



MEDIO AMBIENTE
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES



IMTA
INSTITUTO MEXICANO
DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

COORDINACIÓN DE DESARROLLO PROFESIONAL E INSTITUCIONAL

SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO

TESIS

DINAMICA POBLACIONAL DE CONSORCIOS EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS USADAS PARA EL TRATAMIENTO DE VINAZAS Y MELAZA

que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias y Tecnología del Agua

presenta
Victor Hugo Guadarrama Pérez

Tutor: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Jiutepec, Morelos

Año 2022





Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada **“DINÁMICA POBLACIONAL DE CONSORCIOS ES CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS USADAS PARA EL TRATAMIENTO DE VINAZAS Y MELAZA”**, otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

VICTOR HUGO GUADARRAMA PÉREZ



Jiutepec, Morelos, agosto de 2022



JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Secretario: Dra. Tania Gutiérrez Macías

Vocal 1: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Vocal 2: Dra. Elizabeth Ernestina Godoy Lozano

Vocal 3: Dra. Marina Elizabeth Rincón González

Lugar donde se realizó la tesis:
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

Tutora de tesis:
Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a la Dra. Petia Mijaylova Nacheva que bajo su tutoría y dirección desarrollé mis habilidades y aptitudes en la investigación, así como de carácter personal. Agradezco a los integrantes del comité tutorial por sus valiosos comentarios en temas de su competencia que hicieron crecer este trabajo de investigación:

Dra. Elizabeth Ernestina Godoy Lozano

Dra. Marina Elizabeth Rincón González

Dra. Tania Gutiérrez Macías

Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Agradezco al Dr. Jesús Hernández Romano de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos por facilitarnos sus instalaciones para la extracción de DNA y a la Dra. Elizabeth Ernestina Godoy Lozano por su apoyo para el análisis de las comunidades microbianas.

También agradezco a todos mis compañeros de laboratorio.

Finalmente, agradezco a CONACYT por el apoyo económico al proyecto de ciencia básica A1S-26278 “Dinámica poblacional de consorcios microbianos en celdas de biocombustible usadas para el tratamiento de desechos líquidos con alto contenido de materia orgánica” (SEP-CONACYT, 2017-2018), al IMTA por la infraestructura proporcionada y por el apoyo otorgado a todas las personas que trabajan en ésta gran institución.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y compañera de vida.

“No hay obstáculos imposibles; solo hay voluntades fuertes o débiles”

-Julio Verne-

RESUMEN

Los sustratos complejos como las vinazas y melaza son ampliamente utilizados en sistemas bioelectroquímicos. Sin embargo, se sabe poco acerca de los cambios en la composición microbiana en Celdas de combustible microbianas (CCM) utilizando esos sustratos. En la presente investigación se evaluaron diferentes factores para la producción de bioelectricidad en CCM. El objetivo fue identificar posibles consorcios electroactivos se evaluaron CCM de una sola cámara con o sin catalizador, CCM de doble cámara, dos tipos de inóculo, diferentes sustratos y concentraciones. Finalmente, se caracterizaron las comunidades microbianas en las biopelículas obtenidas en CCM alimentadas con vinazas y melaza por medio de secuenciación de amplicones del gen rRNA 16S.

Al inicio, se evaluó la producción de bioelectricidad utilizando dos inóculos diferentes y se seleccionó el de lodos granulares anaerobios (LG). Las CCM inoculadas con LG presentaron mejor rendimiento en la densidad de potencia en comparación con sedimentos de arroyo (SH). Además, se determinó que el acetato de sodio tiene mejor rendimiento que la glucosa produciendo densidades de potencia hasta 10 veces mayores. Se identificaron algunas diferencias en la morfología de las biopelículas con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Al alimentar melaza y vinazas en las CCM se alcanzaron densidades de potencia de hasta 60 mW/m^2 y fueron caracterizadas utilizando modelado de circuitos equivalentes en un análisis de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés).

La comunidad microbiana observada a nivel de género en la CCM alimentada con vinaza mezcalera fue constituida por: *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* y *Taibaiella*. En la CCM alimentada con vinaza tequilera fueron: *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Arconobacter* y *Brevundimonas*. En la CCM alimentada con melazas se encontraron: *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Lactobaillus*, *Clostridium* y *Sphingobacterium*. Finalmente, en el inóculo se caracterizaron algunas archaeas y algunas bacterias metanogénicas. Estas comunidades son susceptibles para la producción de cocultivos para su uso en CCM y desarrollar consorcios electroactivos más robustos.

ABSTRACT

Complex substrates such as vinasses and molasses are widely used in bioelectrochemical systems. However, little is known about changes in microbial composition in microbial fuel cells (MFC) using these substrates. In the present research, different factors for bioelectricity production MFC were evaluated. Objective was identify possible electroactive consortium in Single-Chamber MFC with or without catalyst and Dual-chamber MFC, two types of inoculum, different substrates and concentrations were evaluated. Finally, the microbial communities in MFC fed with vinasses or molasse were characterized by 16S rRNA amplicon sequencing.

Anaerobic granular sludge was selected like better inoculum who MFC has presented a high performance in power density compared with stream sediments. Furthermore, sodium acetate performs better substrate than glucose, MFC feed with acetate produced power densities up to 10 higher. Some differences in biofilms were identified using Scanning Electron Microscope (SEM). MFC Feed with molasse and vinasses produced power densities up to 60 mW/m², and MFC were characterized using equivalent circuit modeling by Electrochemical Impedance Spectroscopy analysis.

The microbial community observed to genus level in the MFC fed with mezcal vinasse was composed by: *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* and *Taibaiella*. In MFC fed with tequila vinasse: *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Arconobacter* and *Brevundimonas*. In MFC fed with molasses was: *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Sphingobacterium*. Finally, some archaea and methanogenic bacteria were characterized in the inoculum. These communities are feasible for the production in co-cultures for use in MFC like inoculum and develop more robust electroactive consortia.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	4
Celdas de combustible microbianas	4
Fuentes de sustrato para celdas de combustible microbianas	11
Potencial del inóculo para su uso en CCM	16
Mecanismos de transporte de electrones	18
Secuenciación Masiva y el gen rRNA 16S.....	21
Softwares para el análisis de secuencias del gen rRNA 16S y bases de datos.....	24
Alcances de la inferencia metabólica a partir de la anotación taxonómica del gen rRNA 16S	27
Caracterización de la ecología microbiana en CCM	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
METODOLOGÍA.....	32
Estrategia experimental.....	32
Características de las CCM.....	33
Efecto del inóculo, del sustrato y parámetros de operación en CCM de una y dos cámaras (E1) ..	35
Estudios electroquímicos	36
Evaluación de CCM de una cámara usando catalizador en el cátodo.....	37
Producción de bioelectricidad en CCM de dos cámaras alimentadas con vinazas y melaza (E2)...	39
Determinación de comunidades microbianas en CCM alimentadas con vinazas y melaza (E3).....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
Efecto de la fuente del inóculo sobre la producción de electricidad en CCM.....	42
Evaluación del efecto del tipo de sustrato, su concentración y del pH en CCM de dos cámaras	47
Aguas residuales utilizadas como sustratos para la alimentación de CCM de una o dos cámaras..	51
Producción de bioelectricidad en CCM de una cámara alimentada con melaza.....	51
Producción de bioelectricidad en el tratamiento de vinazas y melaza en CCM de dos cámaras	57
Determinación de la composición microbiana en CCM alimentadas con vinazas y melaza	79
CONCLUSIONES.....	93
PERSPECTIVAS	96
REFERENCIAS	97
ANEXOS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una CCM de doble cámara.....	5
Figura 2. Materiales derivados de carbono usados en electrodos de CCM	6
Figura 3. Arquitecturas de CCM de doble cámara.....	7
Figura 4. Configuraciones de CCM.....	9
Figura 5. Mecanismos de intercambio de electrones en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	19
Figura 6. Mecanismos de intercambio de electrones en <i>Shewanella oneidensis</i>	20
Figura 7. Regiones variables del gen ribosomal 16S.....	23
Figura 8. Resumen gráfico de la estrategia experimental	32
Figura 9. CCM de diseño modular	33
figura 10 Esquema del sistema de adquisición de datos	34
Figura 11. Sitio de muestreo para la obtención de inóculos	35
Figura 12. Representación esquemática de la preparación del cátodo con catalizador	38
Figura 13. Rendimiento de CCM inoculadas con lodos granulares y con sedimentos.....	43
Figura 14. Curvas de polarización en CCM de una cámara	43
Figura 15. Determinación de las resistencias internas y potencial anódico	45
Figura 16. Voltaje a circuito abierto, potencial anódico y catódico	46
Figura 17. Efecto del pH, del tipo de sustrato y su concentración en CCM de doble cámara.....	49
Figura 18. Determinación de la DQO total.	51
Figura 19. Producción de bioelectricidad usando melazas como sustrato	54
Figura 20. Análisis de microscopía electrónica de barrido	56
Figura 21. Producción de voltaje a circuito cerrado en CCM de dos cámaras.....	58
Figura 22. Pruebas electroquímicas el ciclo C1	60
Figura 23. Pruebas electroquímicas del ciclo C2.....	61
Figura 24. Pruebas electroquímicas del ciclo C3.....	62
Figura 25 Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C4	63
Figura 26. Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C5	65
Figura 27. Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C6.	66
Figura 28 Densidad de potencia producida durante el tratamiento de vinazas y melaza	67
Figura 29. Voltaje y densidad de potencia máximos producidos en CCM de dos cámara	69
Figura 30. Degradación de materia orgánica y eficiencia coulombica.....	76
figura 31. Gel de electroforesis del DNA genómico.	76
Figura 32. Analisis de calidad de secuencias	78
Figura 33. Curva de rarefacción en relación de las variantes secuencias de amplicones	79
Figura 34. Curva de rarefacción en relación con el índice de diversidad de Faith.	81
Figura 35. Análisis PERMANOVA utilizando el índice Unifrac ponderado.	81
Figura 36. Árbol filogenético.....	82
Figura 37. Gráfica de barras con las principales familias asignadas.....	84
Figura 38. Gráfica de barras con los principales géneros asignados.....	85
Figura 39. Análisis de coordenadas principales para índices de diversidad beta	87
Figura 40. Relación de la diversidad alfa y la eficiencia coulombica.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ánodos de distintos materiales y su efecto sobre la densidad de potencia	6
Tabla 2. Producción de electricidad a partir del tratamiento de vinazas y melazas con CCM.....	15
Tabla 3. Cultivos puros usados para la producción de bioelectricidad en CCM	16
Tabla 4 Uso de co-cultivos para la producción de electricidad en CCM	17
Tabla 5 Unidades taxonómicas coincidentes en bases de datos para asignar taxonomía.....	25
Tabla 6 Secuencias depositadas en las principales bases de datos	26
Tabla 7 Configuración de las CCM para la evaluación del inoculo y el TRH	36
Tabla 8. Resumen de resultados en este estudio respecto al rendimiento de las CCM.....	70
Tabla 9 Valores del modelado de circuitos equivalentes en las pruebas de EIS en CCM de doble cámara para el tratamiento de vinazas y melazas	73
Tabla 10. Analisis de calidad de las secuencias del gen 16S rRN.....	78
Tabla 11 Comunidades microbianas identificadas en procesos con vinazas y melaza	92

ABREVIATURAS

ATP, trifosfato de adenosina
B, biopelícula
BEA, bacterias electroactivas
CCM, celda de combustible microbiana
CME, consorcio microbiano electrógeno
CNT, nanotubos de carbono
CymA, proteína periplásmica anclada a membrana
Cyt C, proteína citocromo C
Dc, Densidad de corriente
DMO, degradación de materia orgánica
dNTP, desoxi nucleótidos trifosfato
ddNTP, didesoxi nucleótidos trifosfato
DP, dinámica poblacional
Dp, Densidad de potencia
DQO, demanda química de oxígeno
E, etapa
I, inóculo
IEA, agencia internacional del medio ambiente
MacA, proteína periplásmica transportadora
MEE, mecanismos de intercambio de electrones
MIP, membrana de Intercambio protónico
Mtr A/B/C, proteínas transmembranales de intercambio de electrones
NAD⁺, dinucleótido de nicotinamina y adenina oxidado
NADH, dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido
NGS, tecnologías de la secuenciación de nueva generación
Om(a, b y c) B/C, proteínas transmembranales
OMC A/E/S, proteínas tipo citocromo C
PD, densidad de potencia
PM, perfil metabólico
PpcA-E, proteína periplásmica anclada a membrana
PPi, pirofosfato
PT, perfil taxonómico
Pt, platino
PTFE, politetrafluoroetileno
Q, reservorio de quinonas
QH, reservorio de quinonas reducido
S, sustrato
SNP, polimorfismo de nucleótido único
TRH, tiempo de retención hidráulico
V, voltaje
VCA, voltaje a circuito abierto

INTRODUCCIÓN

El consumo de energía eléctrica se ha duplicado en los últimos 20 años y gran parte de su producción depende de combustibles fósiles como el carbón, gas natural y petróleo, que incrementan la contaminación. Además, hemos llegado a un punto sin retorno en cuanto al consumo de combustibles fósiles donde seremos testigos de su agotamiento inminente (Martins et al., 2019). En contraste, la generación de electricidad por medio de recursos renovables, como la hidroeléctrica, nuclear y eólica representa el 30% de la producción total. Sin embargo, la producción de electricidad a partir de desechos apenas alcanza el 0.4% (IEA, 2018). Actualmente, existe un gran interés por generar energía y biocombustibles desde materia de desecho, tal es el caso que países como Noruega y Suecia importan desechos para generar energía (NOU, 2018).

En México, industrias como la tequilera y azucarera (caña de azúcar) representan una actividad significativa dentro de la agricultura y la economía del país. Sin embargo, sus procesos de producción generan una gran cantidad de desechos orgánicos líquidos que en la mayoría de los casos contaminan los cuerpos de agua cercanos. Estos desechos contienen una gran cantidad de materia orgánica como es el caso de las vinazas (desecho de la industria tequilera) que poseen una gran cantidad de azúcares, ácidos orgánicos, esteroides y alcoholes (Moran-Salazar et al., 2016). Por su parte, las melazas (desecho de la industria azucarera) son ricas en azúcares, principalmente, sacarosa, glucosa y fructuosa. La alta carga orgánica que presentan estos desechos los convierte en excelentes fuentes de sustrato para alimentar procesos de fermentación y la producción de energía y/o biocombustibles.

Los dispositivos capaces de generar electricidad de manera limpia ganan terreno rápidamente, por ejemplo, la producción de electricidad con sistemas fotovoltaicos incrementó 60 veces en la década de 2005 al 2015 (IEA, 2018). Por lo tanto, pronosticamos un gran crecimiento en el uso de este tipo de tecnologías. Otro dispositivo que gana poco a poco más terreno a nivel de investigación son las celdas de combustible microbianas (CCM). A comparación de los sistemas fotovoltaicos, las CCM resultan más interesantes debido a que pueden producir electricidad y al mismo tiempo eliminar la materia orgánica de desechos líquidos como las vinazas o melazas. Además,

en estos dispositivos se pueden producir compuestos de interés, como algunos ácidos orgánicos, alcoholes, metano, hidrogeno y pueden funcionar como biosensores o captadores de compuestos recalcitrantes o metales pesados (Li *et al.*, 2017).

Las CCM son dispositivos electroquímicos que degradan la materia orgánica de desechos líquidos por medio del metabolismo bacteriano. Las bacterias usan como sustrato el desecho líquido para crecer en forma de biopelícula sobre la superficie de un electrodo denominado ánodo, después las bacterias electroactivas (BEA) son capaces de transferir electrones al ánodo por distintos mecanismos. Posteriormente, los electrones son conducidos por un circuito externo hacia otro electrodo denominado cátodo. Debido a un diferencial de potencial eléctrico entre el ánodo y el cátodo se genera una tensión eléctrica. Finalmente, en el extremo catódico los electrones junto con los protones generados ambos en el ánodo, son utilizados para reducir oxígeno (u otro compuesto) por medio de un catalizador, normalmente platino. En otros casos, un biocátodo constituido por una biopelícula funciona como biocatalizador en lugar del platino genera agua como producto final. Con base en lo anterior, los consorcios que crecen en las CCM juegan un papel importante, tanto en la degradación de materia orgánica, como en la producción de electricidad. Por ello, se ha buscado describir la diversidad microbiana para poder comprender como funcionan los consorcios microbianos en conjunto (Yang & Cheng, 2021; Negassa *et al.*., 2021;.Choudhury *et al.*, 2021).

Los filos *Protoeobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteriodetes* se han encontrado con una gran abundancia dentro de los consorcios caracterizados en CCM utilizando secuenciación del gen ribosomal 16S (rRNA 16S) de la subunidad pequeña del ribosoma procarionte (Bretschger *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2017). Sin embargo, resulta complicado identificar a nivel de especie debido a algunas de las limitaciones en las tecnologías de secuenciación y análisis por regiones variables del gen rRNA 16S, ya que este gen presenta una gran similitud entre especies (Kozich *et al.*, 2013). Actualmente, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés, Next Generation Sequencing) han crecido rápidamente y como consecuencia se ha reducido el costo y el tiempo de secuenciación. Esto ha permitido que se realicen estudios más complejos como aquellos basados en metagenómica

(secuenciación de DNA total obtenido de una muestra ambiental) que permiten un análisis de diversidad microbiana más robusto que el del gen rRNA 16S por el uso de diversos marcadores de copia única (Segata *et al.*, 2012).

Los mecanismos de transferencia de electrones (TEM, por sus siglas en inglés) mejor descritos fueron con base en el estudio de las BEA *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis* MR1. Ambos microorganismos presentan mecanismos directos o indirectos que involucran a los citocromos C localizados sobre la superficie de la membrana plasmática o en los denominados pilis que son extensiones de la membrana en forma de cables y que alcanzan hasta 20 µm de longitud (Saratale *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2021). Estos mecanismos funcionan sinérgicamente dentro de los consorcios microbianos para la generación de electricidad. Sin embargo, otros mecanismos de intercambio de electrones de otras especies pudieran estar involucrados así como las relaciones sintróficas para el aprovechamiento de los compuestos generados entre diferentes especies de microorganismos para poder mejorar la eficiencia de las CCM (Pirbadian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2022;).

