciden en el empleo de algún sustrato común como fuente de carbono y energía, ya que la mayoría de los reportes se usan medios ricos (caldos nutritivos) para su cultivo. En esta tesis particular se seleccionó al metanol como sustrato de acuerdo a lo reportado Doudoroff et al. 1974. Además con este sustrato se puede apreciar que bajo condiciones aerobias no se alcanzó un valor superior a 1 de O.D sino de 0.7. De acuerdo a la Tabla 5.1 obtenida del manual Final Screening Assessment of *Pseudomonas sp.* ATCC 13867, este último valor está asociado a un crecimiento moderado, ya que para fines de este estudio no es de utilidad. Es decir, en el estudio de este sistema bioeléctrico se espera que el único factor que tenga influencia sobre el crecimiento de manera positiva o negativa sea el estímulo eléctrico.

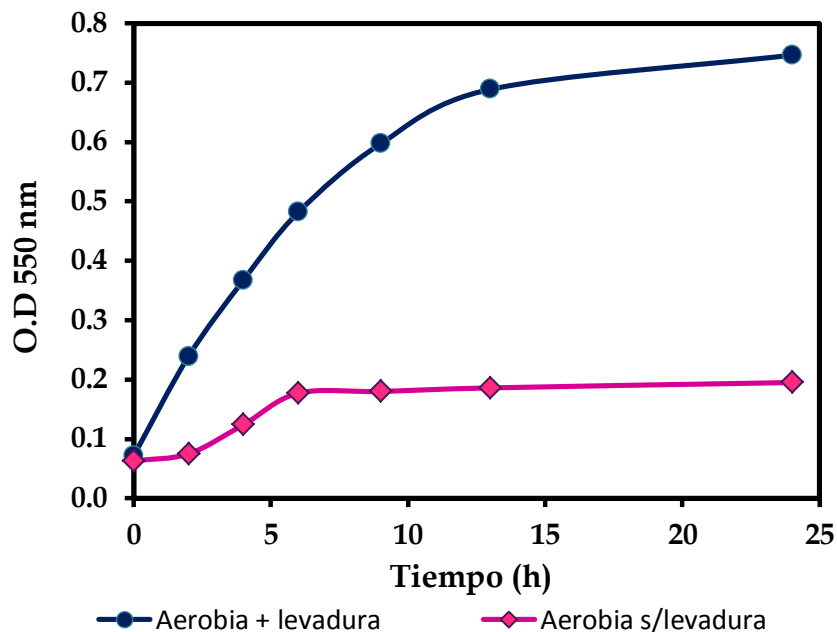


Figura 5.2 Curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* con metanol como fuente de carbono, bajo condiciones aerobias y anóxicas, a temperatura 30 °C y agitación constante.

Tabla 5.1 Desempeño del crecimiento de *Ps. denitrificans* en relación a la densidad óptica.
Final Screening Assessment of *Pseudomonas sp.* ATCC 13867

Nivel de crecimiento	Densidad óptica
Optimo crecimiento	(O.D>1)
Crecimiento lento	(O.D>0.2)
Sin crecimiento	(O.D<0.05)
Retraso en el crecimiento	(OD<0.2)
Crecimiento moderado	(OD>0.5)

5.1.3 Curva de calibración de biomasa

Para poder dar seguimiento expedito al crecimiento de la biomasa, se decidió elaborar una curva de calibración de densidad óptica *vs* sólidos volátiles totales (SVT), como se describió en la sección anterior. A partir de esta curva se estimaron los gramos de peso seco, es decir la concentración de biomasa expresados como SVT, así mismo estos datos fueron utilizados para calcular las tasas de crecimiento de *Ps. denitrificans*. En la Figura 5.3 se muestra dicha calibración, la cual se obtuvo a partir de un ajuste lineal de los datos experimentales. Cuando se tienen matrices complejas como bacterias, la curva de calibración debe hacerse con más de 8 puntos para conservar la linealidad (Skoog, 2005).

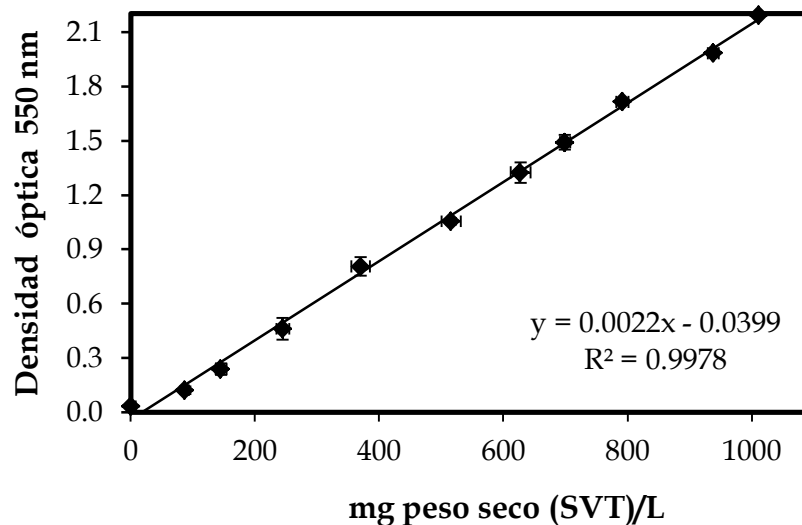


Figura 5.3 Curva de calibración de O.D Vs SSV bajo condiciones aerobias para *Ps. denitrificans* con caldo nutritivo a temperatura de 30 °C y agitación constante.

5.1.4 Curvas de crecimiento con distintas fuentes de carbono

Con el fin de seleccionar el sustrato adecuado para el crecimiento óptimo de *Ps. denitrificans* se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento con tres distintas fuentes de carbono, lactato, acetato y glucosa 10 mM, seleccionadas según lo reportado por Doudoroff et al. (1972). En la Figura 5.4 se muestra que para condiciones aerobias el lactato es la fuente de carbono con la que se obtuvo un crecimiento mayor respecto de glucosa y acetato, ya que se obtuvo una O.D de 1.3 que de acuerdo a la Tabla 5.1, está asociado con un crecimiento óptimo, lo cual también se puede observar en la Figura 5.4

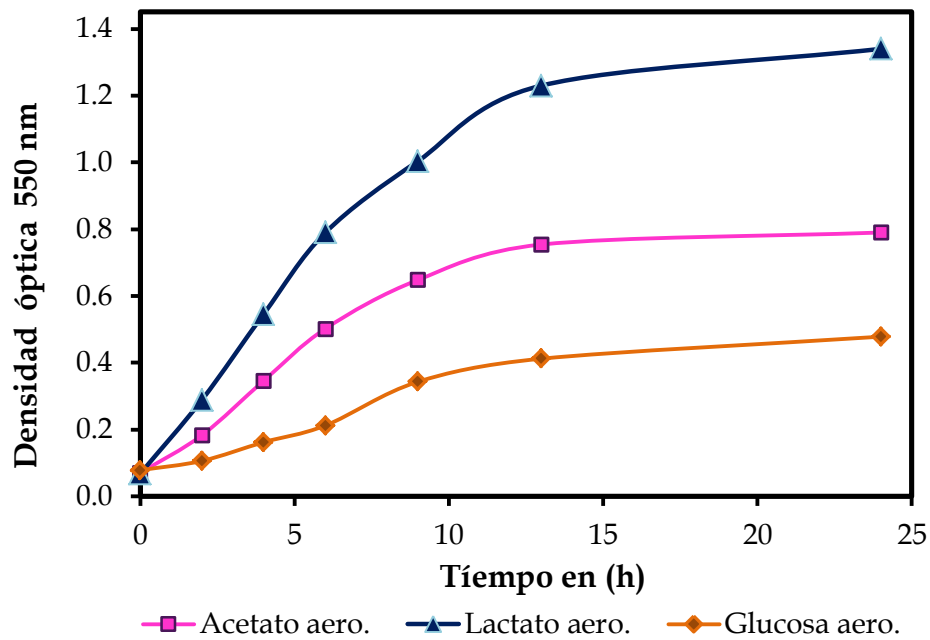


Figura 5.4 Curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* en medio mineral mínimo con diferentes fuentes de carbono bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constantes.

En la Tabla 5.2 se enlistan los valores de la tasa de crecimiento y la concentración de biomasa (SVT) para cada sustrato bajo condiciones aerobias. Como se observa, usando lactato como sustrato se obtuvo una velocidad de crecimiento similar a la de la glucosa, sin embargo la concentración de biomasa al término de la cinética

fue mayor con lactato como se mencionó en el párrafo anterior. Por lo tanto el lactato fue la mejor fuente de carbono y energía en condiciones aerobias para *Ps. denitrificans*. Para los propósitos de esta tesis los experimentos solo fueron llevados a cabo bajo condiciones aerobias.

Tabla 5.2 Tasas de crecimiento y producción de biomasa en condiciones aerobias

Sustrato	Concentración de biomasa (g SVT/L)	Tasas de producción de biomasa (g SVT/L·h)
Lactato	0.65	0.06
Glucosa	0.62	0.06
Acetato	0.41	0.03

5.1.5 Crecimiento de *Ps. denitrificans* en el reactor de cilindro rotatorio

El reactor de cilindro rotatorio está diseñado para mantener un medio homogéneo debido a una convección controlada. También, permite mantener un campo eléctrico homogéneo en el medio porque el electrodo de cilindro se encuentra rodeado de un anillo metálico envolvente. Antes de aplicar un campo eléctrico entre dichos electrodos primero se evaluó si el reactor podía ser esterilizado y si los empaques no resultaban dañados dentro de la autoclave, ya que el sellado hermético es muy importante para mantener la pureza del cultivo. Como resultado no hubo problema para la esterilización ni para el sellado hermético de los empaques; sin embargo el reactor tuvo que ser adaptado para implementar un sistema de aireación, para generar condiciones aerobias. Esto presentó algunos problemas técnicos, debido a que después de la esterilización el líquido contenido dentro del reactor (medio mineral mínimo) se presurizó y presentó fugas, por lo que lograr realizar la curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* fue complicado. Se realizó una cinética de crecimiento, utilizando medio mínimo mineral y lactato como sustrato en condiciones aerobias. El volumen de trabajo fue de 0.85 L, 2 g/L de lactato y agitación constante a una velocidad de 400 rpm. La temperatura se

controló mediante un baño recirculador $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y el aire fue suministrado continuamente durante todo el experimento. En la Figura 5.5 se muestra el perfil de crecimiento para *Ps. denitrificans* durante 24 horas, donde se observa una curva de crecimiento sin fase lag, debido a que la inoculación del reactor se realizó con un preinóculo en fase exponencial (Ver sección 4.3.1.1). Pese a que se observa un crecimiento óptimo en *Ps. denitrificans* en el reactor rotatorio, obtener la curva de crecimiento fue complicado ya que en numerosas ocasiones las cinéticas tuvieron que ser interrumpidas por las razones antes mencionadas, debido a que el tiempo no era suficiente para lograr resolver los problemas de operación del reactor se decidió trabajar con una celda más pequeña, que facilitó las condiciones de esterilidad y además se optimizó el tiempo para realizar los experimentos.

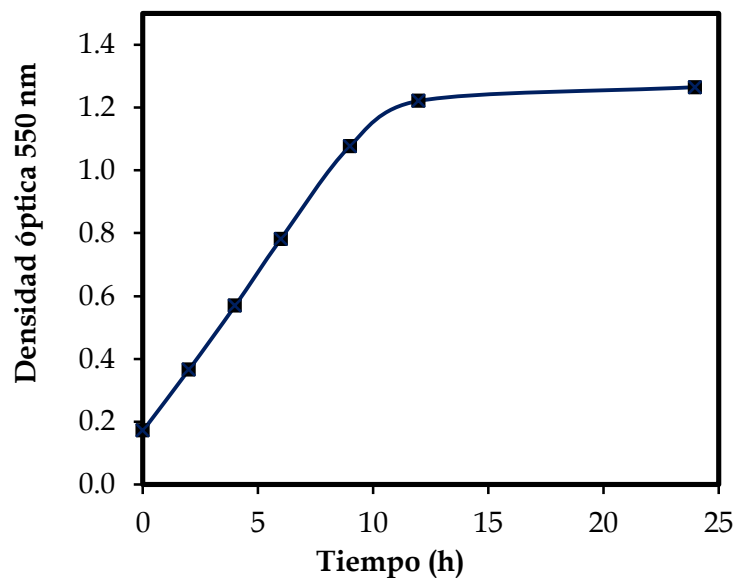


Figura 5.5 Curva de crecimiento de *Ps. denitrificans* en medio mineral mínimo, con lactato como sustrato bajo condiciones aerobias a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitación constante (400 rpm), utilizando el reactor rotatorio.

5.2 Evaluación electroquímica del medio de cultivo y electrodos

5.2.1 Estudio de la ventana de electroactividad

Se realizó un estudio abiótico del sistema electrolítico, que consistió del medio mínimo mineral, y los electrodos en la celda con arreglo de tres electrodos como se muestra en la Figura 5.6 (ver sección 4.2.2 de materiales y métodos), mediante voltamperometría cíclica, con el propósito de determinar la ventana electroactiva de trabajo. En la Figura 5.7 se presentan respuestas voltamperométricas en función del potencial de inversión E_λ (En el Anexo A se explican los fundamentos de esta técnica electroquímica). Estas respuestas se obtuvieron a partir de un potencial de circuito abierto de $E = -0.146$ V en dirección anódica. Dichas respuestas presentaron un pico ancho anódico a $E_{pa} = 0.47$ V. Este pico se manifestó cuando se alcanzó un potencial de inversión de $E_\lambda = 0.2$ V y aumentó su intensidad de corriente con un incremento en el potencial de inversión hasta $E_\lambda = 0.6$ V. Este pico puede estar asociado a una reacción de oxidación del electrodo de acero, rompiéndose la pasivación entre el óxido de hierro y el cromo.

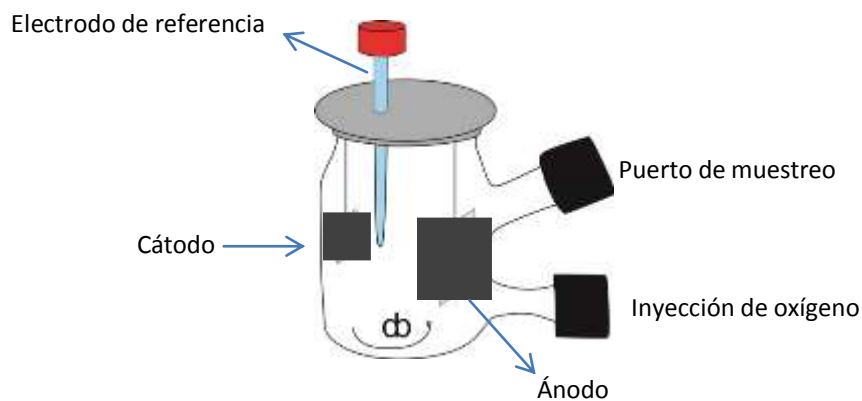


Figura 5.6 Celda electroquímica con arreglo de tres electrodos para estudiar la ventana de electroactividad en medio mineral mínimo.

Para las respuestas en dirección catódica se observa la presencia de un incremento en la corriente catódica -40 mA, donde comienza a manifestarse a un potencial de -0.5 V. El voltaje donde aparece este incremento en la corriente puede estar asociado a la reducción del agua que aparece a partir de -0.800 V, de acuerdo a la siguiente reacción.



Para evitar la presencia de las reacciones antes mencionadas, los sistemas bioelectroquímicos se diseñaron con una ventana de trabajo de -0.5 a 0.2 V, con el objetivo de evitar interferencias en el sistema bioelectroquímico o inhibición de *Ps. denitrificans* por envenenamiento.

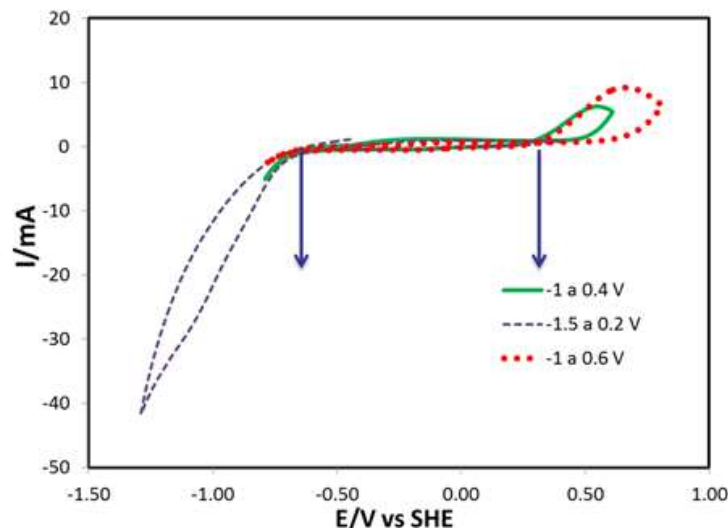


Figura 5.7 Respuestas voltamperométricas cíclicas en dirección anódica y catódica, en soluciones con medio mínimo mineral saturadas de aire a 25 °C, una velocidad de barrido de $v \times \text{mv-s}$

5.2.2 Selección del voltaje aplicado

Se realizó una curva de polarización en la celda electroquímica con el objetivo de determinar un intervalo de potencial de celda adecuado para evitar la presencia de reacciones farádicas parásitas en los sistemas bioelectroquímicos. Este ensayo se

hizo en la celda descrita en la metodología con un arreglo de 2 electrodos, un ánodo y un cátodo; la cual contenía medio mineral mínimo más lactato (medio electrolítico), y se realizó un barrido de potencial lineal a una velocidad de 10 y 0.2 mV/s. En la Figura 5.7 se muestra la respuesta gráfica de corriente eléctrica (mA) vs potencial de celda (V), la cual presentó un incremento en la corriente a partir de 0.9 V para 10 mV/s y 1.0 V para 0.2 mV/s, el cual puede estar asociado con las reacciones de oxidación del electrodo, que conlleva a su desnaturalización. También se observó que no hubo cambios en la temperatura durante el experimento. Basados en estos resultados el intervalo de potencial de celda seleccionado fue entre 0 y 0.9 V debido a que en este intervalo no se observó respuesta en corriente farádica y se propone que no hay reacciones de electrólisis del medio electrolítico, ni corrosión de los electrodos. En resumen se propone que las reacciones químicas abióticas son descartables. A partir de este intervalo de potenciales, se seleccionaron tres potenciales de celda (0.1, 0.25 y 0.5 V) mismos que se aplicaron en los experimentos posteriores, en donde se evaluó el efecto de un campo eléctrico sobre el crecimiento de *Ps. denitrificans*.

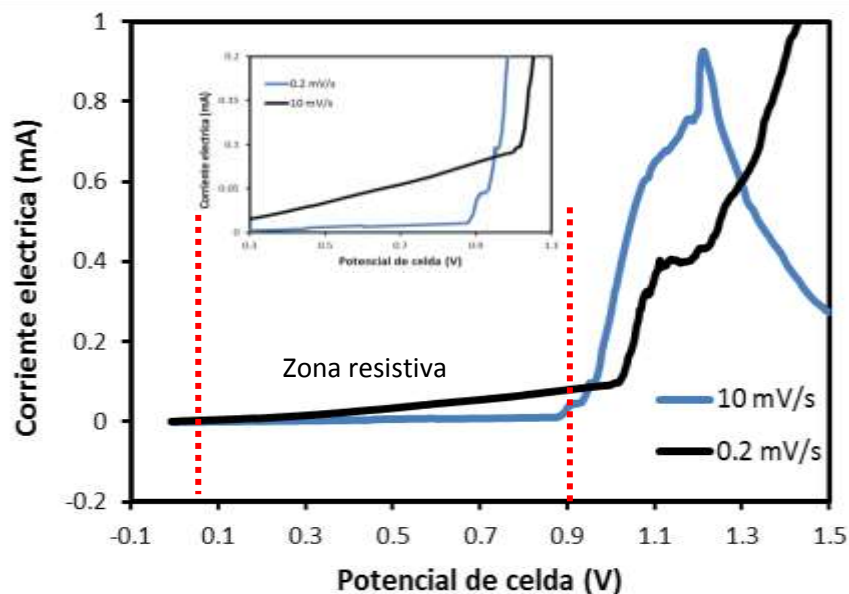


Figura 5.8 Curva de polarización con medio mínimo mineral bajo condiciones aerobias.

5.3 Desempeño del Sistema Bioeléctrico

5.3.1 Experimentos control abiótico y biótico.

Antes de iniciar los experimentos con campo eléctrico en la celda con arreglo de tres electrodos, se hicieron dos experimentos control, el primero fue un control electroquímico abiótico y el segundo un control biótico, sin aplicación de campo eléctrico. El control electroquímico abiótico, consistió en conectar la celda aplicando 0.5 V durante 24 h en la celda que contenía el medio mínimo mineral (medio electrolítico), 2 g/L de lactato y aire, pero sin *Ps. denitrificans*, con el objetivo de observar si existía alguna oxidación electroquímica del sistema electrolito/electrodo durante la aplicación del campo eléctrico. En la Figura 5.9, se muestra que no hubo cambio en la concentración de lactato ni en la corriente eléctrica, ya que se mantuvo constante durante la aplicación del potencial. Con estos resultados se demostró que no hubo reacciones de electrólisis del medio electrolítico o corrosión de los electrodos durante la aplicación de potencial.

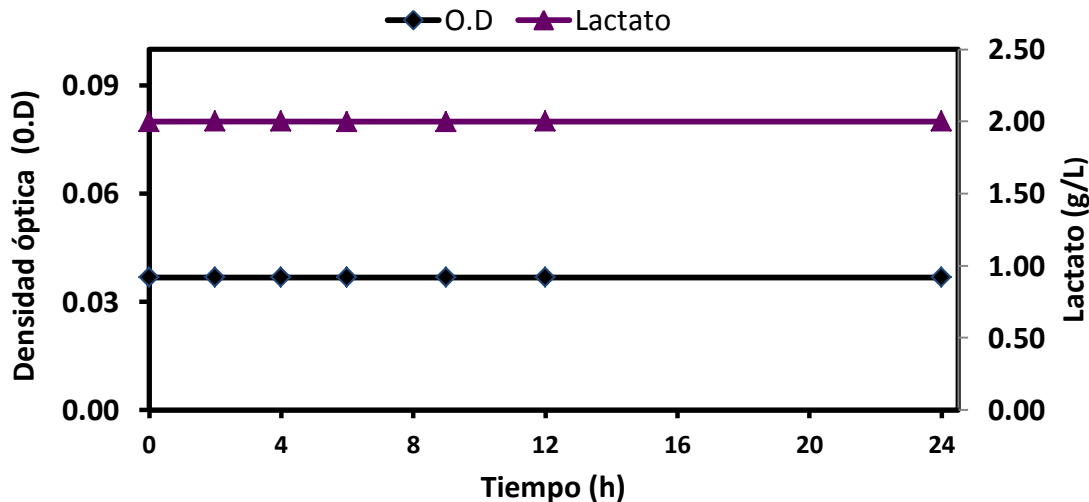


Figura 5.9 Experimento control, con medio mínimo mineral, sin inóculo, aireación continua y potencial constante de 0.5 V.