En éste estudio, nos interesa conocer el papel de los consorcios microbianos para la producción de electricidad y la degradación de materia en función del inóculo, del tiempo de residencia hidráulica y la ecología microbiana. Utilizando CCM de una y doble cámara, se evaluó el efecto del tiempo de residencia hidráulica y el tipo de inóculo sobre la producción de electricidad y degradación de materia orgánica usando como sustrato una solución de acetato. En la segunda etapa, se estudió la ecología microbiana y la funcionalidad de los consorcios por medio de análisis genómicos con la finalidad de aislar consorcios especializados para la generación de electricidad en CCM. Finalmente, en las perspectivas se proponen estrategias para incrementar la producción de electricidad en modo continuo, con base en el aislamiento y cultivo de consorcios especializados y un programa de variables controladas que involucren el uso de diferentes sustratos en CCM de una y dos cámaras.

ANTECEDENTES

Celdas de combustible microbianas

Las CCM son dispositivos electroquímicos donde se efectúan reacciones óxido-reducción; en la cámara anódica se degrada la materia orgánica debido al metabolismo microbiano de bacterias que crecen sobre el electrodo el cual funciona como aceptor de electrones. Los electrones son transferidos por un circuito externo al cátodo, lo que genera la producción de una corriente eléctrica debido a la diferencia de potencial redox entre ambos electrodos. Los electrones son transferidos al oxígeno que funciona como aceptor final, lo que genera agua como producto final en la cámara catódica (en algunos casos se utilizan electrolitos para facilitar esta reacción en sustitución de un catalizador, por ejemplo, solución de ferrioxalato de potasio). Para efectuar la reducción del oxígeno son necesarios protones que provienen desde la cámara anódica (del metabolismo microbiano) y que atraviesan una membrana que se sitúa entre ambas cámaras (Oh y Logan 2006). Las membranas más usadas en estudios de laboratorio son las del tipo intercambio protónico (MIP), que son permeables para los iones hidronio, ^+H_3O o simplemente, H^+ .

Dentro de una CCM se encuentran situados dos electrodos, un ánodo y un cátodo. Su arquitectura puede variar dependiendo del estudio que se realice, sin embargo, las CCM más populares son de una cámara, de dos cámaras y las apiladas con múltiples cámaras. En las CCM de una cámara, el ánodo se sitúa en el interior y en contacto con el sustrato (por ejemplo, solución de acetato). El cátodo se encuentra dentro de la misma cámara pero una cara se encuentra hacia el exterior y está en contacto directo con el aire del medio ambiente que funciona como fuente de oxígeno. En el interior de la cámara puede albergar el crecimiento de biopelícula cuando se trate de un biocátodo, estas celdas son las más sencillas. Las CCM de dos cámaras contienen un electrodo en cada cámara, por lo que se designan como cámara anódica y cámara catódica, éstas se encuentran separadas por una membrana de intercambio protónico (MIP) que permite el paso de H^+ (Figura 1). La cámara anódica es similar a las CCM de cámara única, aquí se suministran los nutrientes para el desarrollo de la biopelícula. En la cámara catódica se introduce oxígeno (o alguna otra fuente del mismo, por ejemplo aire) y se produce agua

por medio de una reacción óxido-reducción acoplada al consumo de electrones y protones (Logan *et al* 2016).

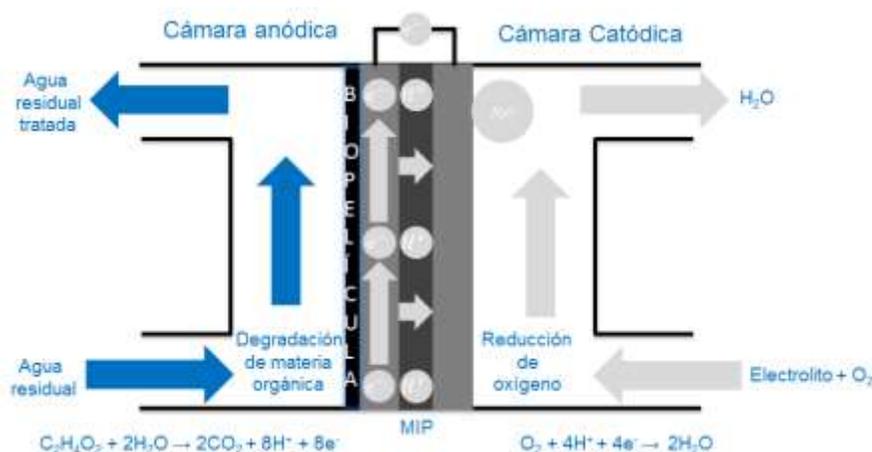


Figura 1. Esquema de una CCM de doble cámara. Dispositivo electroquímico capaz de reducir la materia orgánica del agua residual y generar un voltaje debido al metabolismo bacteriano.

Los factores que influyen sobre el funcionamiento de una CCM son diversos y a continuación se describen algunos de ellos. La arquitectura de una CCM juega un papel importante, el tamaño y el volumen de agua residual a tratar resulta crucial para la producción de electricidad, ya que un escalamiento desde el laboratorio que va desde unos mililitros o litros de capacidad hasta decenas de miles de litros representa una tarea compleja para los investigadores (Dewan *et al*, 2008). Por otra parte, se ha visto que la distancia entre los electrodos afecta las resistencias internas por lo que una distancia grande entre los mismos provoca un decremento en el voltaje, por el contrario, entre más cerca se encuentren un electrodo del otro la resistencias producidas serán menores.

Estas resistencias provocan las pérdidas óhmicas. Logan *et al.* (2018) evaluaron la producción de bioelectricidad usando CCM de una cámara con ánodos de brocha de grafito con una separación de 1 o 3 cm del cátodo, por pruebas de espectroscopia de impedancia electroquímica, los autores encontraron que a pesar de que el potencial anódico fue similar en ambos casos, el potencial catódico fue distinto. Los autores también determinaron el efecto de las resistencias óhmicas en función de la conductividad del medio acuoso y calcularon la distancia óptima entre electrodos, resultando en 1 cm para la mayor producción de electricidad. Además, el material de los

electrodos influye sobre el crecimiento de la biopelícula, características como la porosidad, conductividad y estabilidad, por lo que resulta importante a la hora de seleccionar el material para un electrodo. En la [Tabla 1](#) se enlista una serie de investigaciones relacionadas con el efecto del material usado en el ánodo sobre la densidad de potencia (D_p) producida.

Tabla 1 Ánodos de distintos materiales y su efecto sobre la densidad de potencia

Material	Densidad de potencia máxima	Referencia
Brocha de fibra de grafito	1430 mW/m ²	Logan et al., 2007
Tela de carbón tratada con amonio	1970 mW/m ²	Cheng & Logan, 2007
Oxido de Titanio	1.4 μ W/cm ²	Thorne et al., 2011
Sillas Berl de porcelana	130 mW/m ²	Hidalgo et al., 2014
Acero inoxidable cubierto de grafeno	2143 mW/m ²	Zheng et al., 2015
Quitosano-CNT	500 mW/m ²	Lui et al., 2014

CNT, Nanotubos de Carbono; sustrato, agua residual; Microorganismos, mezcla.

Debido las características favorables para el desarrollo de biopelículas y su bajo costo, los materiales derivados de carbono se usan de manera común en las CCM. Las variantes de estos son muy amplias, entre las cuales, las más comunes son: tela de carbón, fieltro de grafito, brocha de grafito, barra de grafito y espuma de grafito ([Figura 2](#)).

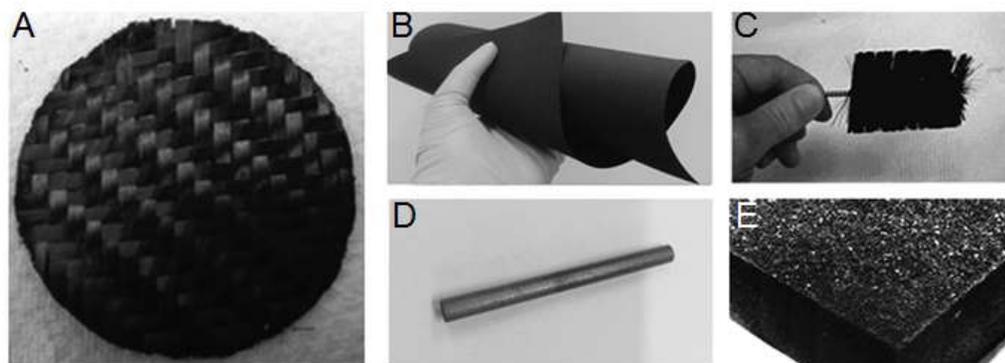


Figura 2. Materiales derivados de carbono usados en electrodos de CCM. A) Tela de carbón, B) fieltro de grafito, C) brocha de grafito, D) barra de grafito y E) Espuma de grafito. Modificado de [Song et al., 2012](#).

En años recientes, se han estudiado materiales como el grafeno y los nanotubos de carbono en sustitución de los antes mencionados materiales de grafito y carbón, los estudios indican que el uso de estos materiales en ánodos de CCM resulta altamente prometedor debido a sus características de biocompatibilidad hacia los microorganismos, lo que genera una alta producción de electricidad, sin embargo, el alto

costo es la principal limitante para que su uso sea regular (Li *et al.*, 2017). Otro enfoque en la fabricación de electrodos permite combinar características de los metales como el oro (deposición) o titanio (TiO_2) con el grafeno o nanotubos de carbono, por lo tanto, al combinar las características de cada uno de los materiales se suman las características de estabilidad y conductividad con las de biocompatibilidad, respectivamente (Zheng *et al.*, 2015).

Las configuraciones de CCM más utilizadas son una o dos cámaras con geometría cúbica o cilíndrica, y recientemente los sistemas apilados o stack (Logan *et al.*, 2006). Uno de los grupos preponderantes en investigación de CCM es el de Logan *et al.*, en su sitio web: <https://sites.psu.edu/microbialfuelcells/make-one/>, muestran los elementos necesarios para la construcción de una CCM de doble botella y CCM cúbicas de una o dos cámaras; algunos de los modelos más utilizados en diferentes laboratorios. El modelo de CCM cúbica consta de materiales de acrílico sujetos con tornillos de acero y empaque plásticos en las juntas para un cierre hermético (Figura 3B).

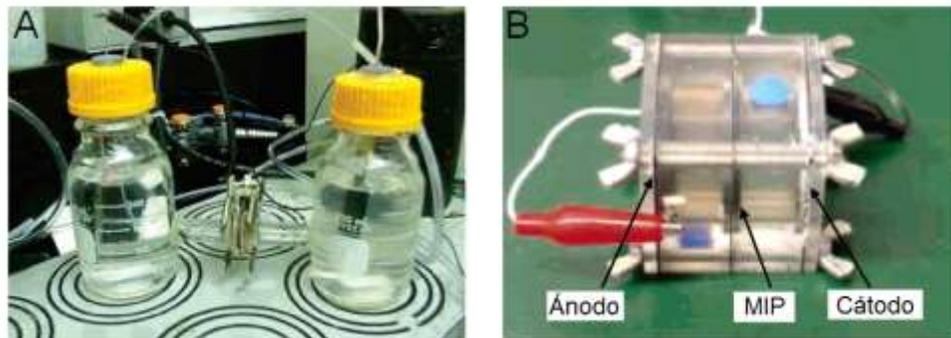


Figura 3. Arquitecturas de CCM de doble cámara. A) Geometría de CCM de doble botella. B) Geometría de CCM cubica. Modificado de Logan *et al.*, 2006.

Estas CCM utilizan ánodos de fieltro de grafito y cátodos de tela de carbón, el ánodo se encuentra en contacto directo con el sustrato o agua residual, pero el cátodo está expuesto por un lado hacia el exterior lo que permite el contacto con el oxígeno de manera directa. Estos cátodos, generalmente se recubren con politetrafluoroetileno (PTFE) para disminuir la infiltración de agua (Lou *et al.*, 2013). Por el lado de la cámara catódica se usa un catolito con soluciones de ferrocianuro o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ que mejora el potencial redox al funcionar como un aceptor de electrones (Logan *et al.*, 2006).

Otro elemento a considerar son las membranas de separación entre cámara anódica y catódica, también llamadas membranas de intercambio protónico (MIP). La función de estas membranas es permitir el paso de los protones generados por la biopelícula anódica para la posterior reducción del oxígeno. Las más usadas son las membranas comerciales Nafion117 (DuPont), que son hechas con PTFE y ácido perfluorosulfónico. La estructura de esta membrana forma canales, los cuales los iones hidronio (H^+) son capaces de atravesar. Sin embargo, su uso puede permitir el paso en pequeñas cantidades de ferrocianuro y sustrato entre cámaras, lo que genera un incremento en la resistencia interna, además éstas membranas se ensucian fácilmente, por lo que es necesario sustituirlas constantemente cuando la CCM se opera en modo continuo (Oh & Logan, 2006). Los elementos para la construcción de una CCM, su configuración y el modo de operación resultan elementos necesarios a considerar ya que de estos y del contexto del estudio depende su rendimiento. En la Figura 4 se muestran más configuraciones de CCM operadas tanto en modo por lotes (A, B, D, E y F), así como en modo continuo (C, G, H, I, J y K).

Otros factores importantes son los parámetros de operación como el pH, temperatura, TRH y los sustratos que se pretenden evaluar. El pH se encuentra asociado también a la conductividad del medio que influye en la producción de resistencias internas (Logan *et al.*, 2018), además, la población de las comunidades microbianas también se ve afectada ya que el pH del medio es muy particular para cada consorcio o incluso para cada especie (Franks *et al.*, 2009). La temperatura también afecta el rendimiento de una CCM, se ha observado que cuando se operan CCM a temperaturas cercanas a los 25°C la producción de energía incrementa, sin embargo la degradación de la materia orgánica no es tan buena (Jadhav & Ghangrekar, 2009).

El tiempo de residencia hidráulica también resulta un factor limitante cuando se opera en modo por lotes, ya que el sustrato puede llegar a agotarse y la producción de bioelectricidad y biomasa disminuyen drásticamente. Por lo tanto, para sistemas operados en modo continuo es necesario una optimización del TRH en función de la velocidad del consumo del sustrato, con la finalidad de optimizar el rendimiento de una CCM (Rahimnejad *et al.*, 2011).

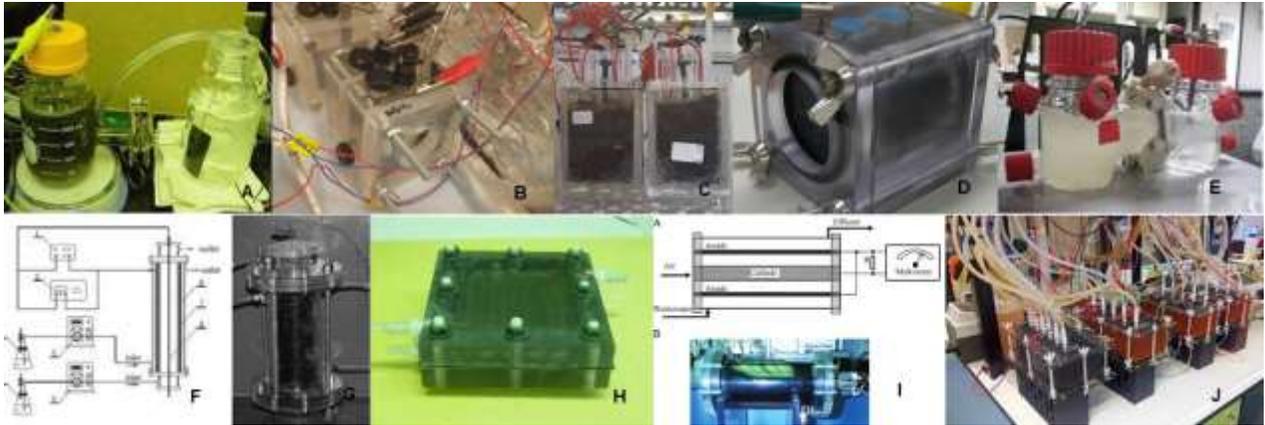


Figura 4. Configuraciones de CCM. A) Sistema sencillo unido por puente salino. B) Sistema de cuatro compartimentos. C) CCM tipo foto-heterotrófico. E) CCM de una cámara con cátodo aireado. F) Sistema tipo H de dos cámaras. G) CCM tipo tubular, H) CCM tipo tubular de flujo ascendente, I) Diseño de plato plano con flujo tipo serpentin. J) Sistema de una sola cámara con cátodo concéntrico. K) CCM acoplada de seis cámaras. Los sistemas A, B, D, E y F son operados por lotes; C, G, H, I, J y K en modo continuo.

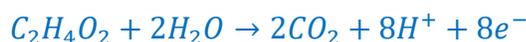
En un estudio, [Chae et al.](#) (2009) analizaron el efecto de los sustratos: glucosa, propionato, butirato y acetato sobre la D_p . Los autores encontraron que usando glucosa como sustrato se produjo una D_p de 156 mW/m^2 , que resulta mayor a las D_p producidas por acetato, propionato y butirato 64 , 58 y 51 mW/m^2 , respectivamente. En otro estudio, [Zhao et al.](#) (2017) determinaron el efecto del cambio de sustrato sobre la producción de voltaje y el cambio en la comunidad bacteriana, los autores encontraron que al cambiar el lactato (primer sustrato) por glucosa o propionato el voltaje se ve reducido. Sin embargo, cuando el lactato es reemplazado por acetato, el voltaje producido se mantiene en niveles similares. Además, encontraron que las comunidades microbianas que crecen sobre el ánodo cambiaron en cada fase del remplazo de sustrato, lo que parece indicar que el acetato favorece la mantención de bacterias electroactivas (BEA).

En otro estudio, [Wang et al.](#) (2017) analizaron el efecto del material del ánodo usando fieltro de carbono, malla de acero inoxidable, barra de grafito o espuma de níquel sobre la D_p y las abundancias de algunas bacterias en la comunidad microbiana de una CCM, además, los autores variaron la demanda química de oxígeno (DQO) en tres fases diferentes: 215 , 423 y 815 mg/L . Los autores encontraron que los ánodos de fieltro de carbono y espuma de níquel presentaron una D_p superior a la de los ánodos de barra grafito y malla de acero inoxidable (4.80 , 5.11 , 2.30 y 3.35 mW/m^2 , respectivamente). Además, observaron un incremento en el voltaje en todos los sistemas cuando se incrementó la DQO. Finalmente, la BA Proteobacteria *Dechloromonas sp* presentó una

mayor abundancia en el sistema de espuma de níquel, en comparación con el resto de los sistemas.

En la producción de electrones durante la degradación de materia orgánica en una CCM, se producen 8 electrones por mol de acetato consumido (ecuación 1). En términos de rendimientos teóricos, la capacidad de una CCM está determinada por la termodinámica de la reacción de oxidación del sustrato, es decir, la energía libre de Gibbs liberada al oxidar el sustrato (ecuación 2). Sin embargo, cuando se trata de sustratos complejos, resulta más práctico expresar su rendimiento en términos de fuerza electromotriz total de la celda (E_{Fem}) que se define como la diferencia de potencial entre ánodo y cátodo de la CCM en unidades de Volts (ecuación 3). Además, cuando relacionamos la E_{Fem} con la carga transferida (Q) en unidades de Coulombs, se obtiene el trabajo de la celda (W) en unidades de Joules (ecuación 4) (Logan *et al.*, 2006).

Ecuación 1



Ecuación 2

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(Rx)$$

ΔG = Energía libre de Gibbs (J)

ΔG° = Energía libre de Gibbs (J) en condiciones estándar (298 K, 1 Bar y 1M)

R= Constante general de los gases (8.314/mol K)

T= Temperatura (K)

Rx= Concentración de los reactantes y productos

Ecuación 3

$$E_{fem} = E^\circ_{fem} - \frac{RT}{nF} \ln(Rx)$$

E_{fem} = Fuerza electromotriz o diferencia de potencial entre electrodos (V)

E°_{fem} = Fuerza electromotriz (V) en condiciones estándar (298 K, 1 Bar y 1M)

R= Constante general de los gases (8.314/mol K)

T= Temperatura (K)

n= número de electrones liberados de la reacción

F= Constante de Faraday (9.6×10^4 C/mol)

Rx= Concentración de los reactantes y productos

Ecuación 4

$$W = E_{fem} * Q$$

W= Trabajo de la celda (J)

Q= nF = Carga transferida (C)

La eficiencia real de una CCM depende de diversos factores que causan un decremento en el voltaje producido. Las pérdidas óhmicas dependen de las resistencias internas producidas durante el flujo de electrones por los electrodos hacia el circuito externo, las pérdidas de activación se relacionan con la pérdida de electrones capturados por otros agentes que se encuentran en la superficie del electrodo o incluso en el medio acuoso, las pérdidas por metabolismo bacteriano dependen de la diferencia de potencial redox entre el sustrato y el ánodo. Finalmente, las pérdidas por concentración están en función de la concentración de las sustancias químicas oxidadas o reducidas contenidas en la biopelícula y el ánodo. Estas pérdidas limitan la producción dentro de las CCM, por lo tanto, el rendimiento real de una CCM está muy por debajo del rendimiento teórico (Logan *et al.*, 2006). Es necesaria una mejor comprensión de los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en la biopelícula para proponer métodos que permitan mejorar el rendimiento de una CCM.

En resumen, los materiales que conforman el ánodo conducen los electrones y facilitan la adhesión de la película, el sustrato funciona como combustible químico para la generación de los electrones y el desarrollo de los consorcios. Sin embargo, la biopelícula juega el papel preponderante en el proceso, por lo tanto, resulta interesante analizar la dinámica poblacional de nuevos consorcios y su capacidad metabólica con la finalidad de incrementar la producción de bioelectricidad en CCM operadas en modo continuo.

Fuentes de sustrato para celdas de combustible microbianas

Existe una amplia gama de productos cuya producción genera residuos acuosos. El mezcal es una de las denominadas bebidas “espirituosas” (bebidas alcohólicas fermentadas de gran tradición en México), producida a partir de diferentes especies de Agave: *A. alminia*, *A. angustifolia* y *A. potatorum*. Según el Consejo Regulador del Mezcal (CRM), los estados que poseen denominación de origen para la producción de mezcal son: Durango, Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. Para obtener la denominación de origen se deben cumplir ciertos lineamientos de acuerdo con los procesos de elaboración, recursos humanos y factores culturales. A finales del año 2018, la denominación de origen se extendió a los estados de México y Morelos, que actualmente se encuentran siendo

revisados para su confirmación por el CRM, así mismo, existen solicitudes por parte de algunos municipios de los estados de Guanajuato, Querétaro y Sinaloa (CRM, 2018).

El proceso de elaboración artesanal del mezcal comienza con la cosecha del agave maduro, este puede ser cultivado o silvestre, las pencas son cortadas y rasuradas para luego ser transportadas a los hornos de cocimiento en forma de pozo. El cocimiento del agave tiene como finalidad la liberación de azúcares fermentables como sacarosa, glucosa y fructuosa, a partir de los polisacáridos denominados fructanos que se sintetizan a partir de unidades de sacarosa y contienen residuos de β -fructofuranosil (Mancilla-Margalli y López, 2006). El agave cocido (frío) se tritura en un molino de piedra para liberar los jugos que contienen los azúcares fermentables e hidrosolubles, para luego continuar con la fermentación en tanques de piedra, en este paso se añade agua, y posteriormente, el mezcal se destila en alambiques artesanales. Finalmente, el mezcal es colectado para su envasado o llevado a los procesos de maduración, reposo o añejamiento. En 2014, se produjeron unos 240 millones de litros de mezcal (CRM, 2018).

El agua usada para el proceso de elaboración del mezcal ronda entre los 8 a 15 L por L de mezcal, lo que significa que al final se produce una gran cantidad de agua residual, este residuo se denomina vinaza del mezcal. La vinaza del mezcal presenta un color oscuro por el contenido de compuestos fenólicos, posee un pH ácido (3-4), una DQO de entre 50-150 g/L y un alto contenido de sólidos totales de entre 26-95 g/L. La vinaza mezcalera contiene ácido acético y láctico, glicerol, fenoles y polifenoles, melanoidinas y sales de fosfato y sulfato, dependiendo del proceso y de las especies de agave que se utilizan (Robles-González *et al.*, 2012).

El uso de las vinazas del mezcal no está regulado por tratarse de un proceso artesanal y estar ligado a las comunidades rurales, comúnmente se implementa como fertilizante en campos de cultivo para el mejoramiento del suelo, sin embargo, esto puede provocar efectos negativos al medio ambiente como la producción de gases de efecto invernadero (CH_4 , CO_2 y NO_2), cambios en la composición microbiana del suelo y contaminación del suelo y agua por sales (Zn^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ y Fe^{2+}) y compuestos fenólicos (Moran-

[Salazar et al., 2016](#)). Por tales motivos, la vinaza del mezcal representa una fuente ideal de sustrato para alimentar celdas de combustible microbianas.

Varios estudios muestran la factibilidad del uso de vinazas para la producción de biogás o bioelectricidad, ya sea por métodos biológicos o por procesos de oxidación avanzada. [Arreola-Vargas et al. \(2016\)](#) Evaluaron la remoción de materia orgánica de vinazas crudas de tequila en un reactor anaerobio secuencial operado por lotes, los autores encontraron que diferentes combinaciones de pH y temperatura no afectan la eficiencia de la remoción de DQO, ya que todas las combinaciones produjeron una remoción alrededor del 85%, por otro lado, la mayor producción de metano se produjo bajo condiciones de pH 7 y temperatura de 38°C, con un valor de 0.29 L de metano /g de DQO removida. De manera similar, [Cruz-Salomón et al. \(2017\)](#) evaluaron la remoción de DQO de vinazas de “comiteco”, una bebida alcohólica obtenida de la especie *Agave americana L.*, originaria del estado de Chiapas, México. Ésta vinaza poseía valor de DQO de 120 g/L, la remoción de DQO fue evaluada en un reactor anaerobio de flujo ascendente de 4L como volumen de trabajo, con un TRH de 10 días y operado a una temperatura de 37°C, la remoción de DQO fue del 91% y se produjeron 0.265 L de metano a razón por gramo de DQO. En otro estudio, [Zhang et al. \(2009\)](#) analizaron la remoción de DQO en un sistema de reactor anaerobio de flujo ascendente- celda de combustible microbiana- filtro de aeración biológico para la producción de bioelectricidad, la máxima D_p producida con esta configuración fue de 1.4 W/m² con una eficiencia de remoción de DQO del 53%. En un estudio reciente, [Ottoni et al. \(2019\)](#) muestran la factibilidad para la utilización de vinazas para la producción de electricidad logrando obtener una D_p de 800 mW/m² y una remoción de DQO del 50-60%. Estos estudios indican que las vinazas pueden ser utilizadas en sistemas electroquímicos para producir bioelectricidad o biocombustibles, en el caso del metano. Sin embargo, cada uno de los casos debe ser estudiado ya que la producción de metano (metano génesis) y valores altos de DQO produce una disminución de comunidades microbianas electrogénicas ([Jadhav et al, 2019](#); [Lopez-Velarde et al., 2017](#)). Los estudios de dilución de sustratos se tratan más adelante.

Otra fuente de sustrato interesante para alimentar CCM son las melazas de caña de azúcar que contienen azúcares no cristalizadas durante el proceso, principalmente

sacarosa. Las melazas pueden ser usadas para la elaboración de etanol ([Sheoran et al., 1998](#); [Cazzeta et al., 2007](#)), esto genera otro residuo conocido como vinaza y que es más parecida a la vinaza mezcalera mencionada anteriormente. Sin embargo, en varios ingenios (plantas de fabricación de azúcar de caña) del país se carece de la producción de etanol a partir de las melazas de caña de azúcar, por lo que resulta en la generación de residuos en forma de melazas que normalmente se usa como materia de composta para los cultivos. Estos residuos han sido utilizados para la elaboración de medios de cultivo y la generación de productos de alto valor agregado por medio de microorganismos ([Toğrul & Arslan, 2004](#); [Portilla et al., 2017](#)).

La composición de las melazas se caracteriza por tener un alto contenido de melanoidinas, estos compuestos poseen una coloración oscura ya que se sintetizan por consecuencia de las reacciones de Maillard y son el producto de la unión entre azúcares y aminoácidos ([Singh et al., 2021](#)). Las melazas se caracterizan por tener un pH ácido (3-5) y un alto contenido de sólidos volátiles ([Chandra et al., 2008](#)) mientras que las melazas resultan un problema al medio ambiente cuando son vertidas en los cuerpos de agua cercanos, sin embargo, también son vistas como un área de oportunidad para su utilización en sistemas bioelectroquímicos ([Sevda et al., 2013](#)).

Se han reportado también varios estudios para el tratamiento melazas de caña de azúcar. [Ma et al.](#) (2017) utilizaron la microalga mutante *Scenedesmus sp.* Z-4 para la generación de lípidos en la producción de biodiesel y simultáneamente tratar melazas, las melazas fueron alimentadas como sustrato para el crecimiento de las microalgas. Los autores lograron una remoción aproximada del 90% para DQO, fósforo y nitrógeno totales, cuando alimentaron una melaza con una DQO de 8 g/L. La producción de lípidos fue de 94 mg/Ld. Por otro lado, en un sistema electroquímico, [Sevda et al.](#) (2013) evaluaron la producción de electricidad en modo continuo de una CCM de una cámara con cátodo aireado, los autores utilizaron como sustrato melazas crudas, diluidas y centrifugadas, y encontraron que la D_p máxima producida se observó en el sistema alimentado con melazas crudas que contenían una DQO de 10 g/L y fue de 382.5 mW/m².

De manera similar, [Kubota et al. \(2016\)](#), evaluaron la producción de Dp de dos CCM de una cámara conectadas en paralelo y en serie, logrando producir Dp de 340 y 400 mW/m², respectivamente. Además, los autores observaron que se presentó una mayor Dp cuando se utilizaron melazas con un mayor contenido de DQO y logrando su disminución en un 80%. Cabe resaltar que el rango de DQO que los autores utilizaron fue de 250-1500 mg/L, valores que se consideran bajos a comparación de los obtenidos en melazas crudas. Por otro lado, [Lee et al. \(2016\)](#) evaluaron la producción de electricidad de tres arquitecturas de CCM usando melazas con una DQO de 10 g/L, los modelos fueron dos CCM de una cámara, con o sin membrana, y de doble cámara. Los modelos de CCM de una cámara presentaron una mejor remoción de materia orgánica que el modelo de CCM de doble cámara, 90 vs 50%, respectivamente. Sin embargo, el modelo de doble cámara produjo una mayor intensidad de corriente pero la Dp fue de 80 mA/m² y 17 mW/m², respectivamente.

Con la evidencia anterior se fundamenta el uso de las vinazas y melazas para su tratamiento en dispositivos bioelectroquímicos, como las CCM para la producción de bioelectricidad. Sin embargo, la carga de materia orgánica en términos de DQO resulta un factor importante a considerar ya que altos niveles de esta podrían repercutir negativamente en la producción de bioelectricidad; debido a la presencia de compuestos tóxicos o recalcitrantes y un alto contenido de sólidos. Por lo tanto, en la [Tabla 2](#) se enlistan algunos trabajos de investigación de CCM para la producción de bioelectricidad, valores de DQO y el porcentaje de su remoción usando melazas y diferentes tipos de vinazas.

Tabla 2. Producción de electricidad a partir del tratamiento de vinazas y melazas con CCM

CCM	Sustrato	Dp (W/m ²)	DQO (g/L)	EC (%)	ER (%)	Referencia
Una cámara	Melaza	1.4	127.5	NR	53.2	Zhang et al., 2009
Una cámara	Melaza	0.124	NR	NR	72.8	Mohanakrishna et al., 2010
Dos cámaras	Melaza ^D	0.065	7.16	NR	81.2	Zhang et al., 2013
Una cámara	Melaza	0.382	9.96	NR	59	Sevda et al., 2013
Dos cámaras	Vinazas	80 W/m ³	10.6	NR	92	Santos et al., 2017
Dos cámaras	Vinazas ^P	93	37.89	NR	81.5	Sakdaronnarong et al., 2013
Dos cámaras	Vinaza	0.8	24.0	NR	50-60	Ottoni et al., 2019
NR	Melaza	1.57 W/L	1.5	NR	95	Bhatti et al., 2022
Dos cámaras	Melaza	3.28 W/m ³	9.06	NR	88	Yang et al., 2022

D, diluida; NR, no reportada; P, escala piloto; Dp, densidad de potencia; EC, eficiencia coulombica; ER, eficiencia de remoción.

Potencial del inóculo para su uso en CCM

En estudios recientes se ha evaluado el papel del inóculo sobre la eficiencia de las CCM. El uso de organismos como bacterias, arqueas, levaduras y algas son los más comunes en estos dispositivos bioelectroquímicos (Ma *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2017b; Smith *et al.*, 2014). Principalmente, estos estudios se centran en comparar los inóculos puros con inóculos mixtos (Cao *et al.*, 2019). Mientras que los inóculos puros como el de *Geobacter sulfurreducens* resulta más eficiente para la producción de electrones con sustratos específicos como el acetato, debido a su arsenal enzimático especializado (Smith *et al.*, 2014), los inóculos mixtos resultan favorables para las adaptaciones al medio ambiente y para degradar sustratos más complejos como aguas residuales que poseen una alta carga de materia orgánica (Logan *et al.*, 2006). Los microorganismos electrógenos encontrados comúnmente en CCM pertenecen a los *Phylum* de *Proteobacteria* y *Firmicutes*, como por ejemplo *Shewanella oneidensis* y *Clostridium beijerinckii*, respectivamente (Lapinsonnière *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, existen estudios donde otro tipos microorganismos son capaces de producir bioelectricidad, tal es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cianobacteria *Nostoc sp. ATCC 27893* y el alga *Chlorella pyrenoidosa* (Raghavulu *et al.*, 2011; Sekar *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015), tal como se muestra en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Cultivos puros usados para la producción de bioelectricidad en CCM

Microorganismo	Densidad de potencia	Referencia
<i>S. marcescens</i>	341.65 mW/m ²	Thulasinathan <i>et al.</i> , 2021
<i>K. pneumoniae</i>	257.45 mW/m ²	Thulasinathan <i>et al.</i> , 2021
<i>S. oneidensis</i>	144 mW/m ³	Baniasadi & Vahabzadeh 2021
<i>E. coli</i>	139 mW/m ²	Aiyer, 2021
<i>P. aeruginosa</i>	158 mW/m ²	Aiyer, 2021
<i>G. Sulfurreducens</i>	376 mW/m ²	Amirdehi <i>et al.</i> , 2021
<i>B. borstelensis</i>	188.5 mW/m ²	Hassan <i>et al.</i> , 2019
<i>K. georgiana</i>	172 mW/m ²	Thapa <i>et al.</i> , 2019
<i>T. harzianum</i>	0.13 mW/m ²	Shabani <i>et al.</i> , 2021
<i>S. algae</i>	50 mW/m ²	Choudhury <i>et al.</i> , 2021
<i>B. circulans</i>	1.72 mW/m ²	Gurav <i>et al.</i> , 2019
<i>Cellulomonas sp.</i>	9.55 mW/m ²	Cao <i>et al.</i> , 2020
<i>R. palustris</i>	0.63 mW/m ²	Sogani <i>et al.</i> , 2021

El uso de inóculos puros resulta útil cuando se busca identificar los mecanismos de intercambio de electrones, sin embargo, las condiciones de operación y los sustratos pueden ser específicos para cada especie. Por otro lado, los inóculos mixtos pueden mejorar la eficiencia de una CCM incrementando la degradación de materia orgánica.

Recientemente, se ha optado por utilizar co-cultivos para combinar la capacidad de degradación de materia orgánica con la capacidad de producción de electrones y así mejorar la eficiencia de las CCM. En la [Tabla 4](#), se muestran trabajos donde se utilizaron cocultivos en la producción de bioelectricidad en CCM así como la Dp generada.

Tabla 4 Uso de co-cultivos para la producción de electricidad en CCM

Especie 1	Especie 2	Densidad de potencia	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. variicola</i>	14.8 W/m ³	Islam et al .,2020
<i>K. variicola</i>	<i>B. cereus</i>	11.8 W/m ³	Islam et al .,2020
<i>S. marcescens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	398.6 mW/m ²	Thulasinathan et al., 2021
<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	190 mW/m ²	Aiyer, 2021
<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	287 mW/m ²	Ren et al., 2021
<i>T. harzianum</i>	<i>P. fluorescens</i>	1.7 mW/m ²	Shabani et al., 2021
<i>C. sakazakii</i>	<i>P. otitidis</i>	280 mW/m ²	Thulasinathan et al., 2019
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. oneidensis</i>	20 mW/m ²	Li et al., 2018

Además de los co-cultivos, se han usado comunidades mixtas de microorganismos de fuentes de aguas residuales o lodos activados para la producción de bioelectricidad obteniendo Dp considerables. [Huang et al.](#) (2011) diseñaron un sistema híbrido con un reactor de lecho fluidizado-celda de combustible microbiana para la degradación de agua residual de destilería y la producción simultánea de electricidad, el inóculo se desarrolló a partir de la composición microbiana de la misma agua residual, los autores lograron obtener una Dp máxima de 124 mW/m² y una remoción de DQO de entre 80-90%.