El experimento control biótico, consistió en realizar una cinética del crecimiento de *Ps. denitrificans* en ausencia del campo eléctrico. En esta cinética se tomaron

muestras a lo largo de las 24 h de su duración, para seguir el consumo de lactato y producción de biomasa, además al inicio y al final de cada experimento se evaluó el ORP, pH y conductividad (Tabla 5.5). En la Figura 5.10 se muestra la cinética de crecimiento, como un promedio del consumo del sustrato y producción de biomasa de los datos experimentales que se obtuvieron por triplicado. En la gráfica se muestra que la producción de biomasa y el consumo del sustrato, bajo condiciones aerobias, implicaron un consumo de lactato de 53.0% y una producción de biomasa de 0.54 ± 0.01 g SVT/L. Estos resultados son importantes porque representan el experimento control biótico contra con el cual se compararon los resultados obtenidos de los ensayos que se realizaron bajo la influencia de un estímulo eléctrico, y así determinar si hubo un cambio en el metabolismo de *Ps. denitrificans*. Los resultados de dichos ensayos se discuten a continuación.

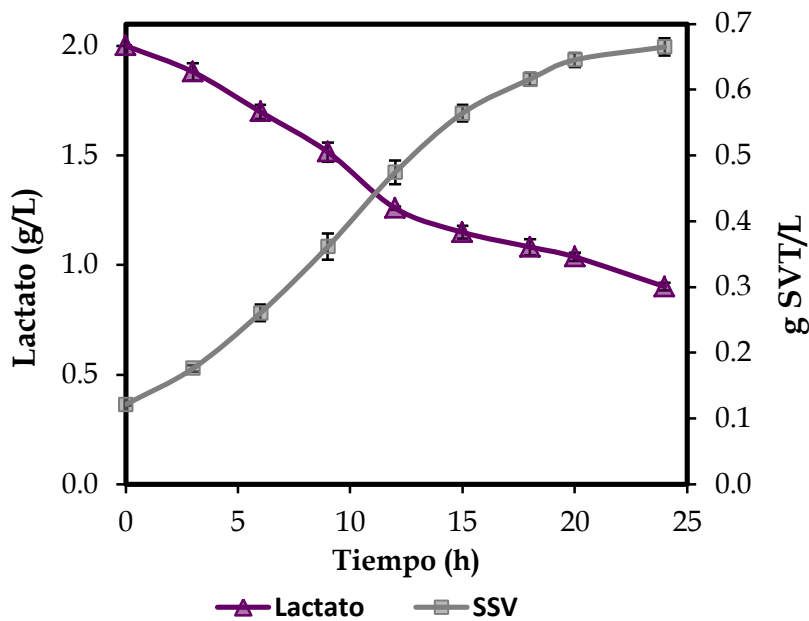


Figura 5.10 . Cinética de crecimiento de *Ps. denitrificans* bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante durante 24 h.

5.3.2 Aplicación del campo eléctrico

En esta sección se describen los resultados de los primeros ensayos con aplicación de un campo eléctrico, en la celda bioeléctrica con arreglo de tres electrodos. Los ensayos se realizaron bajo condiciones aerobias, con medio mineral mínimo, usando lactato como fuente de carbono. Se realizaron tres ensayos denominados $C_{0.1}$, $C_{0.25}$, $C_{0.5}$, asociados al potencial de celda impuesto en cada ensayo, 0.1, 0.25 y 0.5 V respectivamente. La imposición del potencial fue de manera continua durante 9, 6 y 9 horas para $C_{0.1}$, $C_{0.25}$ y $C_{0.5}$ respectivamente. La aplicación del pulso de potencial se realizó después de haber inoculado las celdas. La aplicación del estímulo eléctrico concluyó en cuanto se alcanzó una densidad óptica máxima de 1.4 o mayor, respecto de la curva realizada en el reactor rotatorio, es decir los experimentos se detuvieron antes de alcanzar la fase estacionaria. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 5.3, donde se demostró que, para cada caso hubo un incremento en la producción de biomasa en comparación con el reactor cilíndrico rotatorio (RCR) sin campo eléctrico. En dicha tabla se puede apreciar que para el RCR a las 24 h se obtuvo una densidad óptica (O.D) de 1.38 uA mientras que para los experimentos en $C_{0.1}$, $C_{0.25}$ y $C_{0.5}$ su O.D fue mayor, 1.43, 1.57, 1.49 uA respectivamente, con un incremento en la biomasa en el siguiente orden $C_{0.25} > C_{0.5} > C_{0.1} > RCR$. En el experimento $C_{0.25}$ se alcanzó una producción de biomasa cuatro veces mayor respecto a la que se obtuvo en el RCR, ya que en 6 horas produjo 0.63 g SVT/L, mientras que el control en 24 h produjo 0.55 g SVT/L.

Tabla 5.3 Comparación entre la biomasa producida y el consumo de lactato entre el experimento control y los experimentos con aplicación de un campo eléctrico en el sistema bioeléctrico.

V	Experimentos	Tiempo (h)	O.D (550 nm)	Producción de biomasa g SVT/L	Velocidad de producción de biomasa g SVT/L·h
S/V	RCR	24	1.38	0.55	0.037
0.10	$C_{0.1}$	9	1.43	0.57	0.067
0.25	$C_{0.25}$	6	1.57	0.63	0.109
0.50	$C_{0.5}$	9	1.49	0.59	0.072

Con estos resultados es evidente que la aplicación de un campo eléctrico estimuló el crecimiento en *Ps. denitrificans* en todos los casos; a un potencial de celda de 0.25 V se observó la mayor producción de biomasa. No obstante, con estos resultados no se puede aseverar que exista una desviación del flujo de electrones en el metabolismo de *Ps. denitrificans*, dado que no se sabe el rendimiento celular, es decir el rendimiento de biomasa producida en función de la utilización del sustrato.

Por este motivo, estos ensayos fueron repetidos, aumentando el tiempo de medición hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Adicionalmente, fue necesario medir el consumo de Lactato, ya que a partir de ese valor se estima el rendimiento celular y el coeficiente de partición de electrones (f_s^0) (descrito en la sección 2.1.4 del capítulo 2).

5.3.3 Perfiles de corriente

Como se mencionó en el apartado anterior, las cinéticas fueron realizadas nuevamente; en esta sección se presentan los perfiles de corriente para cada una de las cinéticas con y sin potencial aplicado usando el sistema bioeléctrico de arreglo de tres electrodos.

En la Figura 5.11 se presenta el perfil de corriente para el experimento control abiótico, en donde se impuso un potencial de 0.5 volts en una celda en ausencia de *Ps. denitrificans*; se muestra que la corriente es muy cercana a cero, en donde la densidad de corriente es de $0.0019/\text{cm}^2 \pm 0.0002$. Con esto se deduce que no hay reacciones electroquímicas que pudieran afectar el sistema cuando *Ps. denitrificans* esté presente en el medio.

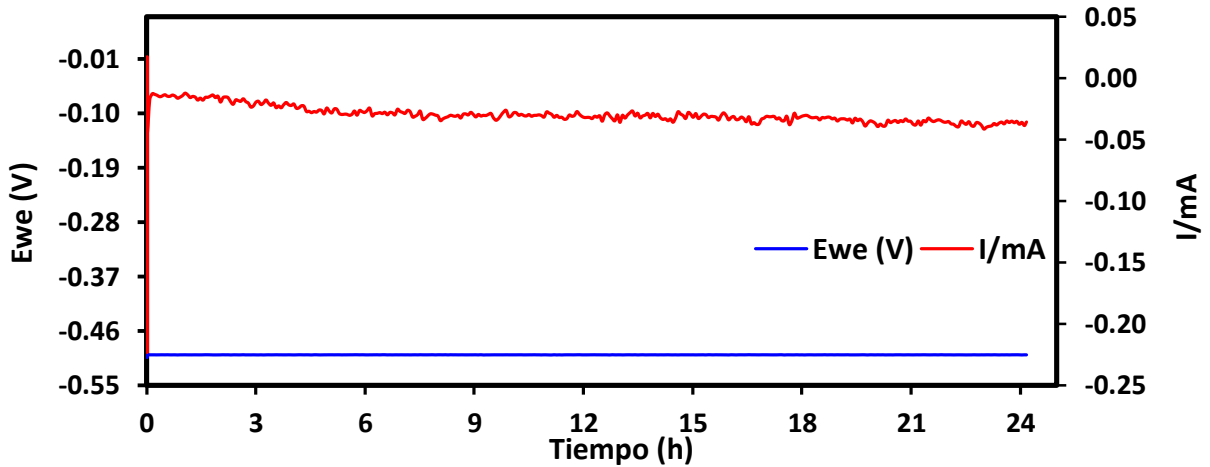


Figura 5.11 Perfil de potencial y su respuesta en corriente. Potencial aplicado 0.5 V, agitación y aireación constante.

En la Figura 5.12 se muestra el perfil de corriente para un potencial aplicado de 0.10 V. Donde la densidad de corriente promedio es de $-0.000192 \text{ mA/cm}^2 \pm 0.00008$

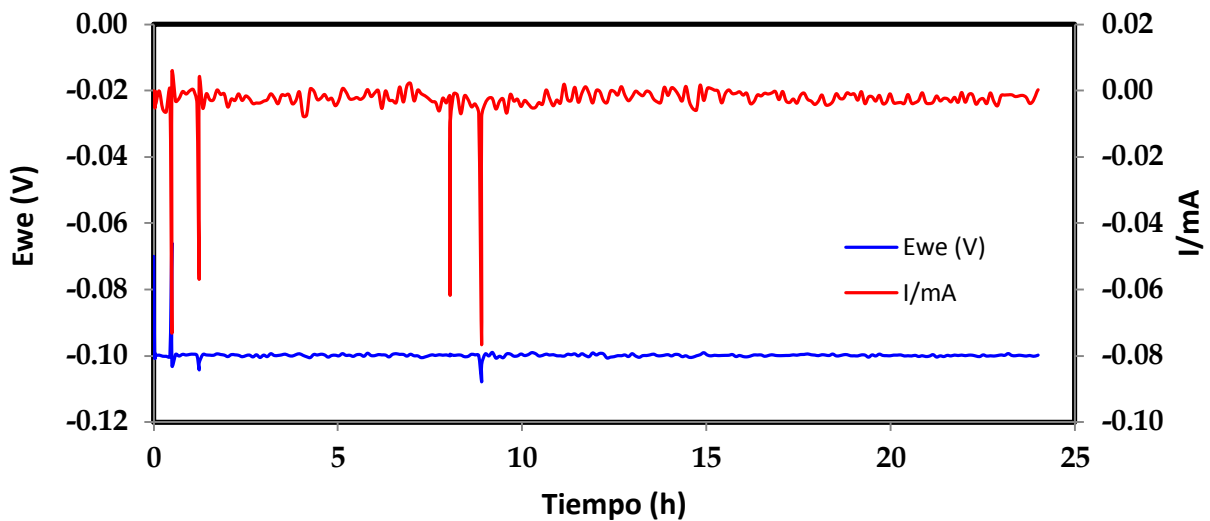


Figura 5.12 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.1 V.