En otro estudio, [Patil et al.](#) (2009) utilizaron lodos activados como fuente de microorganismos para tratar agua residual de la industria chocolatera en CCM, los autores lograron obtener una Dp de 1.5 W/m² y una remoción de DQO del 75%. Por otro lado, [Zhang et al.](#) (2009) inocularon lodo granular anaerobio para tratar melazas en un sistema de reactor de flujo ascendente- celda de combustible microbiana- filtro biológico de aireación (descrito anteriormente), logrando producir una Dp máxima de 1.4 W/m² y una remoción de DQO del 53%. Interesantemente, [Cheng et al.](#) (2011) adaptaron un consorcio microbiano proveniente de agua residual doméstica y desarrollado en una celda de electrólisis microbiana, posteriormente, la biopelícula fue usada como inóculo para CCM de una y dos cámaras alimentadas con una solución de celulosa. Los autores lograron obtener Dp máxima de 1.07 y 0.88 W/m², respectivamente, y remociones de DQO de 50 al 70%.

Recientemente, se estudia la ecología microbiana de sitios inhóspitos con distintos objetivos entre los que se encuentran, caracterizar la diversidad microbiana, encontrar nuevos microorganismos con capacidades metabólicas desconocidas e identificar su respuesta ante factores medioambientales adversos como la contaminación por hidrocarburos o metales pesados. [Zhao et al. \(2019\)](#) caracterizaron, a nivel taxonómico de filo, las comunidades microbianas de suelo contaminado con metales pesados por minería. Los filos Proteobacteria y Firmicutes correlacionaron positivamente con el alto contenido de Cu, Zn y Pb, pero se asociaron negativamente con la materia orgánica del suelo, potasio disponible y contenido de humedad, además, se observó que la abundancia de estos filos incrementa junto con la profundidad de la toma de muestra, posiblemente asociado con la disminución de oxígeno disponible.

De manera similar, algunos estudios genómicos y metagenómicos se realizan con la finalidad de esclarecer el comportamiento de consorcios microbianos mixtos en sistemas bioelectroquímicos como las CCM y el efecto de los factores como el tipo de sustrato, materiales del electrodo y pH, que influyen sobre el desarrollo de consorcios electrogénicos ([Segata et al., 2012](#); [Ishii et al., 2013](#)). Los estudios de diversidad microbiana muestran la factibilidad del uso de inóculos mixtos adaptados para condiciones y sustratos específicos (aguas residuales) con la finalidad de lograr que los sistemas bioelectroquímicos sean más eficientes, además, una configuración óptima es necesaria para ampliar su uso y hacer más costeable este tipo de tecnología. En los siguientes apartados se describen de manera breve las herramientas de las tecnologías de secuenciación masiva para estudios de ecología microbiana y análisis inferenciales de capacidad metabólica.

Mecanismos de transporte de electrones

Actualmente, se han identificado diferentes mecanismos para el de intercambio de electrones, éstos involucran la expresión de diversos genes del tipo citocromo C. Los MIE reportados involucran un mecanismo directo a través de complejos proteicos situados sobre la superficie de la membrana celular, y a través de nano cables que llagan a medir hasta 20 μm de longitud. Para los mecanismos indirectos, sustancias como las flavinas funcionan como mediadores que son capaces de capturar de electrones y posteriormente liberarlos al exterior, además, existen mecanismos

indirectos donde electro-catalizadores localizados en el ánodo oxidan moléculas orgánicas liberadas por alguna especie bacteriana (Saratale *et al.* 2017).

Con base en el estudio de *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, se han descrito distintos mecanismos de intercambio de electrones, *Geobacter sulfurreducens* es capaz de exportar electrones fuera de las membranas por medio de una serie de enzimas reductoras y transportadoras. El proceso inicia a partir de una reserva de electrones contenidos en las moléculas di nucleótido de nicotinamida y adenina en su estado reducido (NADH). La enzima reductasa de NADH lo oxida (NAD⁺) para ganar electrones, luego las proteínas transportadoras reservorio de quinonas trasladan los electrones a través de la membrana interna hasta entrar en contacto con la proteína periplásmica tipo citocromo A PpcA-E, los electrones son transferidos y transportados hacia la membrana externa por MacA, otra proteína transportadora. Después el complejo OmaB/C, OmbB/C y OmcB/C exportan los electrones hacia el exterior de la membrana donde son recibidos por las proteínas tipo citocromo C: OmcE, en la superficie de membrana; y OmcS, en los pili (elongaciones de la membrana ricas en proteínas citocromo c). Finalmente los electrones son transferidos hacia el ánodo de una CCM por estas proteínas (figura 5).

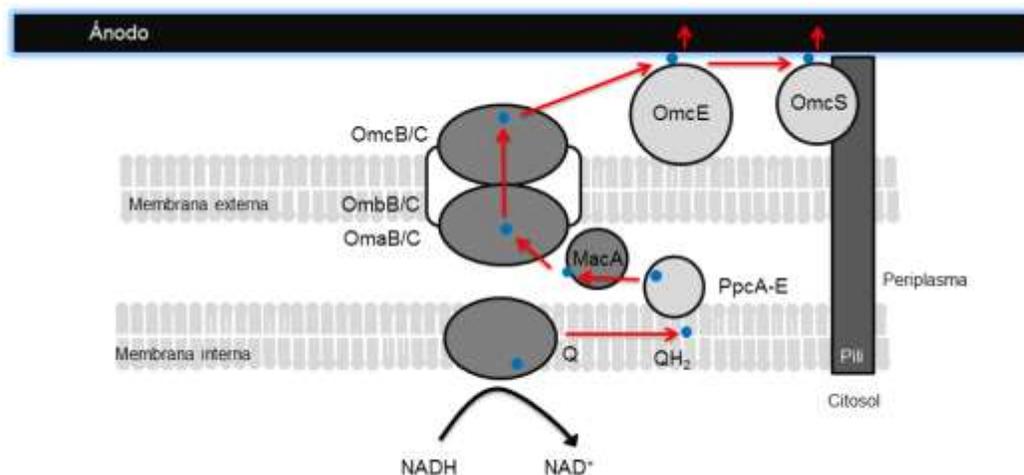


Figura 5. Mecanismos de intercambio de electrones de *Geobacter sulfurreducens*. Una serie de proteínas óxidorreductoras/transportadoras son encargadas de exportar los electrones fuera de la membrana plasmática y las proteínas tipo citocromo c transfieren los electrones al ánodo de una CCM.

Los mecanismos de intercambio de electrones de *Shewanella oneidensis*, a diferencia de *G. sulfurreducens*, involucran a la proteína tipo citocromo c Cym A, que recibe los electrones desde el reservorio de quinonas y los direcciona al complejo Mtr A, B y C donde son expulsados hacia el exterior de la membrana externa hasta las proteínas tipo citocromo c OmcA. Una vez ahí, los electrones pueden transferirse directamente al ánodo o por medio de mediadores endógenos como las flavinas (Figura 6).

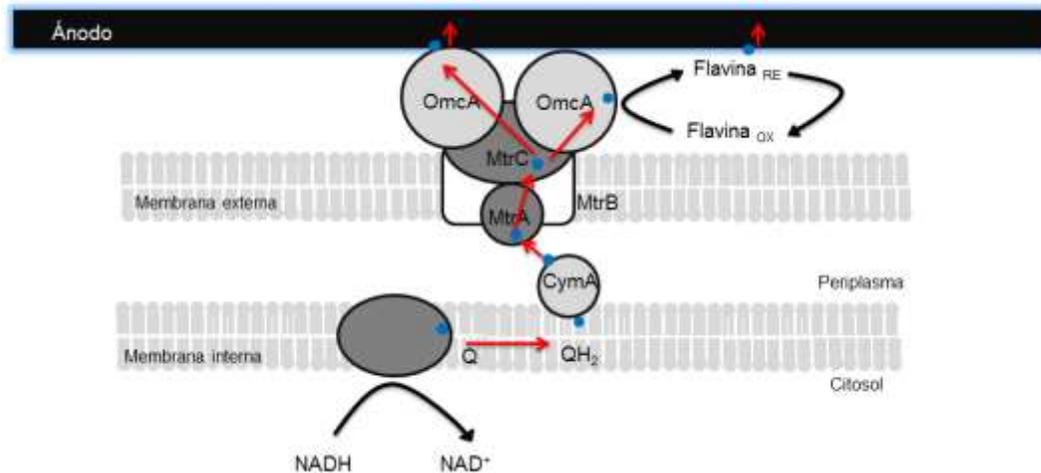


Figura 6. Mecanismos de intercambio de electrones de *Shewanella oneidensis*. Una serie de proteínas óxido-reductasas/transportadoras son encargadas de exportar los electrones fuera de la membrana plasmática y las proteínas tipo citocromo c transfieren los electrones al ánodo de una CCM. Además, es *S. oneidensis* es capaz de producir mediadores o usar mediadores externos para transferir electrones de modo indirecto.

En resumen, se han descrito 4 mecanismos distintos para el intercambio de electrones donde la maquinaria enzimática puede variar dependiendo la especie de la bacteria electroactiva (BE). Estos mecanismos se clasifican como modo directo e indirecto, los mecanismos directos involucran el intercambio de electrones directamente hacia un electrodo a través de proteínas tipo citocromo C localizadas en la superficie de la membrana plasmática o en los pilis y los mecanismos indirectos funcionan con mediadores endógenos o exógenos.

Los mediadores endógenos más conocidos son las flavinas producidas por el género *Shewanella*. Recientemente, se han encontrado que *G. sulfurreducens* es capaz de liberar citocromos hacia la matriz extracelular por lo que genera que los electrones puedan ser transferidos por medio de estas proteínas hasta un aceptor final (Smith *et al.*, 2014).

Las BEA generalmente son bacterias Gram negativas ya que una pared celular dificulta el intercambio de electrones. Sin embargo, la bacteria Gram positiva *Listeria monocytogenes* puede usar medidores externos como aceptores de electrones (Light *et al.*, 2018). Recientemente, se encontró que la bacteria *Ardenticatena maritima* es capaz de producir electricidad en CCM, además, los autores encontraron genes putativos para Cyt C que podrían ser responsables del intercambio de electrones. Sin embargo, el mecanismo aún no ha sido elucidado (Kawaichi *et al.*, 2018). Por lo tanto, resulta necesario investigar los mecanismos de nuevas especies para mejorar el rendimiento de las CCM.

Secuenciación Masiva y el gen rRNA 16S

La secuenciación de nucleótidos se popularizó con el método de Sanger a finales de los 70s. (Sanger *et al.*, 1977). Posteriormente, el método de Sanger se modificó para conformar un proceso automatizado mediante el uso de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (Millus *et al.*, 1986) y nucleótidos marcados con distintos fluoróforos que emitían una señal a ser detectada por el equipo (Smith *et al.*, 1986). Con esta técnica comenzaron los análisis de secuencias del gen rRNA 16S para la clasificación de procariontes a finales de los 80s (Paster y Dewhirst, 1988). La secuenciación masiva surgió como una tecnología para procesar cantidades de información mayores a la secuenciación de sanger, generando millones de lecturas de varias centenas de nucleótidos (Ronaghi *et al.*, 1996; Adams & Kron, 1997). Diferentes tecnologías desarrollaron métodos de secuenciación masiva de nucleótidos entre las cuales se encuentran la plataforma Titanium Gs FLX (Eriksson *et al.*, 2004), la plataforma 454 (Rothberg & Leamon, 2008) basadas en la tecnología de pirosecuenciación (se basa en la detección de un grupo pirofosfato en la incorporación de cada nucleótido sintetizado) e Illumina (Quail *et al.*, 2008) basada en la tecnología de marcador de terminación reversible, estas plataformas son de segunda generación (posterior a la secuenciación de Sanger).

La compañía Illumina desarrolló una tecnología de secuenciación que se basa en el método de Sanger, ya que utiliza una secuenciación por síntesis. Sin embargo, su principio de síntesis posee características nuevas, como la terminación de cadena reversible y el uso de una plataforma sólida que contiene oligonucleótidos

complementarios para fijar el DNA molde y agilizar la síntesis de las nuevas cadenas, ya que se sintetizan en ambos sentidos (Quail *et al.*, 2008). Estas características mejoran la tasa de error y disminuyen el costo, siendo Illumina una de las tecnologías más costeables hoy en día. Sin embargo, el tiempo de corrida y el tamaño de la lectura de 300 pb (*par de bases*, se refiere a dos bases nitrogenadas complementarias en el DNA o RNA), son superadas por otras tecnologías de tercera generación como PacBio o Nanopore, que usualmente se utilizan para estudios metagenómicos (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015).

La obtención de secuencias de nucleótidos permite caracterizar a los microorganismos de acuerdo a la composición y orden de las bases, es decir; contienen un código característico que revela su identidad. Diversas regiones han sido utilizadas como marcadores para asignar la taxonomía de las bacterias pero el gen rRNA 16S ha sido la región más utilizada debido a su tamaño, aproximadamente 1.5 kpb en *E. coli*. El uso de este marcador empezó en la década de los 80's (Lane *et al.*, 1985).

Por su compatibilidad con las capacidades de las tecnologías de secuenciación como Illumina-MiSeq, este gen posee regiones conservadas a los extremos de nueve regiones variables (*E. coli*), las regiones variables tienen un tamaño desde 30 hasta 125 pares de bases (pb) –un par de bases corresponde a un par de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces de hidrógeno que forman los bloques del DNA y miden alrededor de 3.4 Å-, sin embargo, la mayoría ronda entre 60 pb (Figura 7). Cada una de las regiones variables contiene un grado de conservación que sumados al tamaño de la lectura resulta una identificación más o menos rigurosa. El uso de dos regiones variables presenta mejores capacidades de identificación comparadas con tan solo una región, además, algunas regiones variables se encuentran más conservadas que otras. Por ejemplo, V1-V2 y V3-V4 muestran tamaños compatibles (alrededor de 250 y 300 pb, respectivamente) con la capacidad de secuenciación de la plataforma MiSeq de Illumina (300 pb), una de las plataformas menos costosas en la actualidad (Yarza *et al.*, 2014).

El gen 16S rRNA presenta algunos inconvenientes, se trata de un gen multicopia que puede generar un sesgo en la estimación de abundancias, además, la resolución se limita a nivel de género dependiendo del tipo de análisis (en el mejor de los casos), ya

que a un nivel taxonómico de especie, las secuencias comparten un alto porcentaje de similitud. Por lo tanto, la elección de primers, regiones variables y análisis bioinformático son puntos importantes a considerar (Klindworth et al., 2012). El gen 16S rRNA por si solo es un buen marcador taxonómico para un análisis preliminar de comunidades microbianas, sin embargo, el uso de marcadores adicionales mejora la profundidad y la resolución, así como un análisis bioinformático adecuado (Shah et al., 2021).

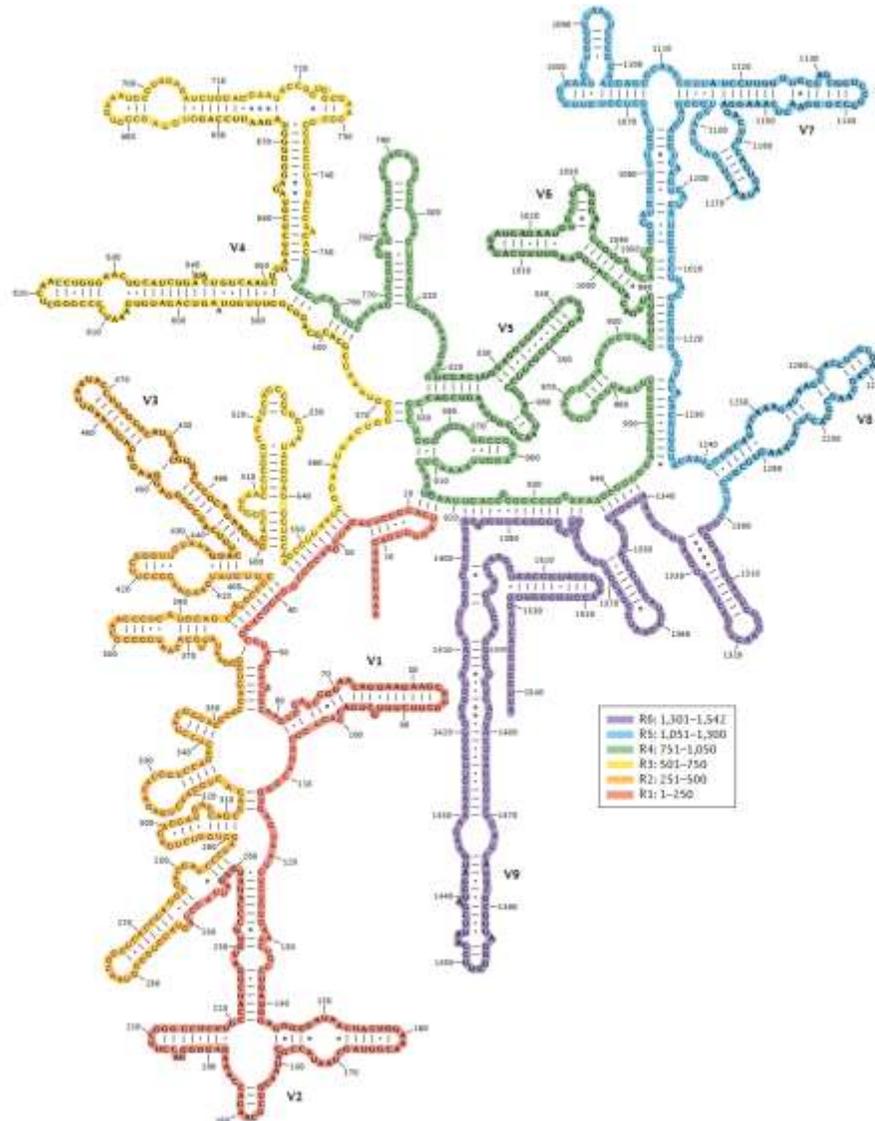


Figura 7. Regiones variables del gen ribosomal 16S. Estructura secundaria del gen ribosomal 16S de *Escherichia coli*, se muestran las nueve regiones variables (V1-V9) marcadas con negritas. Los colores representan las regiones de estudio de los autores. Modificado de [Yarza et al., 2014](#).

Softwares para el análisis de secuencias del gen rRNA 16S y bases de datos

En la actualidad, existen varios softwares para analizar los datos generados por las plataformas de secuenciación. Por ejemplo, QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) permite hacer comparaciones de diferentes muestras a través de un análisis taxonómico, filogenético y de diversidad. QIIME también permite hacer un análisis de calidad de las secuencias crudas obtenidas por la plataforma de secuenciación (ya que todas presentan tasas de error) y obtener las unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés, *Operational Taxonomic Unit*). Los OTUs son secuencias agrupadas que comparten al menos un 97% de similitud, en este caso en particular pertenecientes a los amplicones del gen rRNA 16S (Nguyen et al., 2016). Para estudios de modelado, QIIME también permite hacer análisis de diversidad microbiana *in silico* cuando se conjunta con alguna base de datos como por ejemplo Greengenes, NCBI, RPD o SILVA (Kuczynski et al. 2012).

En años más recientes, se comenzó a utilizar un algoritmo para la asignación taxonómica para secuencias con una disimilitud a nivel de un solo nucleótido, estas son las variantes de secuencias de amplicones (ASV, por sus siglas en inglés: *Amplicon sequences variants*), éste algoritmo forma parte de la tubería del software DADA2 (https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial_1_8.html) con el cual se pueden disminuir los errores del análisis en el procesamiento de las secuencias a comparación de los OTU (Callahan et al ., 2016). Esto supone mejoras en el análisis de resultados en comparación a la obtención de unidades taxonómicas operacionales, ya que los OTU tienen una resolución del 97%, es decir, son un grupo de secuencias obtenidas que poseen un 97 por ciento de identidad como mínimo.

Las bases de datos albergan una gran cantidad de secuencias completas y parciales del gen rRNA 16S. El proyecto de base de datos ribosomal (RDP, por sus siglas en inglés, *Ribosomal Database Project*) en 2013 liberó 2.8 millones de secuencias anotadas de la subunidad ribosomal pequeña pertenecientes a bacterias y arqueas (Cole et al., 2014). La ventaja de RDP es que más del 85 % de las secuencias presentes fueron aisladas de muestras ambientales y no a partir de cultivos (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Además de RDP, existen otras bases de datos como SILVA (<https://www.arb-silva.de/>), Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com/>) y la base de datos de NCBI denominada GenBank® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Recientemente, Balvočiūtė y Huson (2017) realizaron una comparación entre las bases de datos SILVA, RDP, Greengenes y GenBank. Lo autores encontraron una gran similitud en sus resultados, sin embargo, la diferencia en el tamaño y la resolución de cada una de las bases de datos complicó la comparación a distintos niveles de exactitud. NCBI acoplado a la herramienta OTT (*Open tree of life*, por sus siglas en inglés; es una herramienta para el análisis filogenético, <https://tree.opentreeoflife.org/>) permitió obtener rangos a nivel de especie e incluso subespecie. Por otra parte, RPD y SILVA limitaron sus resultados a un rango de género. En la **Tabla 5** se muestran las coincidencias de las unidades taxonómicas encontradas en el estudio a nivel de género para las bases de datos GenBank, RDP, SILVA y Greengenes.

Tabla 5 Unidades taxonómicas coincidentes en bases de datos para asignar taxonomía

Base de datos	NCBI	RDP	SILVA	GG
NCBI	78773	4001	7827	117
RDP	4001	4156	3137	955
SILVA	7827	3137	8284	1039
GG	117	955	1039	1196

Los datos fueron obtenidos de un diagrama de Venn publicado por los autores (Balvočiūtė y Huson, 2017).

Por otro lado, en la **Tabla 6** se muestra una lista actualizada de las secuencias depositadas en las principales bases de datos. En la base de datos RDP se clasifican en secuencias correspondientes al gen 16S rRNA para bacterias y archaeas, y al gen 28S rRNA para Fungi. La base de datos de GenBank es la más actualizada y con el mayor número de las secuencias disponibles. La base de datos Greengenes es la más desactualizada, alberga secuencias solo de organismos procariotes y con menor número de secuencias. La base de datos SILVA se actualizó recientemente y cuenta con secuencias de bacterias, archaeas y eucariotas.

Tabla 6 Secuencias depositadas en las principales bases de datos

Base de datos y versión	Secuencias disponibles			Fecha de actualización
	Bacteria	Archeae	Eukaryota	
RDP v11.5	3,356,809	16S rRNA	125,525 28S rRNA (Fungi)	Septiembre 2016
GenBank			237,520,318	Abril 2022
Greengenes 13.5	1,004,892	16S rRNA	No disponible	Mayo 2013
SILVA v138	1,983,534	69,198	172,540	Diciembre 2019

Con el reciente incremento de estudios metagenómicos, las bases de datos comienzan a disponer de secuencias de diferentes genes marcadores de copia única (Sagata *et al.*, 2012). Sin embargo, la cantidad y calidad de las secuencias aún parece insuficiente para obtener información precisa de muestras ambientales, situación que se espera cambie pronto. Por otro lado, las secuencias del gen rRNA 16S representan un amplio repertorio útil para la identificación bacterias y el cálculo de abundancias relativas presentes en un muestra medioambiental. Además, existen otras herramientas que a partir de la información obtenida por el gen rRNA 16S, donde es posible inferir algunas características funcionales de los microorganismos de interés.

El Software PICRUSt (*Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states*) es un algoritmo y software bioinformático capaz de realizar predicciones para identificar posibles capacidades metabólicas de comunidades microbianas. A través de un gen marcador como 16S rRNA, PICRUSt compara el potencial de una comunidad microbiana realizando una búsqueda de secuencias metagenómicas ya existentes en bases de datos, la exactitud del método es de hasta 85% para muestras humanas y un poco menor en muestras medioambientales como suelos. Además, PICRUSt genera una normalización por gen rRNA 16S multicopia para el análisis de diversidad, lo que limita a algunos otros software existentes (<http://picrust.github.io/picrust/>). Esta herramienta resulta muy útil sobre todo en un contexto de costo-beneficio, ya que un análisis metagenómico continua siendo costoso para muchos laboratorios (Langille *et al.*, 2013). Una alternativa para este tipo de análisis de inferencia metabólica es la tercera versión de Parallel-META 3, una herramienta comparable con PICRUSt, además, que resulta más eficiente en cuanto a la utilización de recursos de computo, según los autores (Jing *et al.*, 2017).

Alcances de la inferencia metabólica a partir de la anotación taxonómica con el gen rRNA 16S

En muestras de microbiomas dónde la información metagenómica en las bases de datos es escasa, PICRUSt tiene algunas limitaciones infiriendo el potencial funcional. Un ejemplo, [Wilkinson et al. \(2018\)](#) compararon la información obtenida de un análisis metatranscriptómico en muestras obtenidas de rumiantes, un tipo de muestra poco representada en bases de datos metagenómicos, con los resultados predictivos de PICRUSt y con CowPI, una herramienta que utiliza PICRUSt en conjunto con los proyectos de bases de datos metagenómicos de microbiomas en rumiantes *Global rumen census* y *Hungate 1000 (Rumen Microbial Genomics Network, <http://www.rmgnetwork.org>)*. Con esta modificación, CowPI es capaz de mejorar la exactitud de los resultados obtenidos por PICRUSt semejando más los resultados obtenidos por análisis metatranscriptómicos.

En cuanto a las muestras medioambientales, principalmente obtenidas de suelo, existen algunos reportes de bases de datos que podrían acoplarse bien con el uso de PICRUSt para el presente estudio. Por ejemplo, *The Microbiome Stress Project Database (TMSP)*, es una colección de secuencias de rRNA 16S para el estudio de ecología microbiana en función de los factores medioambientales y la capacidad de tolerancia y respuesta de las comunidades microbianas a diversos factores bióticos y abióticos ([Rocca et al., 2018](#)).

Otra opción es *Earth Microbiome Project (EMP)*, un proyecto ambicioso que tiene como finalidad obtener la mayor cantidad de información ómica posible acerca de la ecología microbiana en planeta. En un comienzo se buscó identificar taxonómicamente los microorganismos no cultivables, pero el esquema cambió al querer otorgar una función dependiendo de factores geográficos y fisicoquímicos de la muestra. Hoy en día, EMP reúne información tanto de secuencias genómicas y transcriptómicas, así como información proteómica y metabolómica relacionada con la ecología microbiana de diversos tipos de muestras. EMP es sin duda una excelente propuesta para incrementar el conocimiento acerca de la ecología microbiana y sus capacidades de respuesta ante diversos factores abióticos, sin embargo, aún resulta interesante comparar la interacción con factores bióticos ([Thomson et al. 2017](#)).

En un reciente reporte, [Wang et al. \(2019\)](#) infirieron a través de PICRUSt un incremento de la expresión de genes del tipo *pilE* y Citocromo C en consorcios desarrollados sobre ánodos de CCM-autotróficas enriquecidas con algas, sin embargo, esa información resulta escasa para entender los mecanismos de intercambio de electrones y la capacidad metabólica real de los consorcios microbianos. Por ejemplo, se han reportado diversos Citocromos C en *G. sulfurreducens*, pero tal parece que sólo OmcS y OmcE son los responsables en principales en la reducción de Fe^{3+} (relacionados con el intercambio de electrones) ([Mehta et al., 2005](#)), por lo que un análisis general de la sobre expresión de citocromos C no nos permite obtener información precisa de los mecanismos de intercambio de electrones asociados a consorcios identificados por rRNA 16S.

Es necesario el uso de técnicas como qPCR (*quantitative* PCR o PCR cuantitativo) o en su caso estudios transcriptómicos para definir de mejor manera la información inferida por PICRUSt, así como realizar experimentos especializados que prueben la actividad metabólica inferida por esta herramienta. Al utilizar PICRUSt como una herramienta para deducir el potencial metabólico de los microorganismos, se debe utilizar una base de datos adecuada, realizar un análisis con cierta reserva de los resultados y utilizar técnicas como qPCR o análisis transcriptómicos para poder corroborar el potencial de esta herramienta.

Caracterización de la ecología microbiana en CCM

Se han caracterizado diferentes tipos de bacterias sobre el ánodo de una CCM, los filos con mayor abundancia reportados incluyen *Proteobacteria* y *Bacteriodetes*. Por otro lado, están otros tipos de bacterias no identificadas con una abundancia mínima pero que en conjunto representan un porcentaje considerable del total. El papel de éstas bacterias aún se desconoce, sin embargo, se infiere que podrían influir sobre la producción de electricidad debido a los metabolitos que generan ([Zhao et al., 2017](#); [Liu et al., 2017](#); [Ma et al., 2017](#)).

[Ishii et al. \(2013\)](#) por medio de la secuenciación de amplicones del gen rRNA 16S con el método de Sanger, encontraron que la composición de la diversidad microbiana a nivel clase y familia (representada por los índices de Chao1, Shannon y Simpson) sufre de

una presión selectiva cuando los factores de la resistencia externa, circuito abierto o un voltaje controlado por un potencióstato, afectan la producción de electricidad en CCM. En este estudio, las familias *Desulfobulbaceae* y *Geobacteraceae* se encontraron relacionadas con la producción de electricidad. Ya se han identificado algunos de los mecanismos de transferencia de electrones (MTE) para *Geobacter sulfurreducens* (Shi *et al.*, 2007), sin embargo, Ishii *et al.* (2013b) apoyados sobre un análisis de metatranscriptómica, identificaron la expresión de genes citocromo tipo C pertenecientes a la familia *Desulfobulbaceae* durante la producción de electricidad en CCM lo que podría significar que aunque que las familias *Desulfobulbaceae* y *Geobacteraceae* se encuentran filogenéticamente distantes podrían presentar MTE similares.

Zhao *et al.* (2017) evaluaron la dinámica poblacional microbiana cuando cambiaron el sustrato a una CCM de una cámara con cátodo aireado. Las CCM fueron alimentadas con lactato en la fase inicial, posteriormente se sustituyó por glucosa, acetato o propionato en una segunda fase, finalmente, se sustituyeron por lactato nuevamente en una tercera etapa. Los autores encontraron que el acetato en la segunda etapa afectó al mínimo la producción de electricidad y que una segunda adición de lactato (en la tercera etapa) favoreció el desarrollo de microorganismos del género *Geobacter*, *Pseudomonas* y *Anaeromosa*. El análisis taxonómico de los autores fue a través de la secuenciación de las regiones variables V3-V4 del gen rRNA 16S utilizando la plataforma MiSeq de Illumina, analizando sus datos con el software QIIME y comparando contra la base de datos RPD.

Liu *et al.* (2018) identificaron al género *Geobacter* con mayor abundancia relativa (75%) cuando enriquecieron un sustrato de acetato con el ion férrico Fe^{+3} a una concentración de 200 μM en una CCM de una cámara, en comparación con un control con sustrato sin Fe^{+3} . Los autores utilizaron la plataforma HiSeq 2500 de Illumina para secuenciar amplicones de la región V3-V4 del gen rRNA 16S y analizaron sus datos con el software QIIME (versión 1) comparando con las bases de datos Greengenes y RDP.

Sciarria *et al.* (2019) monitorearon la diversidad microbiana durante la generación de electricidad en CCM de una cámara con cátodo aireado y utilizaron herramientas como citometría de flujo y secuenciación del gen rRNA 16S por medio de la plataforma Illumina (usaron el software QIIME y la base de datos Greengenes) para describir la diversidad

microbiana (índice de Simpson) en distintos puntos en el tiempo de la producción de voltaje. Los autores encontraron mayor abundancia de los géneros *Acinetobacter*, *Azospirillum* y *Geobacter* cuando se dio la mayor producción de electricidad, al final de la corrida. Además, observaron una posible relación entre el incremento de la abundancia del género *Acinetobacter* y la producción de electricidad en la fase final del experimento.

HIPÓTESIS

La composición bacteriana en consorcios desarrollados en una celda de combustible microbianas cambia en función de los parámetros de operación, tales como el tiempo de recambio del sustrato, inóculo y tipo sustrato. La diversidad microbiana disminuye como efecto de la presión selectiva de los parámetros de operación respecto al inóculo. Sin embargo, la abundancia relativa de algunos géneros de interés incrementa, en consecuencia es posible identificar la formación de consorcios especializados para la degradación de materia orgánica y la producción de bioelectricidad en celdas de combustible microbianas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la composición bacteriana en celdas de combustible microbianas para tratamiento de vinazas y melaza para caracterizar los géneros a los cuales se les pueda atribuir la producción de bioelectricidad en condiciones previamente establecidas, tales como la fuente de inóculo, sustrato y configuración de la CCM.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del sustrato, inóculo y parámetros de operación sobre la producción de bioelectricidad y remoción de la materia orgánica en CCM de una y dos cámaras utilizando acetato de sodio y glucosa como sustratos.
2. Evaluar el efecto del uso de las melaza y vinazas como sustrato y de los parámetros de operación sobre la densidad de microorganismos electrogénicos y la producción de bioelectricidad en CCM de una y dos cámaras.
3. Identificar las diferencias en la composición de microorganismos desarrollados con el uso de diferentes sustratos en CCM por secuenciación del gen rRNA 16S.
4. Analizar los microorganismos caracterizados como posibles responsables de la producción de bioelectricidad en las CCM.

METODOLOGÍA

Estrategia experimental

En la [Figura 8](#) se muestra un resumen de la estrategia experimental que consta de tres etapas, en la primera se determinó el efecto del tipo de inóculo y el tiempo de residencia hidráulica sobre el desempeño de las CCM. En la segunda se evaluaron diferentes configuraciones de CCM y varios sustratos entre los cuales se encontraron: acetato, glucosa, vinazas y melaza. En la tercera se identificó la composición bacteriana mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

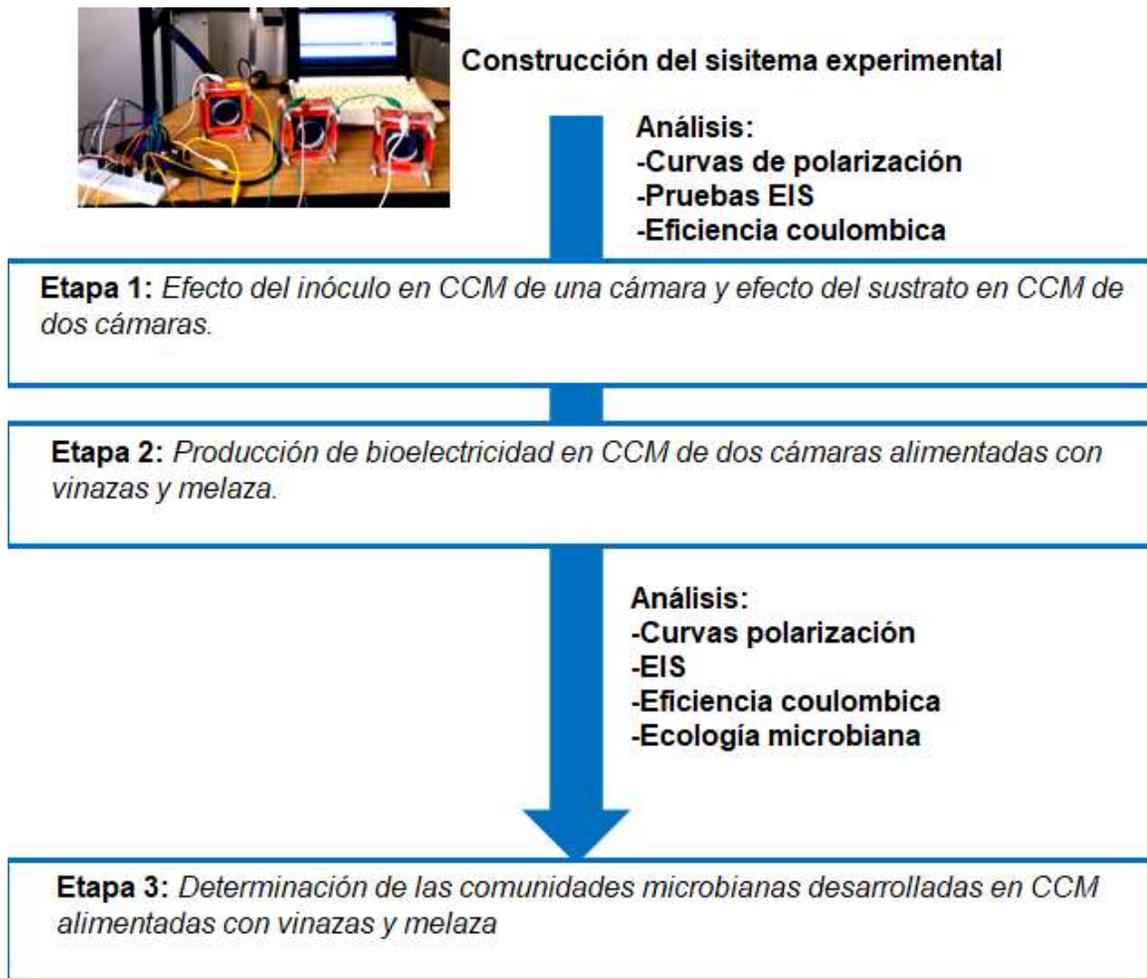


Figura 8. Resumen gráfico de la estrategia experimental. La fase experimental del presente estudio consta de tres etapas y una previa para la construcción y pruebas preliminares de las CCM.