En la Figura 5.13 se muestra el perfil de corriente para un potencial aplicado de 0.25 V. Donde la densidad de corriente promedio es de $-0.000332 \text{ mA/cm}^2$

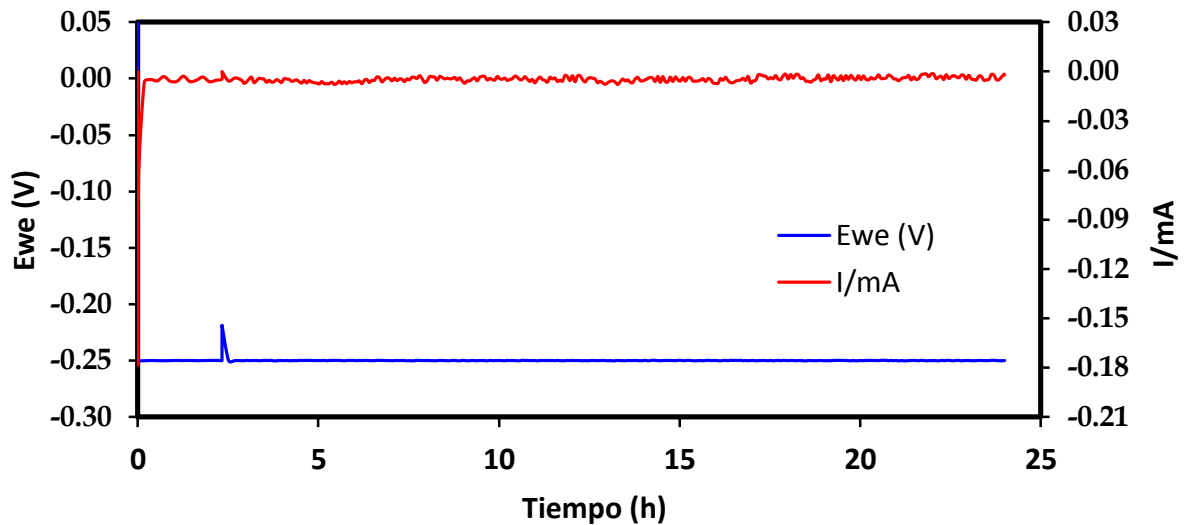


Figura 5.13 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.25 V.

En la Figura 5.14 se muestra el perfil de corriente para la cinética con un potencial de 0.50 V. La densidad de corriente promedio es de -0.0023 ± 0.012

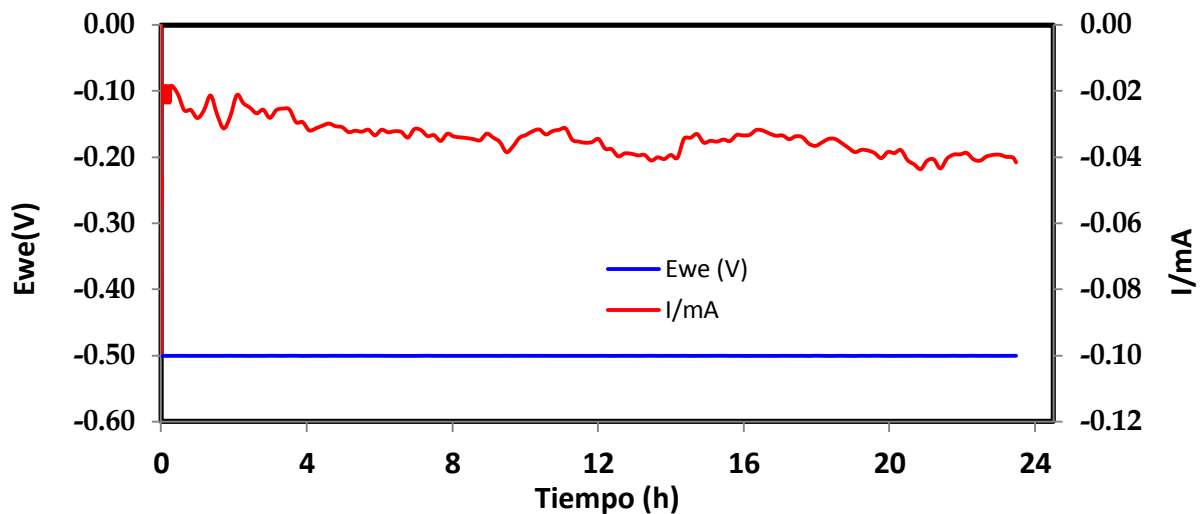


Figura 5.14 Perfil de potencial aplicado y la respuesta en corriente, para una cinética con estímulo eléctrico de 0.5 V.

En los perfiles antes mostrados se puede observar que la corriente es no faradaica, es decir, durante las cinética no ocurrieron reacciones redox sobre la superficie de los electrodos por lo que la corriente es cero.

5.3.4 Análisis de los parámetros del sistema, coeficientes de partición y rendimientos celulares

5.3.4.1 ORP, pH y conductividad eléctrica.

En la Tabla 5.4 se enlistan los valores promedio de pH, potencial redox (ORP) y conductividad de los experimentos con y sin campo eléctrico, medidos al inicio y al final de cada uno de los ensayos. En dicha tabla se observa que no hay diferencias representativas en la conductividad eléctrica de los sistemas con campo eléctrico, en comparación con el ensayo sin potencial eléctrico, sin embargo el pH incrementó a 8.0 en todos los experimentos; además de una disminución del potencial redox conforme se incrementa el potencial aplicado. Estos cambios en el pH y en el potencial redox podrían deberse a la secreción de sustancias extra celulares debido a la estimulación eléctrica. Estas sustancias podrían estarse reduciéndose liberando protones al medio (Ingram y Blackwood, 1970; Saffarini y col., 2002)

Tabla 5.4 Valores de ORP, pH y conductividad en el medio, al inicio y final de las cinéticas, bajo condiciones aerobias con lactato como fuente de carbono a distintos potenciales de celda.

Parametros	0.5 V	0.25 V	0.1 V	Control (s/V)
ORP_i (mv)	266.0	207.0	210.9	296.0
ORP_f (mv)	-29.1	104.5	206.5	360.0
Conductividad_i (ms/cm)	16.4	16.3	16.6	16.5
Conductividad_f (ms/cm)	17.4	17.7	18.0	17.9
pH_i	7.0	7.0	7.0	7.0
pH_f	8.0	8.0	8.0	8.0

5.3.4.2 Análisis de los cambios en la cinética de *Ps. denitrificans*

En la Figura 5.15 se observa que, en todas las cinéticas bajo la influencia de un potencial eléctrico incrementan la producción celular de *Ps. denitrificans*; también hubo un incremento en el consumo de lactato, respecto al experimento control sin estímulo eléctrico (Control _{s/v}). El incremento en la producción celular y consumo de lactato no es proporcional, se observa que conforme incrementa el potencial aplicado, el consumo de lactato también aumenta; esto podría deberse a que, a mayor potencial eléctrico hay un aumento significativo en la permeabilidad de la membrana plasmática por la formación de poros. Esto también podría explicar el incremento en la tasas de utilización del sustrato (rut) como se muestra en la Figura 5.16; la tasa de utilización también incrementa de manera significativa, conforme incrementa el potencial eléctrico aplicado; esto puede atribuirse al incremento en la concentración de lactato en el interior de la célula, propiciando que el equilibrio sea desplazado hacia la formación de productos por ley de acción de masas (ATP o células) acelerando la reacción (Picó et al. 2015).

Otra explicación posible es que el potencial aplicado pudo afectar de manera directa el funcionamiento de las enzimas encargadas de la producción de ATP y células o posiblemente podría estar causando un efecto sobre la constante de afinidad del sustrato, la cual está directamente ligada a la velocidad de la utilización del sustrato y al consumo del mismo.

Otro punto importante que cabe resaltar, es la velocidad de producción celular, la cual incrementa conforme aumenta el potencial aplicado, no obstante en el potencial de 0.5 V, la velocidad disminuye así como la producción de biomasa respecto de los experimentos con 0.1 y 0.25 V. Al observar la tendencia en la Figura 5.16 se distingue un umbral a partir del potencial de 0.5 V. Para tratar de comprender que está sucediendo con el incremento en el crecimiento se calcularon

los rendimientos para cada uno de los experimentos y los coeficientes de partición de electrones, los cuales se describen en la siguiente sección.

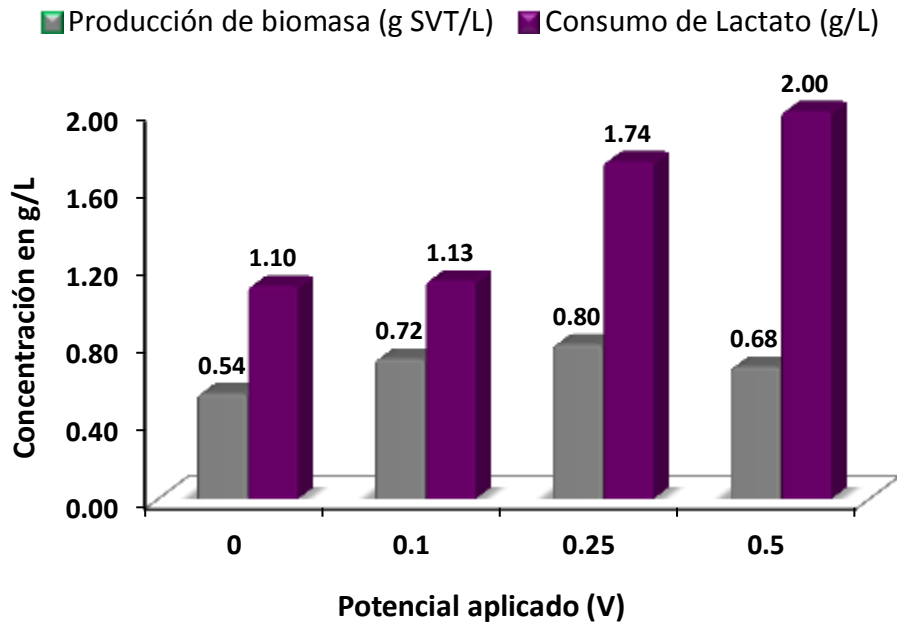


Figura 5.15 Consumo de lactato y producción de biomasa en los ensayos con y sin estímulo eléctrico, bajo condiciones aerobias, en la celda bioeléctrica, bajo condiciones aerobias.

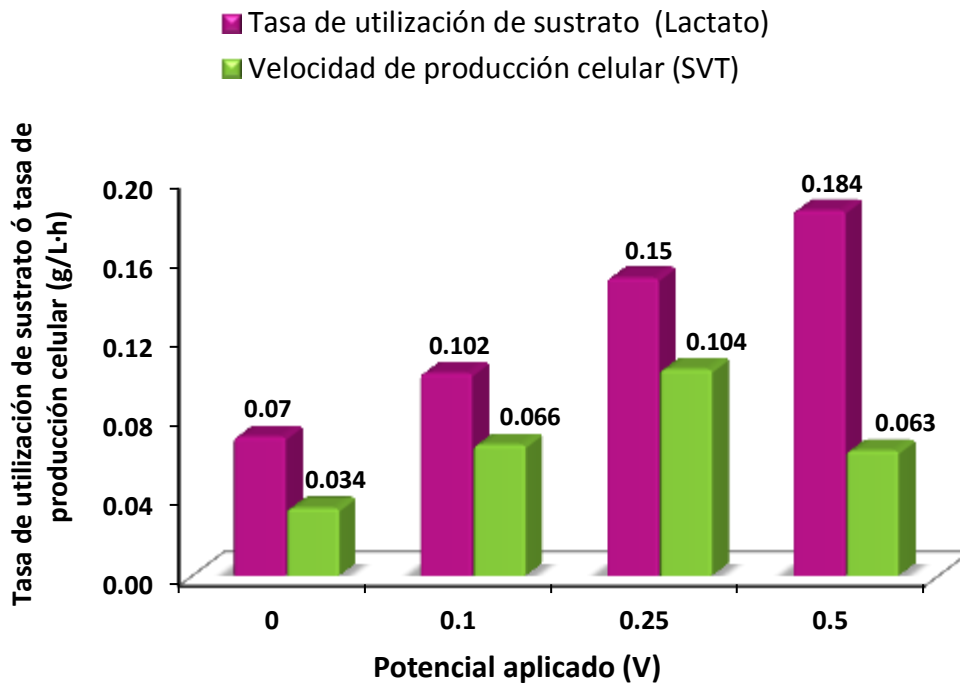


Figura 5.16 Tasa de utilización de sustrato (lactato) y velocidad de producción celular en los ensayos con y sin estímulo eléctrico, bajo condiciones aerobias, en la celda bioeléctrica.

5.3.4.3 Análisis del rendimiento celular y los coeficientes de partición.

Para explicar la variación entre la producción celular y el consumo de lactato se calcularon los rendimientos celulares y los coeficientes de partición de electrones para cada uno de los ensayos; estos valores se muestran en la Figura 5.17, para tratar de observar de manera gráfica la variación de los parámetros antes mencionados en función del incremento del potencial eléctrico. Se puede observar que hay un umbral pasando los 0.25 V ya que a partir de este potencial comienza a disminuir el rendimiento celular. Esto se debe a que los electrones que obtiene *Ps. denitrificans* del lactato no los invierte su reproducción, los invierte en la generación de energía para su mantenimiento. Esta distribución electrónica se reflejada en el coeficiente de partición de electrones f_e^0 , el cual comienza a incrementarse a partir de los 0.25 V y por ende la fracción de electrones destinados para la biomasa disminuyo a partir de los 0.25 V. Si gráficamente se puede observar que a partir de 0.25 V hay un umbral en el que el metabolismo de *Ps denitrificans* comienza a favorecer al catabolismo, dejando a un lado su reproducción, significaría que a ¿mayores potenciales disminuiría aún más el rendimiento? ¿Se incrementaría aún más la velocidad de utilización de sustrato? O ¿Morirían las bacterias?. Cabe mencionar que a potenciales mayores a 0.9 V para el caso de este sistema comienzan a ocurrir reacciones sobre la superficie del electrodo, sin embargo es importante saber que pasaría más allá de los 0.5 V.

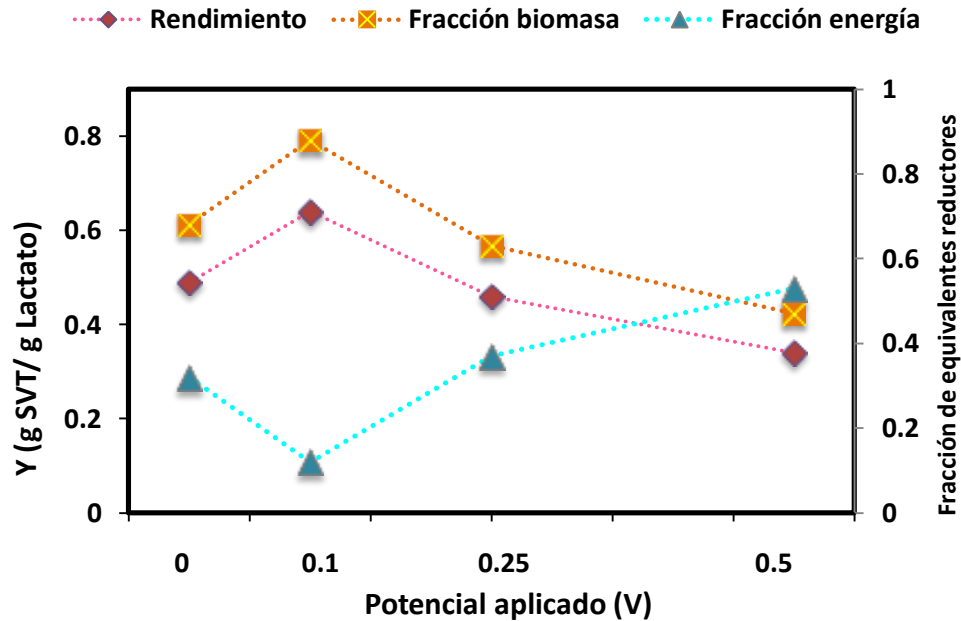


Figura 5.17 Valores de rendimiento celular ($Y_{x/s}$), fracción de equivalentes reductores hacia energía (f_e^0), fracción de equivalentes reductores hacia la síntesis de biomasa (f_s^0) para *Ps. denitrificans* en condiciones aerobias.

En la Tabla 5.5 se presentan los datos graficados en la Figura 5.17 para tratar de hacer un análisis más detallado. El rendimiento ($Y_{x/s}$) para el ensayo de 0.10 V ($C_{0.10}$), es mayor respecto del Control s/v , sin duda es un resultado importante, ya que el efecto del estímulo eléctrico es lo opuesto a lo que se propuso en la hipótesis. Aquí la producción celular aumenta en 4% respecto del control pero no en el consumo de lactato; esto se ve reflejado en los coeficientes de partición en donde la f_e^0 es mayor que f_s^0 .

Para el caso del ensayo de 0.25 V ($C_{0.25}$), el rendimiento celular es muy próximo al del experimento control, sin embargo disminuye en comparación de $C_{0.10}$; entonces es aquí donde comenzamos a notar ese umbral causado por el potencial, como si traspasara una barrera que permite que no solo se vea mejorado el rendimiento sino que también incrementa la velocidad de utilización de sustrato.

Para el experimento con 0.50 V ($C_{0.50}$) ya se puede observar de manera significativa el cambio en el rendimiento y en los coeficientes de partición, f_e^0 y f_s^0 . Ya que el rendimiento es menor en comparación con el Control s/v , $C_{0.25}$ y $C_{0.10}$ dado que hay una menor producción de biomasa y un mayor consumo de lactato, lo cual puede ser consecuencia de que un menor número de electrones provenientes del lactato, son utilizados para la producción de biomasa. Esto se debe a que el metabolismo de *Ps. denitrificans* está favoreciendo al catabolismo y no al anabolismo, ya que al incrementar el potencial eléctrico *Ps. denitrificans* puede estar sufriendo de algún tipo de estrés. Cuando las bacterias están expuestas a un estrés sutil, sufren una detención del crecimiento, pero no inhiben las tasa de utilización del sustrato (Aldsworth et al. 1999; Vasseur et al. 1999). La fuente de carbono y energía es utilizada para síntesis de proteínas y ATP que sirven para protección contra el estrés, como propone Ray y Peters (2008), al observar la disminución del crecimiento en *Pseudomonas araginososa*, después de someterla a estrés químico. En este trabajo el estrés celular tal vez se produjo por cambios en el potencial de la membrana, ocasionados por la aplicación del potencial. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo no es posible explicar de manera precisa que parte de la cadena de transporte fue afectada por el potencial eléctrico.

Tabla 5.5 Rendimiento celular ($Y_{x/s}$), fracción de equivalentes f_e^0 y f_s^0 para *Ps. denitrificans* en condiciones aerobias.

Potencial	$Y_{x/s}$ (g SVT/g Lac)	f_s^0	f_e^0
Control s/v	0.49 ± 0.003	0.68 ± 0.004	0.32 ± 0.004
0.10	0.64 ± 0.003	0.88 ± 0.003	0.12 ± 0.003
0.25	0.46 ± 0.005	0.63 ± 0.006	0.37 ± 0.004
0.50	0.34 ± 0.008	0.47 ± 0.011	0.53 ± 0.001

6. Conclusiones y Perspectivas

Este trabajo se centró en tratar de explicar las modificaciones que produce la estimulación de un campo eléctrico sobre el rendimiento celular *Ps. denitrificans*, con la finalidad de poder aplicar este tipo de tecnologías en el campo de tratamiento de aguas residuales a través del proceso de lodos activados.

La primera respuesta del comportamiento de *Ps. denitrificans* ante la exposición de un potencial eléctrico fue el incremento en la tasa de crecimiento así como la tasa de utilización del sustrato. Además de un incremento en la producción de biomasa y consumo de lactato.

El segundo factor indicativo que demuestra que hubo un impacto significativo en *Ps. denitrificans* después de la aplicación del potencial eléctrico fueron los valores de rendimiento celular y la fracción de energía utilizada para síntesis de biomasa (f_s^0), los cuales fueron disminuyendo a partir de 0.25 V, marcando un umbral en donde se puede decir que a partir de este potencial *Ps. denitrificans* está siendo estimulada de manera positiva ya que cumple nuestra hipótesis.

Se puede concluir que a potenciales entre 0.25 y 0.5 V el metabolismo de *Ps. denitrificans* fue desviado significativamente hacia el catabolismo, además de obtener un incremento muy alto en las velocidades de consumo de sustrato; esto desde el punto de vista tecnológico es favorable. Es decir, al tener un menor rendimiento celular la producción de lodos dentro del tanque de aireación sería menor, además de incrementar de manera significativa la velocidad del consumo de DQO, haciendo más eficiente el sistema.

Este estudio fue un modelo para llevar a cabo un primer análisis de los cambios que podría presentar el metabolismo bacteriano a partir de la estimulación eléctrica a bajos voltajes, sin embargo quedan muchas preguntas por responder, por lo que hay que continuar con el estudio, a continuación se enlistan algunas

recomendaciones que pueden llevarse a cabo en estudios relacionados a este trabajo.

- Aplicar potenciales mayores a 0.5.
- Cuantificar la producción de ATP.
- Determinación de la constante de afinidad del sustrato (k).
- Cuantificar los cambios en el potencial de membrana después del estímulo eléctrico.
- Cuantificar la producción de CO₂, y el consumo de oxígeno para hacer un balance de masa.
- Estudiar el metabolismo anóxico de *Ps. denitrificans*, por ejemplo usando nitrato como aceptor de electrones.
- Utilizar un contaminante modelo y evaluar las cinéticas de degradación antes y después del estímulo eléctrico.