Características de las CCM

Se construyeron 5 CCM de diseño modular con lámina de acrílico (*PLEXIGLAS®*) de 5 mm y 12 mm de espesor, para las cubiertas y para el cuerpo, respectivamente (*Figura 9a*). Éste diseño permite la configuración de CCM de una y de dos cámaras separadas por MIP. Las placas que conforman el cuerpo de la cámara miden 10 cm por lado en el exterior y 8 cm por lado en el interior, por lo tanto, el volumen de un módulo equivale a 75 ml. En una configuración de una sola cámara, el volumen de la CCM con 2 placas será de 150 ml con una distancia entre electrodos de 1.2 cm y ésta cuenta con un cátodo aireado (*Figura 9b*).

Para la configuración de doble cámara separada por MIP *Nafion TM117* (*DuPont Co*), la CCM estará conformada por 4 placas, por lo tanto, el volumen será de 150 ml para cada cámara, el cátodo se encontrará inmerso en un católito (ferrocianuro de potasio) y se inyecta oxígeno (o cátodo aireado) en la cámara catódica, la distancia entre electrodos es de 1.2 cm (*Figura 9c*). En ambos casos, el ánodo está constituido por fieltro de grafito con una superficie de 0.0025 m² térmicamente acondicionados. El cátodo está conformado de tela de carbón impregnada con 4 capas de poli estireno expandido (16 % w/v, en una solución de xileno-acetona, 7:3) al exterior, y con una superficie de 0.0064 m².

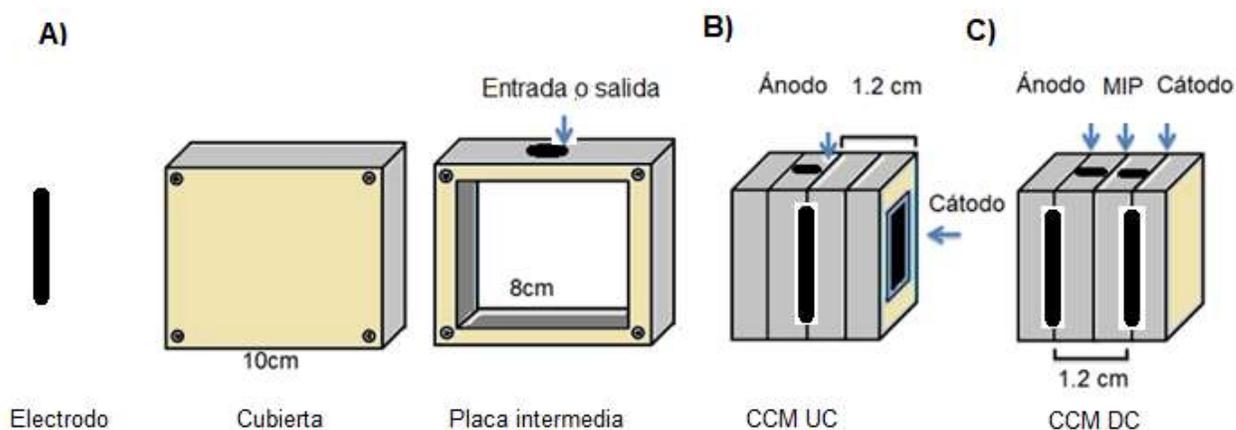


Figura 9. CCM de diseño modular. A) Partes que conforman la CCM; B) Configuración de una cámara; C) configuración de dos cámaras separadas por MIP.

El sistema de adquisición de datos consta de un arduino Mega 2560 (ADC22, Pico Technology, Ltd.) conectado a las 5 CCM a través de un Protoboard por medio de cables jumper tipo Dupont y configurado con las resistencias adecuadas (después de caracterizar la resistencia interna del sistema). El sistema electrónico fue programado con la herramienta de Simulink del software de Matlab (Mathworks®) (Pietruszka, 2012). El arduino a su vez se encuentra conectado a un ordenador para el registro de datos del voltaje a circuito cerrado (Figura 10).

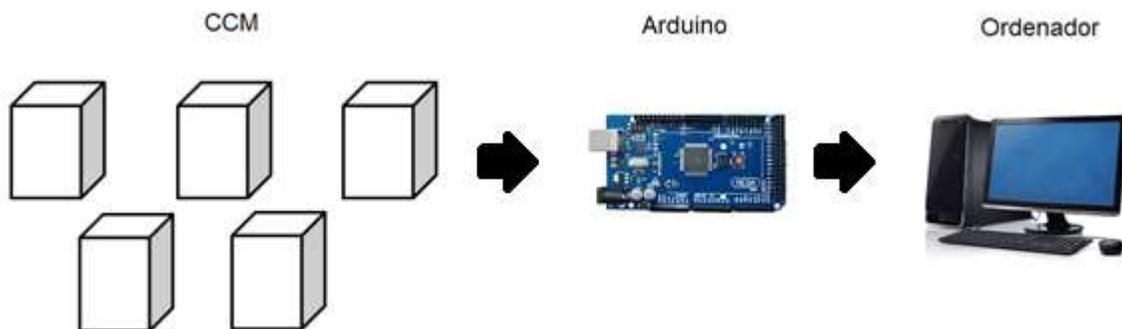


Figura 10 Esquema del sistema de adquisición de datos. Se registra el voltaje producido en un ordenador por medio de un arduino conectado a las CCM.

Con la finalidad de caracterizar la configuración (ya sea de una o dos cámaras) y la eficiencia de la CCM, durante la etapa de evaluación del efecto del inóculo y del TRH sobre la producción de bioelectricidad, se calculó la intensidad de corriente (I), potencia (P), densidad de potencia (Dp), densidad de corriente (Dc), potencia volumétrica (Pv), remoción de DQO (DQO_R) y eficiencia coulombica (E_c). Además, se realizaron las siguientes pruebas electroquímicas: curvas de polarización, para determinar la resistencias internas y ajustar la resistencia externa; espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), para conocer el rendimiento de la celda. Con los datos de EIS se analizaron con un modelo de circuitos equivalentes algunas características resistivas así como capacitivas.

Ecuaciones utilizadas en las variables eléctricas y de remoción:

$$I = \frac{V}{\Omega}, \quad P = IV, \quad Dc = \frac{I}{A}, \quad Dp = \frac{P}{A}, \quad Pv = \frac{P}{v}, \quad DQO_R = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} * 100 \text{ y } E_c = \frac{MI\Delta t}{Fbv\Delta COD}$$

Etapa 1: efecto del inóculo, del sustrato y parámetros de operación en CCM de una y dos cámaras

Durante la etapa uno, se determinó el efecto del inóculo sobre la Dp usando CCM de una cámara y acetato de sodio como sustrato. Se comparó la producción de bioelectricidad con la degradación de materia orgánica. Como primera fuente del inóculo, se colectaron muestras extraídas de un sedimento de arroyo en cuerpos de agua del antiguo distrito minero en el poblado de Huautla, Morelos, ya que reportes del servicio geológico Mexicano muestran que en dicho sitio existe la presencia de metales, como Fe, Pb, Zn, entre otros (Anexo 1 y Figura 11). Por lo anterior, se supone que en esos sitios podemos encontrar consorcios de bacterias reductoras de metales. La segunda fuente de inóculo fueron lodos granulares anaerobios obtenidos de la planta de tratamiento de agua de una industria papelera. Estos lodos fueron pre acondicionados: macerados, pesados, alimentados con una solución de acetato de sodio (20 mM) en un matraz e incubados a 37°C por 3 días.



Figura 11. Sitio de muestreo para la obtención de inóculos. Muestra 1 (18°26'49.46"N y 99°01'36.03"O), Muestra 2 (18°25'42.77" N y 99°03'13.87"O). Las flechas en color amarillo representan los cuerpos de agua y los cuadros rojos presentan las posibles zonas de las antiguas mineras.

Una serie de cinco CCM de una cámara se operaron en modo por lotes durante 21 días (dependiendo del comportamiento del voltaje producido) para permitir el desarrollo de la biopelícula y evaluar la fase de aclimatación. Dos CCM se inocularon con lodos granulares anaerobios (LG) y otras dos con sedimentos de Huautla (SH), la cantidad del inóculo en ambos casos fue del 20% del volumen del reactor, el control negativo careció de inóculo (Tabla 6). Se usó como sustrato una solución de acetato de sodio (20 mM) amortiguada con búfer de fosfatos a pH 7 (50 mM). Con base en los resultados de este experimento, se seleccionó LG como el mejor inóculo.

Posteriormente, en otro experimento usando LG como inóculo se evaluó el efecto del sustrato en CCM de doble cámara utilizando en la cámara catódica ferrocianuro de potasio como aceptor último de electrones a una concentración de 100 mM. Como sustrato en la cámara anódica se utilizaron las concentraciones de 10, 20 y 40 mM de glucosa y acetato de sodio. Cada concentración se fue variando después de cada TRH en cada caso.

Al término de cada TRH, se sustituyó el sustrato por uno nuevo y se midió la DQO (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*) y el pH. Con el sistema de adquisición de datos, se registró el voltaje en tiempo real o en su caso con un multímetro en fase de la selección del inóculo. Al final de cada corrida, asépticamente se tomó muestra de la biopelícula raspando con una espátula estéril el ánodo y se congeló a -70 °C en solución salina para su posible análisis de ecología microbiana. La [Tabla 7](#) muestra un resumen del estudio del TRH, sustrato e inóculo en las diferentes configuraciones de CCM.

Tabla 7 Configuración de las CCM para la evaluación del inóculo y el TRH

Tipo de celda	TRH	Inóculo	Sustrato	Prueba electroquímica
Una cámara	15 d	LG	Acetato	Curvas polarización y EIS
Una cámara	15 d	SH	Acetato	Curvas polarización y EIS
Dos cámaras	3 d	LG	*Glucosa	-
Dos cámaras	3 d	LG	*Acetato	-

TRH, Tiempo de residencia hidráulica; LG, Lodos granulares anaerobios; SH, sedimentos; EIS, espectroscopia de impedancia electroquímica; * Concentraciones 10, 20 y 40 mM

Al final de la etapa uno y al analizar los resultados, se determinó el efecto del inóculo y de los parámetros de operación sobre la densidad de potencia producida en CCM de una o dos cámaras.

Estudios electroquímicos

Con la finalidad de estimar la resistencia interna y la D_p de las CCM, se obtuvieron las curvas de polarización al término de operación de cada CCM, se realizaron mediciones de voltajes crecientes con una serie de resistencias externas de entre 10 Ω y 20 K Ω hasta el punto de estabilización. La producción de voltaje (mV) del sistema CCM fue medido en tiempo real con un multímetro digital MUL-600/RS232C (*STEREN*[®]) en el caso de las CCM de una cámara sin catalizador o con un sistema de adquisición de datos basado en Arduino para el resto de los experimentos. Para determinar las

resistencias internas del electrolito y de la interfase, se realizaron estudios de *espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, del inglés Electrochemical Impedance Spectroscopy)* se realizaron con un Potenciostato/galvanostato/ZRA 09097 (*Gamry instruments Interface 1000TM*). El rango de frecuencia que se utilizó fue de 0.1 Hz-100 KHz con una señal de corriente alterna de una amplitud de 5 mV para analizar la respuesta sin perturbar el funcionamiento de los reactores, dichas condiciones fueron manipuladas con el software Gamry Framework. Los potenciales anódicos se determinaron con el mismo equipo, donde se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3 M, +207 mV, pH 7 a 25 °C, *Metrohm*). Se analizaron las resistencias internas (resistencia óhmica y de la interfase ánodo- anolito), elementos de fase constante y elementos Warburg utilizando un modelo de circuitos equivalentes para la descripción de las CCM de doble cámara alimentadas con vinaza mezcalera, vinaza tequilera y melaza con el software *Zsim Demo v3.20* y el modelo R (Q (RW)).

Evaluación de CCM de una cámara usando catalizador en el cátodo

En esta fase de la etapa uno del estudio, se evaluó el rendimiento de las CCM de una sola cámara utilizando platino como catalizador en el cátodo y melaza como sustrato. Además, se analizó la morfología de la biopelícula con microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El objetivo fue analizar el rendimiento de las CCM de una cámara con cátodos cubiertos de platino, en comparación con las CCM de una cámara sin catalizador, además, se comenzó a utilizar sustratos complejos como la melaza que fue comparada con acetato de sodio como una fuente diferente de sustrato.

Para el ánodo, se cortaron discos de fieltro de grafito de 3 cm de diámetro y 0.5 cm de grosor, posteriormente se lavaron sumergiéndolos en ácido clorhídrico 1 N por 1 h y se secaron por 15 min a 350 °C en una mufla previamente calentada. Mientras que para el cátodo, se cortaron cuadrados de 5 cm por lado de tela de carbón para los cátodos, se lavaron con ácido clorhídrico 1 N por 1 h y se secaron por 15 min a 350 °C en una mufla previamente calentada.

La preparación de los cátodos fue modificada del protocolo diseñado por [Logan et al, \(2007\)](#), se pesaron 1.56 mg de carbón activado por cada cm² de superficie, es decir, 39 mg de carbón por cada cuadro de tela de carbón con una superficie de 25 cm². En un

vial, se añadió 348 μL PTFE al 40% y se mezcló gentilmente para evitar la formación de burbujas. La mezcla se aplicó sobre la superficie de la tela de carbón con un pincel pequeño y se distribuyó uniformemente, se secó por 2 h a temperatura ambiente y luego en una mufla a 350°C por 15 minutos. Posteriormente, sobre la capa de carbón se aplicaron 4 capas de PTFE al 60% con tiempo de secado entre capa y capa de 15 min a temperatura ambiente y 15 más a 350°C en una mufla precalentada. Para la capa catalítica, se preparó una mezcla con platino sobre carbón (Pt/C) al 10% más 83 μL de agua destilada, 6.67 μL de solución de Nafión y 3.33 μL de alcohol isopropílico por cada mg de Pt/C. Se aplicó una capa de la mezcla en una proporción de 0.5 mg de Pt/C por cm^2 de la superficie opuesta a la cara con carbón/PTFE y se dejó secar por 24 h temperatura ambiente (Figura 12).

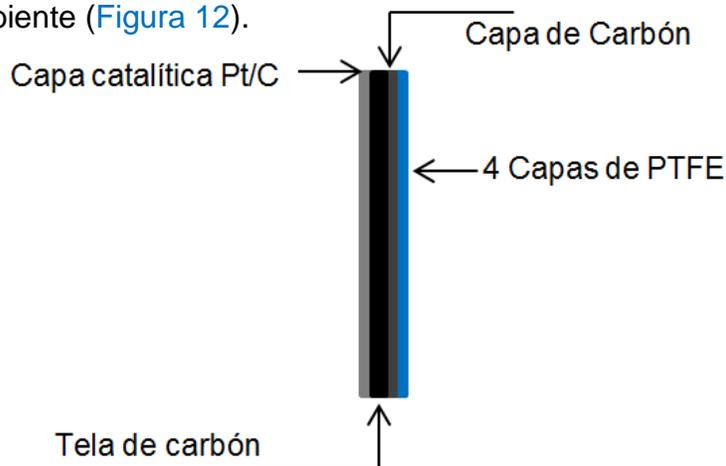


Figura 12. Representación esquemática de la preparación del cátodo con catalizador. Estas capas son impregnadas para mejorar la capacidad catalítica (Pt/C), incrementar el área superficial (Pt/C y C) y permitir el paso del oxígeno del aire al mismo tiempo que retener los líquidos al interior de la CCM (xPTFE).

Las melazas fueron diluidas en agua destilada en una proporción 1:99, melazas: agua, respectivamente. El valor de la DQO calculada fue entre 3-4 g/L. El pH se ajustó a 7 con HCl y NaOH 1N. Como control, se usó acetato de sodio (1g/L) ajustado a un pH de 7 con búfer de fosfatos (50 mM). Como inóculo se utilizaron lodos granulares anaerobios macerados en un mortero, en un vial se pesaron 500 mg para cada reactor se añadió 2 ml de agua destilada y se disolvieron con sonicación por 10 minutos. Como recolector de datos se utilizó un arduino acoplado a un ordenador (explicado anteriormente, anexo dos) y se monitoreó el voltaje producido en las CCM con intervalos de 4 h por 600 h. Las

primeras 300 h, las CCM se operaron a circuito abierto y las 300 h posteriores a circuito cerrado con una resistencia externa de 1000 Ohms.

En la operación de las CCM en esta fase del estudio, durante las primeras 300 h de operación a circuito abierto tres CCM se alimentaron con acetato de sodio para observar la reproducibilidad, posteriormente, a las 200 h se sustituyó el sustrato de dos CCM, una con acetato de sodio fresco y otra con melazas, la tercera CCM contenía el mismo acetato de sodio que se alimentó desde el inicio. Al final de la corrida, se determinaron las curvas de polarización de cada CCM con una resistencias externas variables (0-20,000 Ω), se midió el voltaje hasta alcanzar lecturas de pseudoequilibrio (voltaje constante en un intervalo de 5 minutos como mínimo). Por medio de la ley de Ohm, se calculó la densidad de potencia y la potencia volumétrica. La muestra de la biopelícula se colectó raspando con una espátula estéril, se suspendió en solución salina y se almacenó a -80°C para su posterior análisis. Para ambas CCM (alimentada con acetato de sodio o melaza), un fragmento del ánodo (1 cm x 1 cm) con una porción de la biopelícula se cortó con un bisturí estéril y se envió al Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias aplicadas (CIICAp) en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) para análisis de microscopía electrónica de barrido con un equipo HITACHI (Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope SU5000) para analizar la morfología de la biopelícula.

Etapa 2: Producción de bioelectricidad en CCM de dos cámaras alimentadas con vinazas y melaza

La melaza utilizada en este estudio procede del Ingenio Azucarero Emiliano Zapata en el municipio de Zacatepec, Morelos. La vinaza tequilera fue obtenida de una industria ubicada en el estado de Hidalgo. Por otro lado, la vinaza mezcalera se obtuvo de una pequeña destiladora artesanal en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos. En el caso de la melaza, se observó una gran viscosidad que disminuyó al diluirla en agua desmineralizada sin apreciarse sólidos, mientras que para ambas vinazas, la muestra se tomó de la parte superior del líquido en el tanque de recepción, para evitar la presencia de sólidos que se sedimentan en el tanque. Las vinazas de agave (tequileras y mezcaleras) pueden presentar valores de DQO desde 5 hasta 150 g/L ([Mendez-Acosta et al., 2010](#); [García-Depraect et al., 2020](#); [Ramírez-Ramírez et al., 2021](#)) lo que las

convierte en residuos con alta concentración de materia orgánica. Sin embargo, algunos reportes sugieren que valores de DQO altos pueden saturar la CCM provocando un pobre rendimiento de bioelectricidad (Lopez-Velarde et al., 2017; Marks et al., 2020).