7. Bibliografía

- Aldsworth, T.G., Sharman, R.L. & Dodd, C.E.R., 1999. Bacterial suicide through stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56(5-6), pp.378-383.
- Bard, A.J. et al., 1944. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*,
- Berrisford, J.M., Baradaran, R. & Sazanov, L.A., 2016. Structure of bacterial respiratory complex I. *Biochimica et biophysica acta*, pp.4-13. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272816300044%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26807915>.
- Beschkov, V. et al., 2004. Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal*, 17(2), pp.141-145.
- Brenner, Krieg, S.J., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The Proteobacteria Part A - Introductory Essays. *Springer-Verlag New York Inc.*, p.332.
- Buitron, G. & Gonzalez, a., 1996. Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds. *Water Science and Technology*, 34(5-6-6 pt 3), pp.289-294.
- Cheng, S. et al., 2009. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environmental Science and Technology*, 43(10), pp.3953-3958.
- Daligault, H. et al., 2011. Complete genome sequence of *Haliscomenobacter hydrossis* type strain (O). *Standards in genomic sciences*, 4(3), pp.352-60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Doudoroff, M. et al., 1974. Taxonomic Validity of *Pseudomonas denitrificans* (Christensen) Bergey et al. Request for an Opinion. , 24(2), pp.294–300.
- Efremov, R.G. & Sazanov, L. a, 2011. Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature*, 476(7361), pp.414–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822288>.
- Englande, A.J. & Reimers, R.S., 2001. Biosolids management - sustainable development status and future direction. *Water Science and Technology*, 44(10), pp.41–46.
- Guo, W.Q. et al., 2013. Minimization of excess sludge production by in-situ activated sludge treatment processes - A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 31(8), pp.1386–1396. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.003>.
- Hansen, B. et al., 2000. Operational experiences from a sludge recovery plant. *Water Science and Technology*, 41(8), pp.23–30.
- Kämpfer, P., 1996. MICROBIAL. *Microbial Ecology*, 32(29 Enero 2009 1996), pp.101–121.
- Kornaros, M., Zafiri, C. & Lyberatos, G., 1996. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Water Environment Research*, 68(5), pp.934–945. Available at: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1061-4303&volume=68&issue=5&spage=934>.
- Kristiansen, R. et al., 2013. A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. *The ISME journal*, 7(3), pp.543–554. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3578573&tool=>

pmcentrez&rendertype=abstract.

Lefrou, C., Fabry, P. & Poignet, J.C., 2012. *Electrochemistry: The basics, with examples*,

Liu, Y., 2003. Chemically reduced excess sludge production in the activated sludge process. *Chemosphere*, 50(1), pp.1-7.

Liu, Y. & Tay, J.H., 2001. Strategy for minimization of excess sludge production from the activated sludge process. *Biotechnology advances*, 19(2), pp.97-107.

Van Loey, a, Verachtert, B. & Hendrickx, M., 2001. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science & Technology*, 12, pp.94-102.

Lücker, S. et al., 2010. A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), pp.13479-13484.

Madigan, J., Martinco, M. & Parker, J., 2010.

[Michael_T._Madigan,_John_M._Martinko,_Jack_Parker(BookFi).pdf.

Marazioti, C., Kornaros, M. & Lyberatos, G., 2003. Kinetic modeling of a mixed culture of Pseudomonas Denitrificans and Bacillus subtilis under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Research*, 37(6), pp.1239-1251.

McIlroy, S.J. et al., 2013. "Candidatus Competibacter"-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity. *The ISME Journal*, 8(10), pp.613-624.

McIlroy, S.J. et al., 2013. Metabolic model for the filamentous "Candidatus Microthrix parvicella" based on genomic and metagenomic analyses. *The ISME Journal*, 7(6), pp.1161-1172. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446830>.

- Metcalf, E. & Eddy, H., 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. *Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India*, p.1819.
Available at: <http://www.lavoisier.fr/notice/fr097556.html>.
- Mitchell, P., 1975. Protonmotive redox mechanisms of cytochrome b-cl complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycl. *FEBS Lett.*, 56(1), pp.1-6.
- Natarajan, K.A., 1992. Effect of applied potentials on the activity and growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(9), pp.907-913.
- Nilsson, I. et al., 1982. Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* Cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(2), pp.86-90.
- Park, D.H. et al., 1999. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp.2912-2917.
- Parvanova-Mancheva, T. & Beschkov, V., 2009. Microbial denitrification by immobilized bacteria *Pseudomonas denitrificans* stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal*, 44, pp.208-213.
- Parvanova, M. & Beschkov, V., 2009. Microbial denitrification by immobilized bacteria *Pseudomonas denitrificans* stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), pp.208-213.
- Picó, J. et al., 2015. Modelado de sistemas bioquímicos: De la Ley de Acción de Masas a la Aproximación Lineal del Ruido. *RIAI - Revista Iberoamericana de Automatica e Informatica Industrial*, 12(3), pp.241-252.
- Planck, M., Hoffman, H. & Wolfgang, J., 1995. Structure oxidase cytochrome c.pdf. , pp.660-669.
- Qiao, S. et al., 2014. Inhibition and recovery of continuous electric field application

- on the activity of anammox biomass. *Biodegradation*, 25(4), pp.505–513.
Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10532-013-9677-7>.
- Ray, S. & Peters, C.A., 2008. Changes in microbiological metabolism under chemical stress. *Chemosphere*, 71(3), pp.474–483.
- Rittman, B. & McCarty, P., 2001. Environmental Biotechnology. *Bioscience*, 1(2001), p.420-.
- Sachdeva, V., Tyagl, R.D. & Valéro, J.R., 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology*, 42(9), pp.211–216.
- Sasaki, K. et al., 2010. Bioelectrochemical system stabilizes methane fermentation from garbage slurry. *Bioresource Technology*, 101(10), pp.3415–3422. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.076>.
- Sazanov, L. a & Hinchliffe, P., 2006. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5766), pp.1430–1436.
- She, P. et al., 2006. Electrolytic stimulation of bacteria *Enterobacter dissolvens* by a direct current. *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), pp.23–29.
- Shin, H., Zeikus, J. & Jain, M., 2002. Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), pp.476–481.
- Sperling, M. von. & Lemos, C.A., 2007. *Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors*,
- Stolarek, P. & Ledakowicz, S., 2005. Thermal processing of sewage sludge by drying, pyrolysis, gasification and combustion.pdf. , (1997), pp.333–340.
- Strous, M. et al., 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox

bacterium from a community genome. *Nature*, 440(7085), pp.790–794.

Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16598256.

Svensson-ek, M., Abramson, J. & Larsson, G., 2002. The X-ray Crystal Structures of Wild-type and EQ (I-286) Mutant Cytochrome c Oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. , 2836(2), pp.329–339.

Tay, J.H. et al., 2001. Optimising the preparation of activated carbon from digested sewage sludge and coconut husk. , 44, pp.45–51.

Thrash, J.C. et al., 2007. Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction. *Environmental Science and Technology*, 41(5), pp.1740–1746.

Thrash, J.C. & Coates, J.D., 2008. Review: Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environmental Science and Technology*, 42(11), pp.3921–3931.

Vasseur, C. et al., 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), pp.469–476.

Velasco-Alvarez, N. et al., 2011. Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology*, 102(2), pp.1509–1515. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.111>.

Wang, J.H., Baltzis, B.C. & Lewandowski, G. a., 1995. Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(1), pp.26–41.

Wei, Y. et al., 2003. Minimization of excess sludge production for biological

wastewater treatment. *Water Research*, 37(18), pp.4453–4467.

Yin, X., Qiao, S. & Zhou, J., 2015. Using electric field to enhance the activity of anammox bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (3). Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6631-0>.

Yuichi, S. et al., 2011. Genome sequence of *Nitrosomonas* sp. strain AL212, an ammonia-oxidizing bacterium sensitive to high levels of ammonia. *Journal of Bacteriology*, 193(18), pp.5047–5048.

Principios de las técnicas electroquímicas empleadas en la metodología experimental

B1 Voltamperometría Cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica cuyo principio consiste en explorar una zona de potencial en la que ocurre una reacción electroquímica. Para esto, el potencial del electrodo de trabajo es impuesto y variado linealmente con el tiempo (barrido de potencial $v = dE/dt$). Si la exploración se efectúa hasta un valor límite, después del cual se invierte el sentido del barrido, la técnica se denomina voltamperometría cíclica (VC, Figura 1). Al ritmo con el que varía el potencial en función del tiempo se le conoce como velocidad de barrido. De este modo el barrido de potencial puede alcanzar el valor inicial formándose así un ciclo, el cual puede repetirse tantas veces como se desee (1).

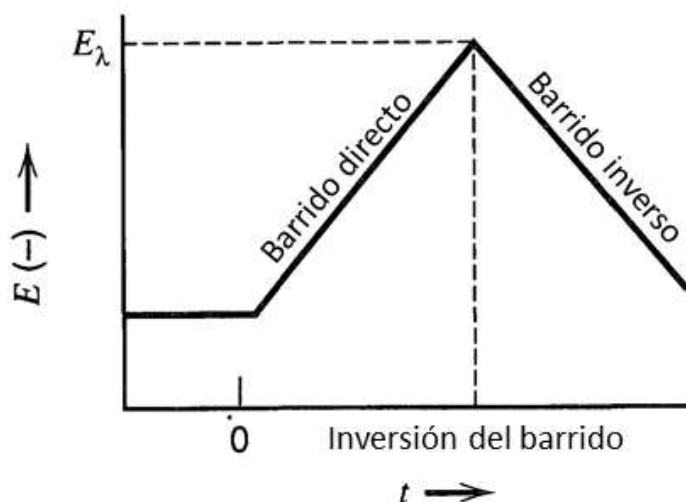


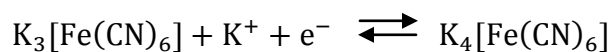
Figura A1. Esquema del barrido de potencial en voltamperometría cíclica. Modificado de (Bard et al. 1944)

Mientras transcurre la reacción electroquímica se producen cambios en la corriente eléctrica, los cuales se pueden graficar en función del potencial para dar lugar a un voltamperograma como se muestra en la Figura 2. Este tipo de curvas contiene información importante del proceso, por ejemplo, indica el potencial en el que ocurre un proceso electroquímico. Este proceso se caracteriza por el aumento en la corriente hasta un punto máximo donde después vuelve a disminuir, formando un pico de coordenadas (E_p, I_p) . Éstos siempre aparecen en la misma región de potencial para la misma reacción redox, por lo que un voltamperograma funciona

como la huella dactilar de la reacción; sin embargo, empleándola cuidadosamente también puede funcionar como una poderosa técnica analítica.

En un experimento de voltamperometría cíclica se utiliza una celda electroquímica de tres electrodos. Ésta consiste en un electrodo de trabajo, en este electrodo ocurrirá la reacción electroquímica de estudio. Se utiliza un electrodo de referencia (RE), que nos permite controlar el potencial aplicado al electrodo de trabajo y seguir la respuesta en la corriente que se produce durante la reacción electroquímica. Y por último, un electrodo auxiliar o contra electrodo (CE), el cual sirve para que la corriente fluya entre WE y CE evitando que pase por RE. Además de los electrodos, la celda electroquímica contiene una solución electrolítica, en la que se encuentran sumergidos los electrodos, completando el circuito eléctrico, y donde además se encuentra la especie electro activa de interés.

El par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ es ampliamente utilizado en estudios con voltamperometría cíclica, especialmente cuando se trabaja en el diseño de nuevos electrodos, donde la respuesta voltamperométrica de este par redox funciona como un estándar. Esta reacción consiste en una transferencia monoelectrónica, la cual es de carácter reversible:



Por lo tanto, los cambios en la respuesta de este par redox están relacionados a las propiedades del electrodo.

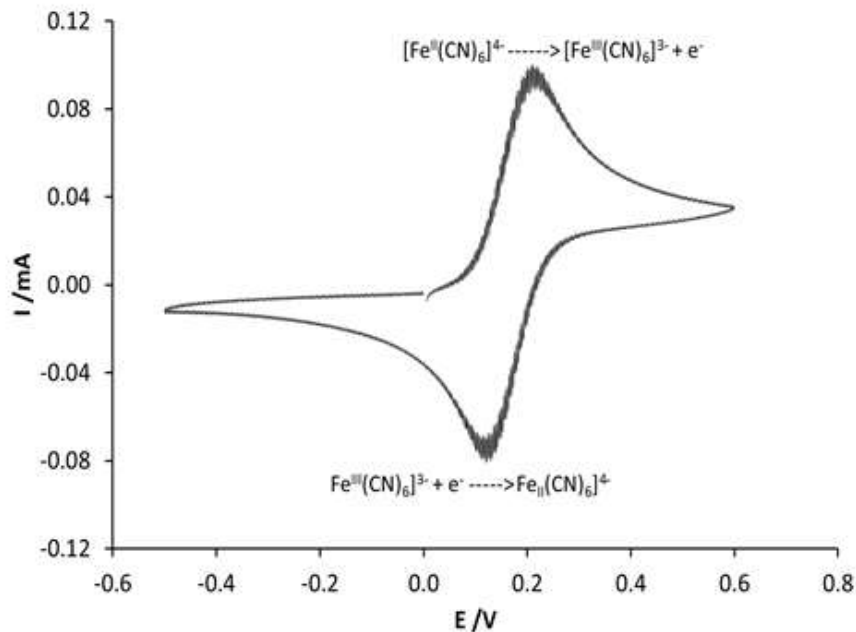


Figura A2. Respuesta voltamperométrica de

En este estudio se utilizó esta técnica para explorar reacciones de corrosión en los electrodos o hidrólisis en el medio electrolítico.

B2 Cronoamperometría

La cronoamperometría convencional, es una técnica potencioestática, en la cual se establece un pulso de potencial con valor constante, durante un intervalo de tiempo y se registra el cambio en la corriente respecto al tiempo, como se muestra en la Figura A3.

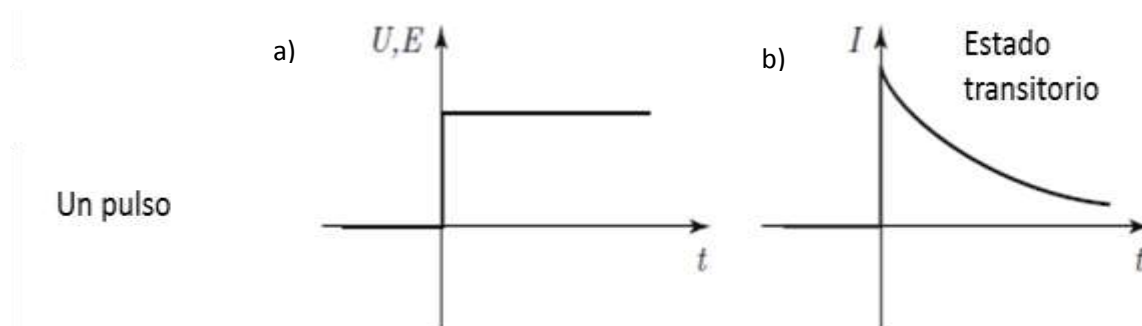


Figura A3. a) Esquema del pulso en el potencial aplicado a la interface de la solución durante un tiempo t . b) Respuesta obtenida en el cambio de corriente respecto al tiempo. Modificado de (Lefrou et al., 2012)

Esta técnica es comúnmente utilizada para obtener coeficientes de difusión, parámetros cinéticos y mecanismos, sin embargo para este estudio únicamente fue utilizada para imponer un potencial fijo y constante durante 24 horas en los sistemas experimentales de las celdas bioelectroquímicas.

Cinéticas de crecimiento y curvas de calibración

En este apartado se presentan las cinéticas de crecimiento de *Ps. denitrificans*, para cada uno de los ensayos con y sin estímulo eléctrico.

B1 Curvas de crecimiento de *Ps. denitrificans* en el reactor rotatorio

En el reactor rotatorio. En la Figura B1 se observan los duplicados de la curva de crecimiento realizada en el reactor cilíndrico rotatorio sin estímulo eléctrico. A cada duplicado se le denominó RR1 y RR2, respectivamente.

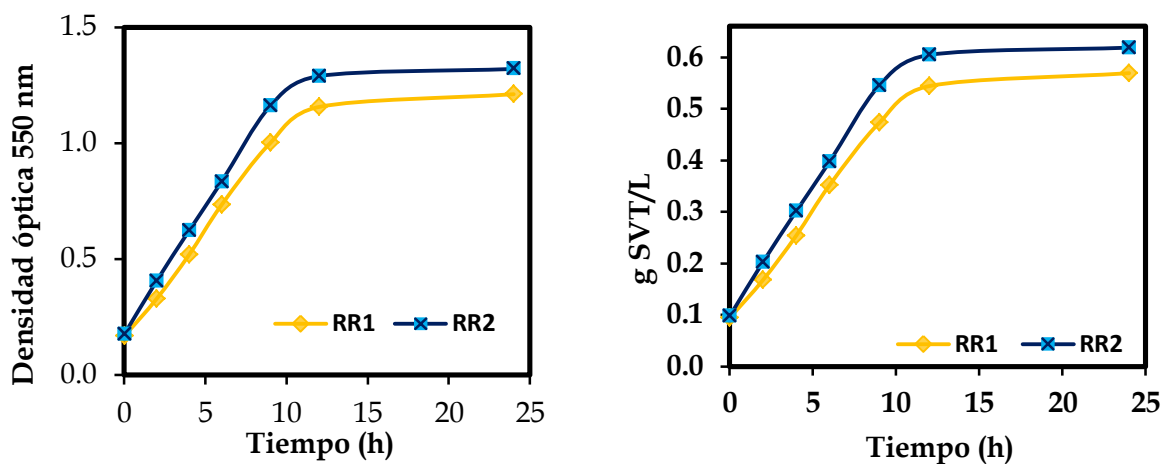


Figura B1 Experimento en el reactor rotatorio, con medio mínimo mineral, en condiciones aerobias.

De cada una de las rectas se obtuvieron las pendientes para obtener las velocidades de producción de biomasa, para compararlas más adelante con los sistemas implementados en las celdas electroquímicas. La tabla con las velocidades de producción de biomasa se muestra a continuación.

B2 Cinéticas de crecimiento para *Pseudomonas denitrificans* sin potencial aplicado

A continuación se muestran las gráficas obtenidas para cada una de las cinéticas sin aplicación de un potencial eléctrico.

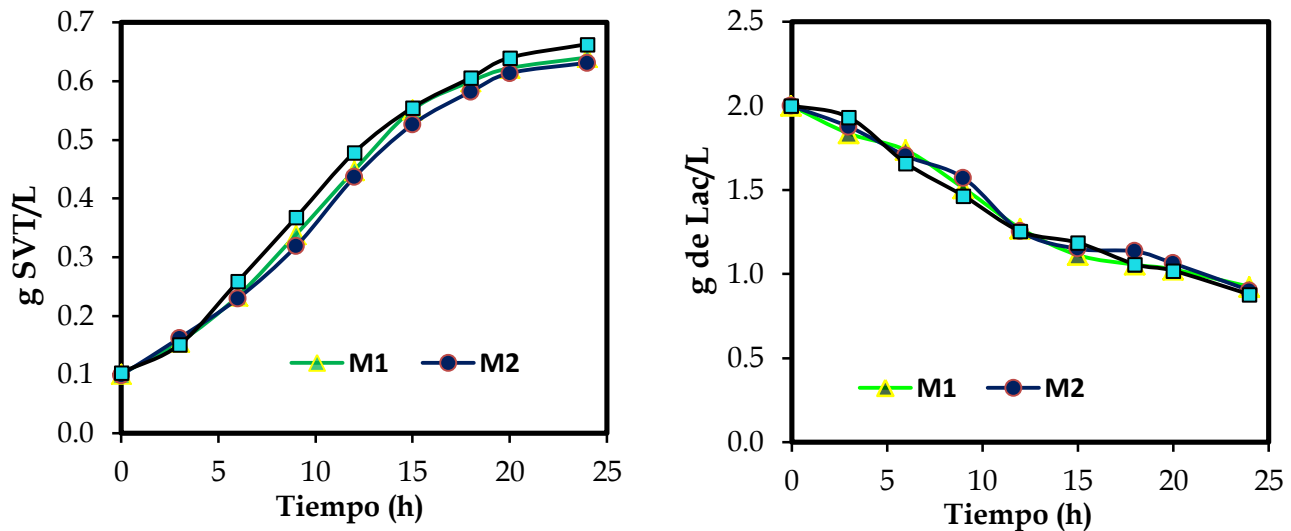


Figura B2 Experimento control, con medio mínimo mineral bajo condiciones aerobias sin aplicación de un estímulo eléctrico

B3 Cinética bajo la estimulación eléctrica de 0.10 V

En el primer ensayo con estimulación eléctrica, se impuso un potencial de celda de 0.1 V, durante 24 h continuas. En la Figura B3 se muestra la gráfica con los resultados de este experimento, donde se observa un incremento en la producción de biomasa en relación al experimento sin estímulo eléctrico, dado que se obtuvo una concentración de biomasa de 0.72 ± 0.01 g SVT/L, es decir un incremento de 34%; mientras que la utilización de lactato tuvo un aumento de 5.5% en comparación con el control. Lo que estos resultados denotaron, fue que la aplicación del potencial eléctrico, estimuló una mayor producción de células, pero esto no provocó un consumo significativamente mayor de lactato; es decir, el sistema no fue muy eficiente ya que la producción de biomasa es considerablemente mayor que en el ensayo sin estímulo eléctrico pero no se observó un cambio significativo en el consumo del lactato.

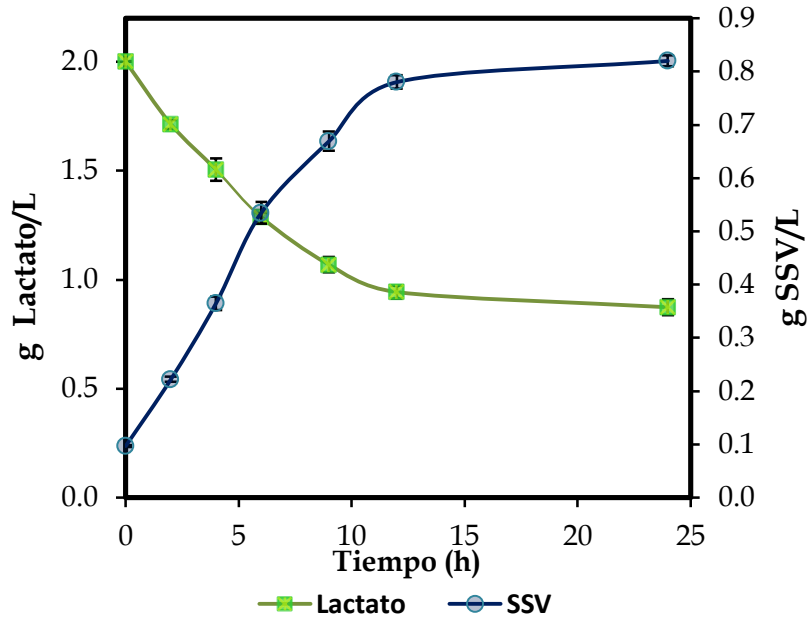


Figura B3 Cinética de crecimiento de *Ps. denitrificans* bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante. Aplicación de un potencial de celda de 0.1 V, durante 24 h continuas.