En la etapa dos del estudio, se operaron tres CCM de dos cámaras durante 800 h alimentadas con melaza y vinazas, para determinar el efecto del sustrato sobre la diversidad microbiana. Se evaluaron dos vinazas, una tequilera de una planta destiladora en el estado de Hidalgo y otra mezcalera obtenida de la industria de la destilería en el estado de Morelos. Ambas vinazas se diluyeron con agua desmineralizada para obtener influentes con valores de DQO entre 3-4 g/L y fueron amortiguadas con búfer de fosfatos (50 mM) para mantener el valor de pH 7. Además, se evaluó la melaza obtenida del ingenio azucarero Emiliano Zapata de Zacatepec, Morelos. Ésta también se diluyó para obtener valores de DQO similares a las de las vinazas. Como inóculo se utilizaron lodos granulares anaerobios y la muestra para extraer el DNA del inóculo fue colectada el mismo día del arranque de la corrida y congelada a -70 °C para su comparación con la composición microbiana de las biopelículas.

Las CCM de doble cámara se operaron en seis ciclos con una duración aproximada de 100 h. En los primeros tres ciclos (C1, C2 y C3) se observó el voltaje y las resistencias internas con curvas de polarización y EIS. Posteriormente, con el objetivo de describir el comportamiento de las CCM de dos cámaras alimentadas con melaza y vinazas se extendió la corrida por tres ciclos adicionales (C4, C5 y C6). Además, se cambiaron los sustratos al mismo tiempo que los catolitos, para disminuir el efecto del cátodo sobre la producción de electricidad, variables como pH y cambio de concentración del ferrocianuro de potasio. Además, se determinaron las curvas de polarización, se realizaron pruebas de EIS (ciclos C4, C5 y C6), así como un análisis por circuitos equivalentes para determinar los valores de las resistencias óhmicas y la de interface anolito-ánodo. Además, se identificaron los valores de los elementos de fase constante, (CPE, por sus siglas en inglés) y el elemento Warburg, valores que se asocian con los procesos capacitivos y de difusión en el ánodo, respectivamente (se describe en el apartado de estudios electroquímicos). Al término de los ciclos de operación C4, C5 y C6

con una duración de 72 h, se determinó la degradación de la materia orgánica medida con la DQO y se calculó la eficiencia coulombica.

Etapa 3: Determinación de comunidades microbianas en CCM alimentadas con vinazas y melaza

Al final del ciclo C6, se colectaron las muestras de la biopelículas anódicas de las tres CCM para determinar la ecología microbiana representativa en cada una de las CCM. Las muestras de las biopelículas e inóculo congeladas a -70 °C fueron colectadas para la extracción de DNA con el kit comercial DNeasy PowerSoil (*MOBIO*) de acuerdo las instrucciones del fabricante. Con el DNA extraído, se amplificaron las regiones V3-V4 del gen rRNA 16S en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Ahí se construyeron las librerías metagenómicas del gen rRNA 16S de acuerdo al protocolo de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB). Se secuenciaron los amplicones del gen ribosomal 16S obtenidas de las regiones variables V3-V4 por la plataforma MiSeq de Illumina en una configuración de lecturas pareadas en 600 ciclos, de acuerdo a lo reportado por [Godoy-Lozano et al., 2018](#).

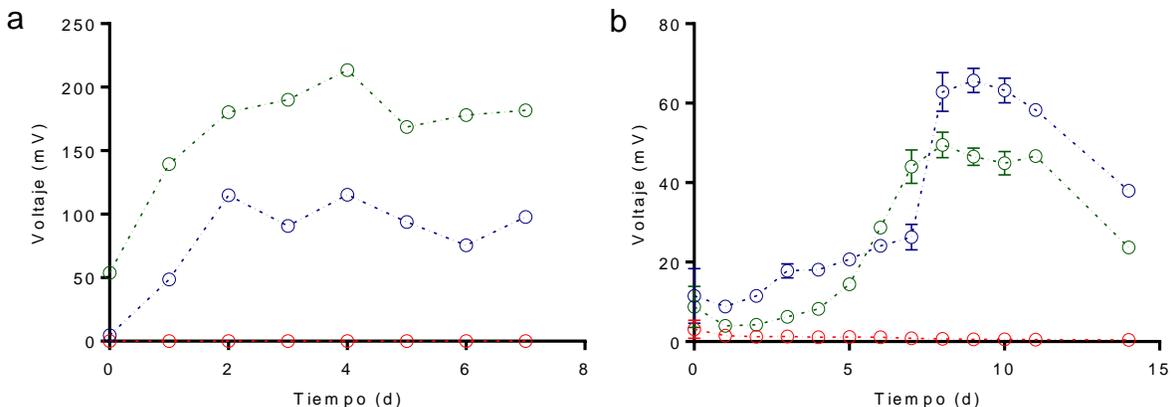
Se realizó un control de la calidad de las lecturas con un valor mínimo de Q>20 con el software *FastQC*. Se realizó la caracterización de la taxonomía microbiana por el software QIIME2 ([Hall & Beiko, 2018](#)), en donde se eliminaron quimeras y errores de secuenciación así como la generación de ASV (amplicon sequence variant) con el software DADA2 ([Callahan et al., 2016](#)). Finalmente, con los resultados de QIIME2 se determinó la diversidad microbiana por medio de los índices Faith para diversidad alfa y Bray-Curtis para diversidad beta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la fuente del inóculo sobre la producción de electricidad en CCM de una cámara alimentada con acetato de sodio y determinación de su resistencia interna

Se usó una solución de acetato de sodio (20mM) amortiguada con buffer de fosfatos (50mM) a pH 7 como sustrato y se evaluó la producción de voltaje durante una semana a circuito abierto y durante dos semanas a circuito cerrado con una resistencia de 1000 Ω en CCM inoculadas con lodos granulares (CCM-LG) y con sedimentos de arroyo de la comunidad de Huautla (CCM-SH). Como control negativo se operó una CCM sin inóculo. En circuito abierto (sin resistencia externa) CCM-LG produjo un voltaje aproximado de 240 mV, CCM-SH de 120 mV; los cuales fueron normalizados restando el voltaje producido por el control que fue de 70 mV (Figura 13a).

Para circuito cerrado (resistencia de 1000 Ohms), en ambos sistemas CCM-LG y CCM-SH se alcanzaron los máximos voltajes alrededor del día 8. CCM-LG produjo un voltaje máximo alrededor 65 mV, un 7% mayor que CCM-SH, que produjo un voltaje máximo alrededor de 45 mV. La producción máxima de voltaje promedio se presentó durante los días 8, 9 y 10 para CCM-LG. Mientras que para CCM-SH los días 7, 8, 9 y 10. Posterior a esos días, se observó un decremento en la producción del voltaje en ambos sistemas (Figura 13b). En el caso de la Dp y Pv, el mejor rendimiento lo obtuvo CCM-LG con valores de 1.7 mW/m^2 y 28.9 mW/m^3 , respectivamente (Figura 13c y d).



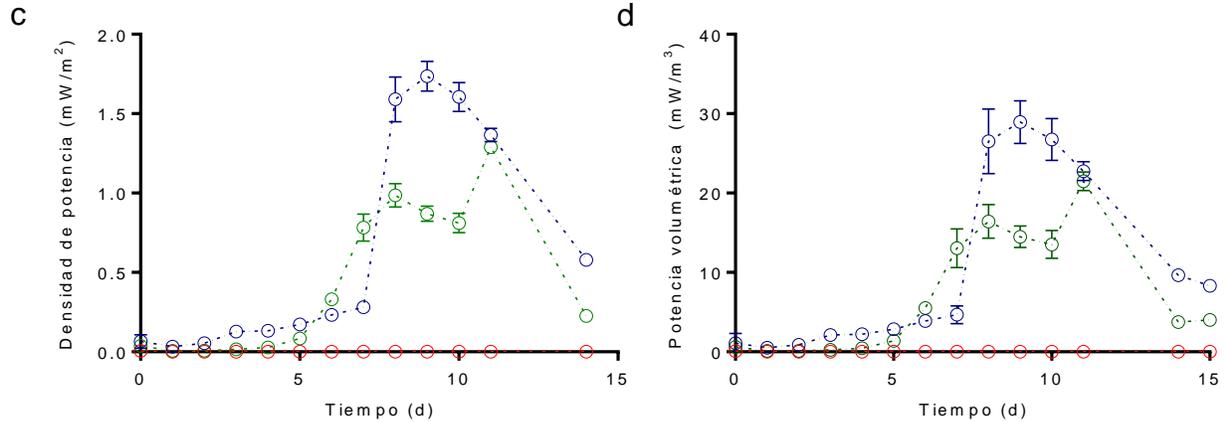


Figura 13. Rendimiento de CCM inoculadas con lodos granulares y con sedimentos. a) Voltaje a circuito abierto; b) Voltaje a circuito cerrado; c) Densidad de potencia; d) Potencia volumétrica. (Lodos granulares en círculos azules, sedimentos en círculos verdes y control negativo en círculos rojos).

CCM-LG mostró un mejor rendimiento en comparación con CCM-SH. Sin embargo, para estar seguros que el efecto es debido a las capacidades de la biopelícula, es decir que existen condiciones similares en la resistencia interna debido a las características del reactor, se realizó una curva de polarización con resistencias de 10-20,000 Ω , se determinó la D_p máxima y la pendiente de las curvas (voltaje vs densidad de corriente) para el cálculo de la resistencia interna en cada una de las CCM. En el caso de CCM-LG, se observó una D_p máxima de 1.35 mW/m^2 y una resistencia interna de 82 Ω , mientras que para CCM-SH se obtuvo una D_p máxima de 1.25 mW/m^2 y una resistencia interna de 144 Ω (regresión lineal, $R^2=0.9879$ y $R^2=0.9895$, respectivamente; $P=0.001$. Calculadas con *GraphPad Prism*) (Figura 14).

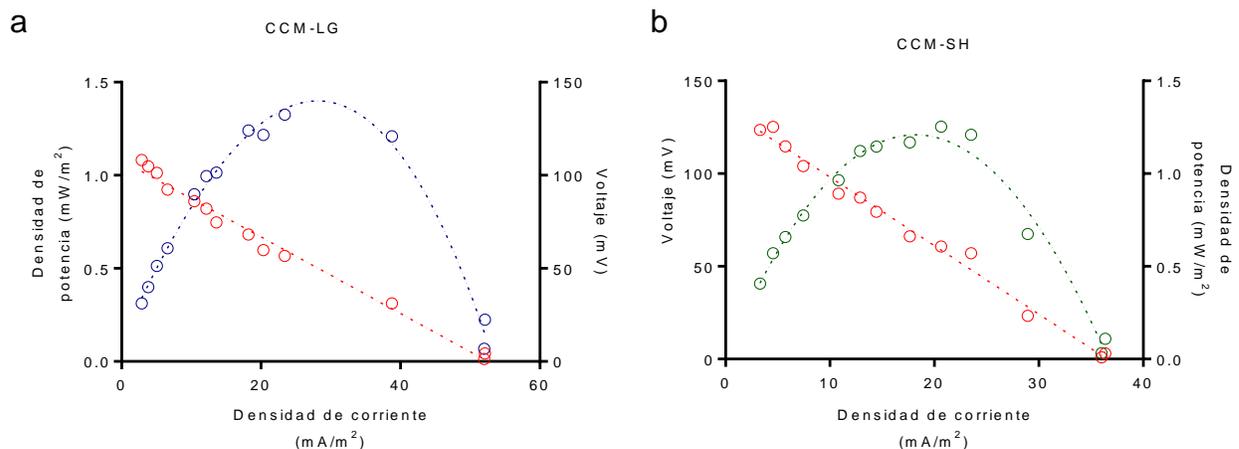


Figura 14. Curvas de polarización para: a) CCM-LG; b) CCM-SH. (Círculos azules o verdes, D_p ; círculos rojos, voltaje en ambas figuras).

La resistencia interna determinada con curvas de polarización (valor de la pendiente de la recta) en CCM-SH fue aproximadamente 40 % mayor que en CCM-LG, por tal motivo y dada la baja exactitud de la prueba, se consideró pertinente hacer pruebas de impedancia electroquímica, para determinar la resistencia interna a través de un análisis del gráfico de Nyquist, que permite distinguir entre la resistencia del electrodo y la del seno del líquido (Mei et al., 2017). Los gráficos de Nyquist consisten en resistencias reales vs resistencias imaginarias determinadas con un potenciostato al aplicar pulsos de corriente alterna a diferentes frecuencias. El diseño de los reactores nos permite suponer que las pérdidas óhmicas deberían ser similares y las diferencias en la resistencia interna se deben principalmente al tipo de pérdidas por activación, metabólicas y concentración, características propias de la biopelícula. (Logan et al., 2006).

La Figura 15a y b muestra los gráficos Nyquist completos obtenidos con EIS. En una ampliación de los gráficos Nyquist para CCM control y CCM-LG mostraron resistencias internas similares con un valor cercano a los 20 Ω (Figura 15c y e) mientras que la CCM presentó una resistencia cercana a los 30 Ω (Figura 15d). De manera similar a las curvas de polarización la resistencia interna de CCM-SH fue aproximadamente un 30-40% mayor que la resistencia de CCM-LG. Además, de acuerdo a las interpretaciones físicas del gráfico de Nyquist, la región correspondiente a la resistencia interna del electrodo fue similar en todas las CCM (Figura 15c, d y e). Sin embargo, la región de la resistencia del seno del líquido fue mayor para la CCM-SH (figura 15e), de tal manera, podemos atribuir el incremento de la resistencia interna a pérdidas de tipo metabólicas y activación que posiblemente tienen lugar en la CCM-SH.

CCM-LG mostró el mayor potencial anódico (representado como el valor más negativo) (figura 15f), lo que concuerda con el mejor rendimiento que obtuvo con respecto a CCM-SH en los resultados de voltaje, densidad de potencia y potencia volumétrica (figura 13). Por otro lado, podemos inferir el potencial catódico definido como la diferencia entre la fuerza electromotriz y el potencial anódico (la fuerza electromotriz de la CCM está dada por $F_{em} = E_{cat} - E_{an}$, donde F_{em} es prácticamente, el valor de voltaje producido a circuito abierto). Ambas CCM presentaron un potencial catódico similar con un valor alrededor de los 200 mV mientras que para el control fue de 140 mV (figura 16a). CCM-LG mostró

el mayor voltaje a circuito abierto (VCA) y potencial anódico mientras que el potencial catódico fue similar entre CCM-LG y CCM-SH. Además, se determinó la eficiencia coulombica, en la cual la CCM-LG mostró el 40% de E_c , mientras que la E_c de la CCM-SH fue del 28% (Figura 16b).

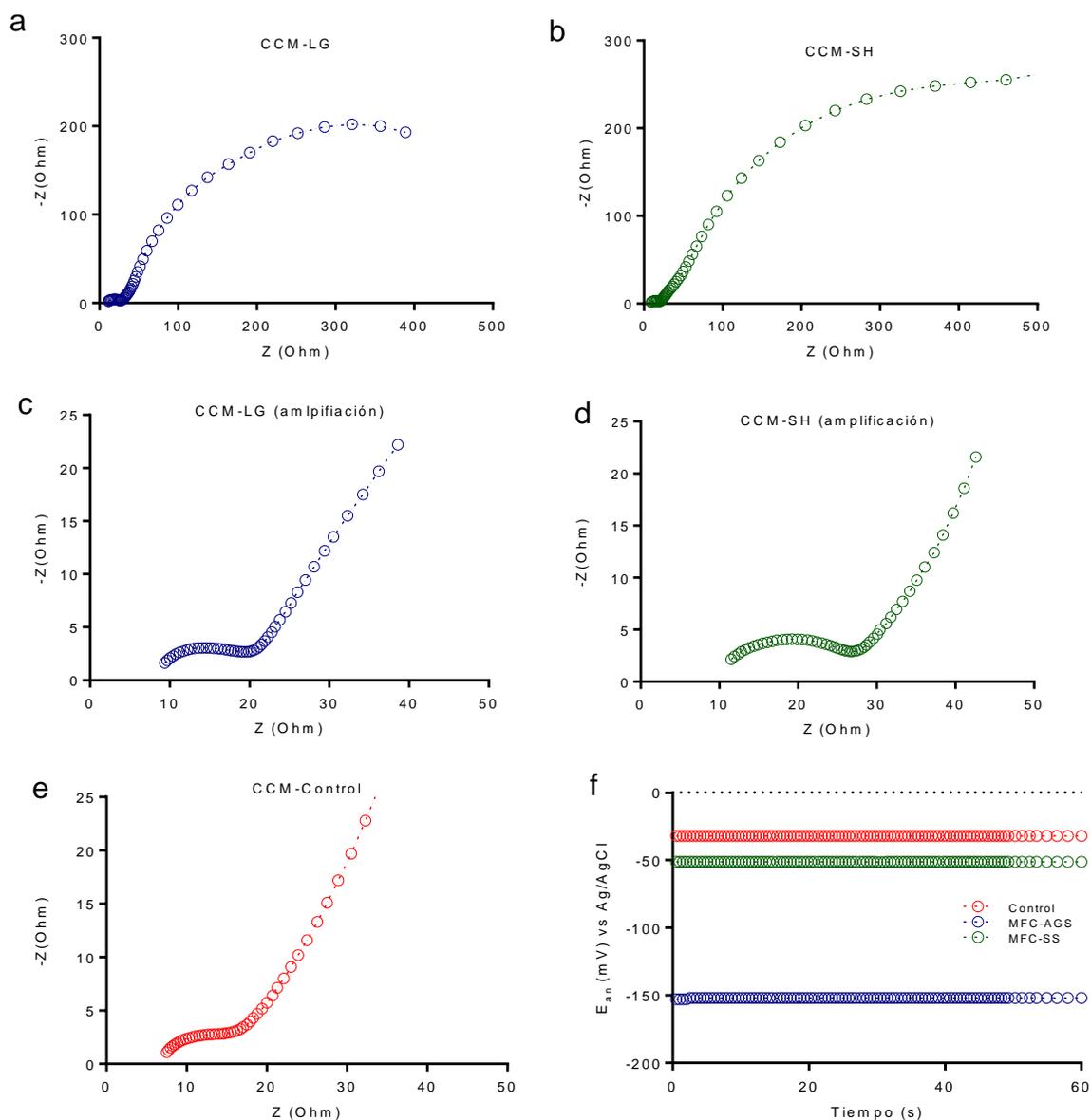


Figura 15. Determinación de las resistencias internas y potencial anódico. a y c); Gráficas de Nyquist para la determinación de resistencias internas en las CCM; espectro completo para CCM-LG y CCM-SH; b, d y e) Ampliación de la región del semicírculo para la determinación de la resistencia interna de la CCM-control, CCM-LG y CCM-SH (Mei et al., 2017); f) Potencial anódico de las CCM.