B4 Cinética bajo la estimulación eléctrica de 0.25 volts

El segundo ensayo se realizó con un potencial de 0.25 V durante 24 h continuas. En la Figura B4 se observó que el consumo de lactato fue de 1.74 ± 0.04 g/L, el cual fue superior tanto en el experimento sin estímulo eléctrico, como en el ensayo con un potencial de 0.1 V ($C_{0.1}$), dado que para $C_{0.1}$ el consumo de lactato fue de 1.06 ± 0.03 g/L y 1.13 ± 0.05 g/L para el ensayo sin estímulo eléctrico. En porcentaje, esto representó un incremento de 30% para $C_{0.1}$ y 34% con respecto al ensayo sin estímulo eléctrico. No obstante, en este caso también hubo un considerable incremento en la biomasa en comparación con el ensayo sin estímulo eléctrico, dado que incremento en un 55% más que lo estimado en ensayo sin estímulo eléctrico. Con estos resultados se demostró que la aplicación de un campo eléctrico, no solo tuvo efecto en el crecimiento de *Ps. denitrificans*, sino que también hubo un estímulo notable en el consumo de lactato.

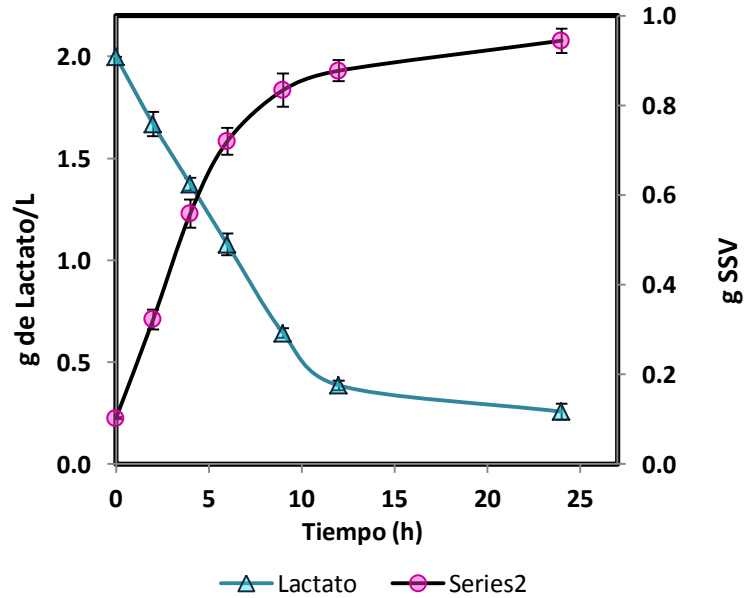


Figura B4 Cinética de crecimiento para *Ps. denitrificans* bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante. Aplicación de un potencial de celda de 0.25 V, durante 24 h continuas.

B5 Cinética bajo la estimulación eléctrica de 0.50 volts

En la Figura B5, se muestran los perfiles de incremento en la biomasa y el consumo de lactato después de 24 h de aplicación constante de un potencial de 0.5 V. Como se puede observar, la mayor concentración de biomasa se cuantificó en 0.67 ± 0.03 mg SSV/L y el consumo de lactato fue de 100%. Al comparar el consumo de lactato y la producción de biomasa para esta celda ($C_{0.5}$) con respecto a de E_c , $C_{0.1}$, $C_{0.25}$, se observó un resultado interesante, dado que en el ensayo sin corriente eléctrica, se alcanzó una menor concentración de biomasa ($0.54 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g SSV/L}$), y un menor consumo de lactato (53%), en contraste a los resultados generados en este experimento al aplicar 0.5 V. La concentración de biomasa fue 35% superior que en el experimento control, pero menor en relación a la concentración de biomasa obtenida en $C_{0.1}$ (0.72 ± 0.06) y en $C_{0.25}$ (0.84 ± 0.03). Además, el consumo de lactato en este ensayo también fue mayor respecto de $C_{0.1}$ (56.5%), $C_{0.25}$ (87%) y el experimento control, ya que hubo un consumo de 100%. Por lo tanto, con estos

resultados se puede sugerir que el efecto del campo eléctrico para este experimento propicia una mayor degradación de lactato y una menor producción de biomasa.

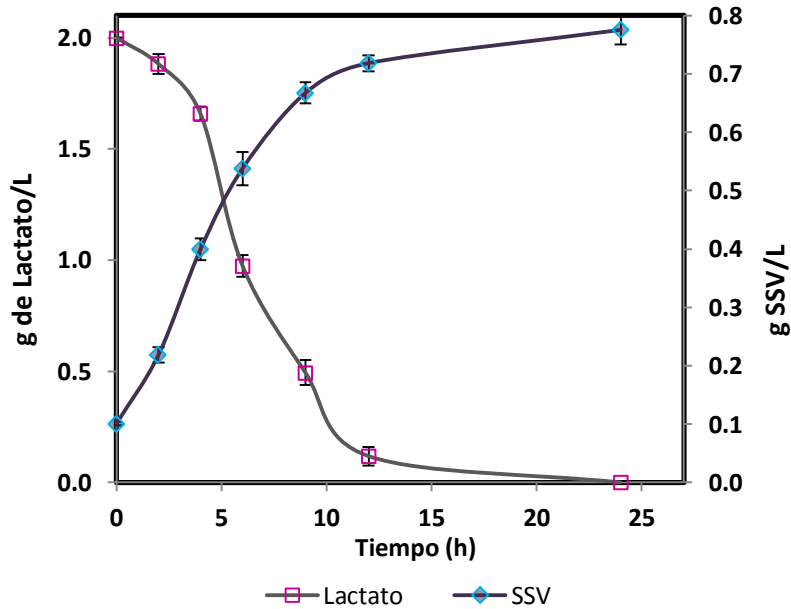


Figura B5 Cinética de crecimiento para *Ps. denitrificans* bajo condiciones aerobias a una temperatura de 30 °C y agitación constante. Aplicación de un potencial de celda de 0.5 V, durante 24 h continuas.

B6 Curvas de calibración

A continuación se muestran los datos obtenidos de la electroforesis capilar para la obtención de las curvas de calibración para la determinación de la concentración de lactato.

Tabla B1 Áreas de pico, para los estándares de lactato

Electroforesis capilar				
Calibración 1		2	3	4
ppm	Área	Área	Área	Área
1000	578	623	601	30
750	406	479	443	23
500	262	325	294	16
250	155	175	165	7
50	20	22	21	2

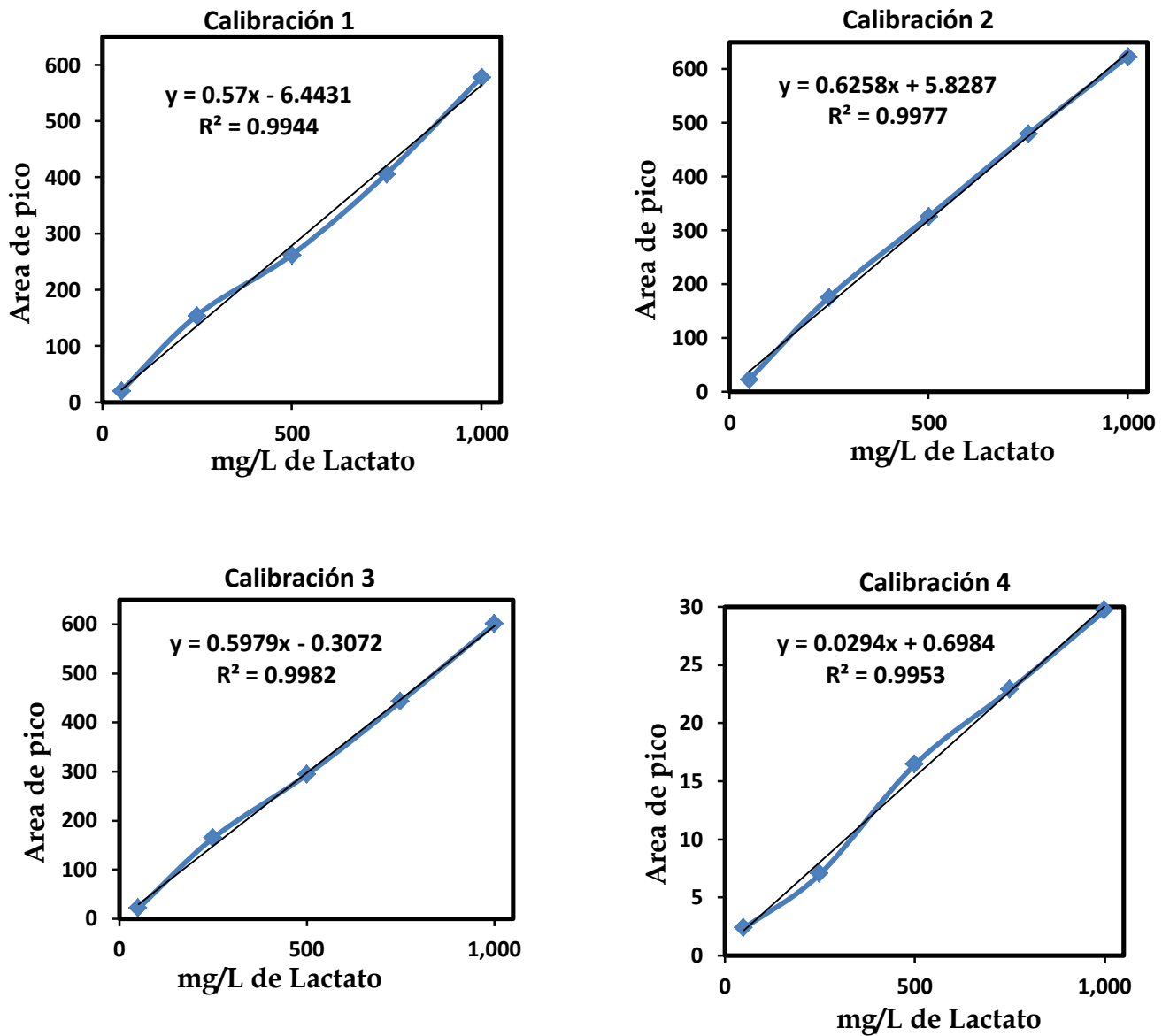


Figura B6 Curvas de calibración de electroforesis capilar para lacto, con línea de tendencia

En la tabla B2 se presentan las concentraciones para la curva de calibración para la estimación de biomasa expresada en SVT.

Tabla B2 Concentración de biomasa expresada en SVT en función de la O.D, con desviación estándar y porcentaje de error.

Medias		Desviación Estándar y % de error		
O.D (550 nm)	SVT (mg/L)	DS-O.D	DS-SVT	DRE %
0.03	0.20	0.00	0.00	0.00
0.12	87.60	0.01	7.30	8.33
0.24	145.08	0.02	6.00	4.14
0.46	244.64	0.03	8.80	3.60
0.81	370.25	0.06	10.40	2.81
1.06	515.99	0.05	14.60	2.83
1.32	627.62	0.02	15.00	2.39
1.49	699.22	0.06	15.80	2.26
1.71	791.96	0.04	8.00	1.01
1.98	938.15	0.02	9.80	1.04
2.19	1011.56	0.01	8.80	0.87