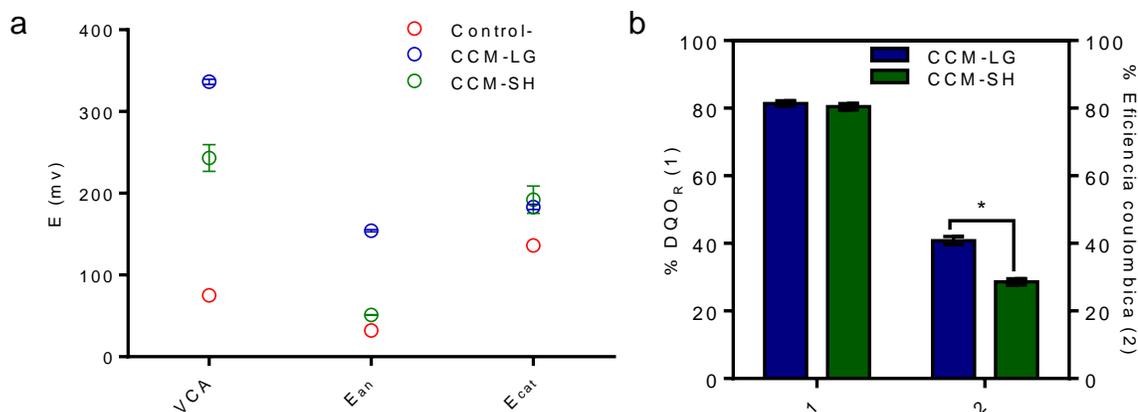


Figura 16. Rendimiento de las CCM de Una cámara sin catalizador; a) Voltaje a circuito abierto (VCA), potencial anódico (E_{an}) y catódico (E_{cat}); b) Remoción de DQO y Eficiencia coulombica.

El inóculo con lodos granulares presentó un mejor rendimiento frente al inóculo de sedimentos de Huautla (Figura 13), suponemos que la biopelícula desarrollada a partir de éste inóculo posee mejores capacidades para la producción de bioelectricidad, debido a que el potencial catódico calculado fue similar para CCM-LG y CCM SH (Figura 16) y que las resistencias del electrodo fueron similares en ambos casos, no así las resistencias del seno del líquido, tal como lo muestran los diagramas de Nyquist (Figura 15). Por otro lado, los días con mejor rendimiento de producción de bioelectricidad fueron a partir del día 7 hasta el día 11, después el voltaje comenzó a disminuir rápidamente, estos datos nos permite proponer un tiempo de residencia hidráulico en reactores operados en modo continuo de 5 días cuando usamos acetato de sodio 20 mM como sustrato. Sin embargo, para el uso de vinazas y melazas este valor debe ser calculado posteriormente, ya que la composición química de estos sustratos es distinta.

El rendimiento de la CCM de una cámara sin catalizador resultó menor comparado con los de otros modelos de CCM de una cámara con catalizador reportados por otros autores, en relación a la configuración de la CCM y el mismo sustrato (Chen et al., 2008; Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2019;). Esto se puede atribuir a la ausencia de catalizador en el cátodo utilizado. Por lo tanto, es posible mejorar este rendimiento al incrementar el potencial catódico de la CCM a través del uso de algún catalizador, por ejemplo, platino. Otro punto a considerar, es la permeabilidad del poli estireno que recubre la cara externa del cátodo en el modelo usado, en otros estudios se usa PTFE

para tal efecto. No se ha reportado cual es la eficiencia del poli estireno para permitir el paso de oxígeno (aire) y que tanto afecta la reacción de reducción del mismo. Aun así, resulta un modelo adecuado para la evaluación previa de diferentes inóculos y sustratos, debido a su bajo costo, ya que el catalizador es uno de los elementos más costosos en el diseño de sistemas bioelectroquímicos (HaoYu et al., 2007; Wang et al., 2022).

Evaluación del efecto del tipo de sustrato, concentración y pH en CCM de dos cámaras

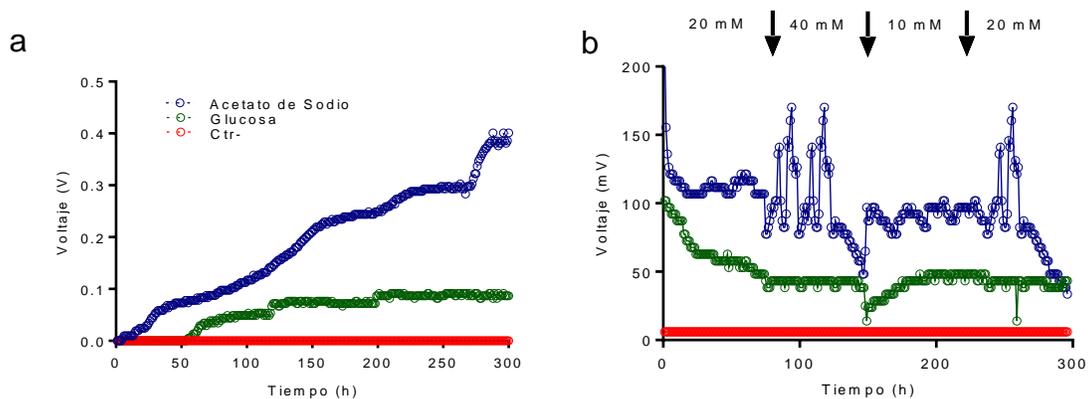
Se evaluó la producción de voltaje en CCM de doble cámara alimentadas con dos tipos de sustrato: glucosa y acetato de sodio. Se operó una CCM con acetato de sodio (20 mM) en circuito abierto por 300 h, el voltaje máximo alcanzado fue de aproximadamente 0.4 V a partir de las 280 h. Otra CCM se operó con glucosa (20 mM). En ésta el voltaje máximo producido fue de 0.1 mV a partir de las 200 h (Figura 17a). Se utilizó como control una tercera CCM, alimentada con agua destilada, el inóculo en las tres CCM fue lodos granulares anaerobios, ya estudiados previamente.

Posteriormente, las tres se operaron CCM a circuito cerrado con una resistencia de 1000 Ohms por 300 h. Al inicio y por 72 h, se utilizaron los mismos sustratos que se usaron en circuito abierto a una concentración de 20 mM. Se produjeron voltajes de 120 y 60 mV para acetato y glucosa, respectivamente. Después, se cambió la concentración de los sustratos por una mayor, de 40 mM por 72 h, se observó una variación en voltaje desde los 90 hasta los 150 mV para la CCM alimentada con acetato de sodio y un voltaje alrededor de los 50 mV para la CCM alimentada con glucosa. En una tercera fase, se disminuyó nuevamente la concentración de los sustratos a 10 mM y se observó un ligero decremento respecto a la primera fase con un voltaje producido entre 80 y 100 mV para la CCM alimentada con acetato de sodio y nuevamente alrededor de 50 mV para la CCM alimentado con glucosa, muy similar a la segunda fase. Finalmente, se cambió la concentración del sustrato a la inicial, de 20 mM, para observar si la producción de voltaje se restablecía como al principio de la corrida. En la CCM alimentada con acetato de sodio se observó voltaje de 150 mV en un periodo de 24 h. Después de ese tiempo el voltaje disminuyó rápidamente. Para la glucosa el voltaje se mantuvo ligeramente por debajo de los 50 mV (Figura 17b).

De manera similar a la producción del voltaje, la densidad de potencia fue mayor para la CCM alimentada con acetato de sodio como sustrato, puntualmente, cuando se alimentó con una concentración de 20 mM y 40 mM, sin embargo a 40 mM la densidad de potencia varió mucho, entre 3 y 10 mW/m². En el caso de la glucosa, el comportamiento de la densidad de potencia fue más regular que la producida con acetato de sodio, sin embargo, ésta fue mucho menor, alrededor de 1 mW/m² (Figura 17c).

Se identificó en la CCM alimentada con acetato de sodio, una subida de voltaje después de un incremento en la concentración, lo que se infiere es que una mayor disponibilidad de sustrato para la biopelícula constituida por bacterias electroactivas se refleja en un incremento en el voltaje. Por otra parte, en la CCM alimentada con glucosa, se infiere que no hubo incremento en el voltaje debido a que el número de bacterias electroactivas en el consorcio desarrollado fue limitado.

Para evaluar el efecto del pH sobre el desempeño de las CCM, en un experimento independiente con dos CCM de doble cámara y un control sin inocular, las CCM se alimentaron con acetato de sodio (10 mM) y fueron operadas a circuito cerrado (1000 Ω) por 300 h con un pH de 7 en una y un pH de 6 en la otra, mientras que el control se alimentó sin ajustar el pH. Ambas CCM produjeron un voltaje similar alrededor de los 30 mV durante las primeras 200 h. Sin embargo, la CCM operada a pH 7 incrementó su producción de voltaje hasta 70 mV durante las 72 h posteriores. En el caso de la CCM de pH 6 el voltaje disminuyó alrededor de los 20 mV en el mismo periodo de tiempo, posterior a las 270 h de operación ambas CCM producían voltajes similares alrededor de los 20 mV (Figura 17d).



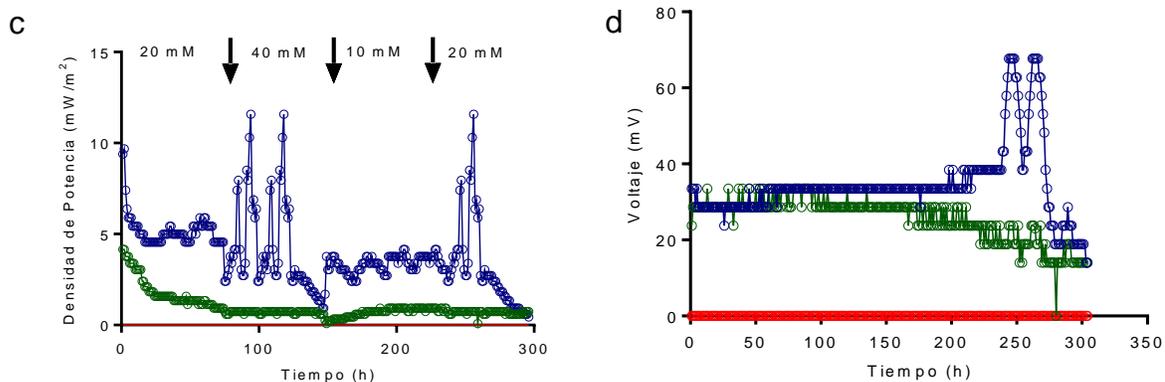


Figura 17. Efecto del pH, del tipo de sustrato y su concentración en CCM de doble cámara. a) Producción de electricidad a circuito abierto en función del tipo de sustrato y su concentración; b y c) Efecto de los cambios en la concentración del sustrato sobre la producción del voltaje y la densidad de potencia a circuito cerrado; d) Efecto del pH sobre la producción de voltaje en CCM de doble cámara alimentada con acetato de sodio. (En color azul se muestra la CCM alimentada con acetato y pH de 7, en color verde la CCM alimentada con glucosa y el pH 6 (d), en color rojo corresponde a la CCM control).

Resumiendo los resultados de los tres experimentos, la CCM operada con acetato de sodio presentó mayor producción de electricidad comparada con la CCM alimentada con glucosa, ya que el acetato es un compuesto que es más fácil de asimilar por bacterias electrogénicas, el voltaje máximo producido a circuito abierto fue de 400 mV vs 100 mV, respectivamente. Además, se observó un efecto de la concentración sobre el voltaje producido en la CCM alimentada con acetato de sodio, cuando se incrementó la concentración de 20 a 40 mM y de 10 a 20 mM. Sin embargo, ese aumento en la producción de voltaje no se mantuvo estable. Para el caso de la CCM alimentada con glucosa, no se observaron cambios considerables en el voltaje producido a diferentes concentraciones. La evaluación del efecto del valor de pH (de 6 y 7) indicó que durante 200h de operación no hubo una diferencia significativa en el voltaje obtenido, mientras que en las siguientes 72 horas fue mayor el voltaje en la CCM con pH de 7, comparado con el obtenido en la CCM con pH de 6 (Figura 17d).

Algunos estudios que concuerdan con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta investigación, referente a la mayor producción de voltaje con el acetato de sodio comparado con el voltaje obtenido con glucosa, indican que esto es debido a que las bacterias electroactivas metabolizan el acetato para convertirlo en acetil coenzima A, esto permite a estos microorganismos mejorar la obtención de NADH

por medio del ciclo de Krebs, NADH que a su vez participa como principal donador de electrones (Chaudhuri & Lovley, 2003; Kracke & Krömer, 2014; Kim et al., 2022).

Por otro lado, también se han identificado microorganismos capaces de metabolizar glucosa hasta producir bioelectricidad, tal es el caso de *Klebsiella* sp. ME17 (Xia et al., 2010). Con base en estos antecedentes y las diferencias observadas en la producción de bioelectricidad en CCM de doble cámara con ambos sustratos, podemos concluir que las biopelículas desarrolladas en cada una de las CCM son distintas en su composición microbiana, dando como resultado que el acetato favorece el enriquecimiento de consorcios microbianos electroactivos con mayor capacidad de producir bioelectricidad.

En comparación con la CCM de una cámara sin catalizador, la CCM de doble cámara sin catalizador mostró una mayor producción de bioelectricidad. Utilizando como sustrato acetato de sodio (20 mM) a pH 7 en la CCM de dos cámaras, se generó un voltaje alrededor de 130 mV (primeras horas de la corrida a circuito cerrado) (Figura 17b), mientras que en CCM de una sola cámara sin catalizador, utilizando el mismo inóculo, sustrato, concentración y pH, se produjo un voltaje máximo de 65 mV (Figura 13b). Es decir, la configuración de doble cámara produjo el doble de voltaje.

En el caso de la densidad de potencia, para la CCM de doble cámara se produjo una densidad de potencia máxima alrededor de 12 mW/m², mientras que con la CCM de una sola cámara la densidad de potencia máxima fue alrededor de 1.5 mW/m² (figura 17c y 13c). Esto significa que la configuración de cámara doble produjo aproximadamente 10 veces más densidad de potencia que la configuración de una sola cámara. Aunque en esta fase no fue posible hacer los estudios electroquímicos correspondientes, la bioelectricidad producida en esta configuración de CCM representa una buena razón para estudiar la ecología microbiana.

Posiblemente, las diferencias entre el potencial catódico de ambas CCM, afecta el enriquecimiento de la biopelícula anódica lo que generó un mayor voltaje en la CCM de doble cámara. Además, el ferrocianuro de potasio parece ser un mejor aceptor último de electrones lo que resulta en un mayor potencial redox en las CCM de una sola cámara sin catalizador y en consecuencia está generando una mayor densidad de potencia (Logan et al., 2006; Estrada-Arriaga et al., 2021).

Aguas residuales utilizadas como sustratos para la alimentación de CCM de una o dos cámaras

El valor de DQO_{total} determinado para la melaza fue de 593 g/L, seguido de la vinaza mezcatera con 77 g/L y por último la vinaza tequilera con 16.7 g/L. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores (Ramírez-Ramírez et al; 2021; Jedi et al., 2020). En la figura 18 se muestran los promedios de un duplicado de cada muestra. Diferentes porcentajes de dilución se aplicaron a los tres sustratos para obtener valores de DQO cercanos a 3 g/L. Una vez diluidos, todos los sustratos se ajustaron a un pH de 7 y se midió su conductividad que fue de 2160, 4835 y 1896 $\mu\text{s}/\text{cm}$, para la melaza, vinaza tequilera y mezcatera, respectivamente.

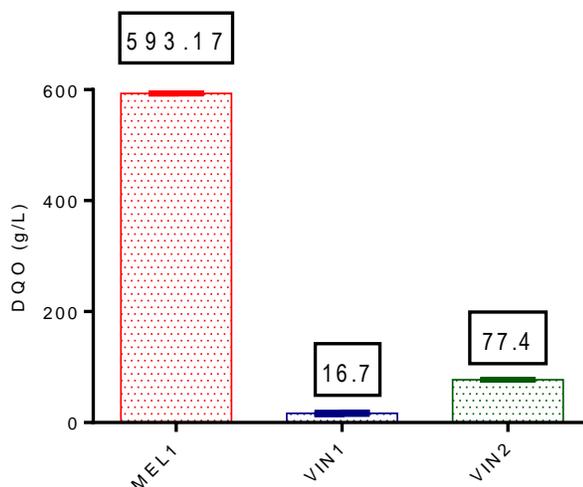


Figura 18. DQO total. Melaza (MEL1), vinaza tequilera (VIN1) y vinaza mezcatera (VIN2).

Producción de bioelectricidad en CCM de una sola cámara alimentada con melazas

Como complemento de la etapa uno de la investigación, en CCM de una sola cámara con catalizador, se evaluó la capacidad de la melaza de caña de azúcar para la producción de bioelectricidad. Dada la alta viscosidad de la melaza esta fue sedimentada y se tomó el sobrenadante para luego ser diluida en una proporción 1:99, melaza y agua desmineralizada, respectivamente, con una DQO final cercana a los 3 g/L. En el inicio de la corrida previo a la alimentación de las CCM con melaza y con el objetivo de observar la reproducibilidad del método de inoculación con lodos anaerobios, tres CCM de una cámara con catalizador fueron inoculadas con acetato de sodio (1 g/L o 12 mM), durante las primeras 200 h las tres CCM produjeron voltajes similares a

circuito abierto alcanzando un máximo alrededor de entre 400 y 250 mV durante las primeras 48 h (Figura 19a, sección 1).

Entre las 48 y las 200 h de la corrida las tres CCM tuvieron una producción similar alrededor de los 300 mV. Después de este periodo, una de las CCM se mantuvo con la misma solución de acetato de sodio y las dos CCM fueron vaciadas. La segunda CCM se realimentó con nueva solución de acetato de sodio y la tercera se alimentó con melaza pre tratada y diluida. La CCM que no fue realimentada mantuvo un voltaje alrededor de los 300 mV, la CCM realimentada con nueva solución de acetato de sodio alcanzó un voltaje a circuito abierto de casi 600 mV, mientras que la CCM realimentada con melaza alcanzó un voltaje a circuito abierto de 500 mV (Figura 19a, sección 2). Después de 380 h de operación a circuito abierto, todas las CCM fueron configuradas a circuito cerrado con una resistencia de 1000 Ω . Después de las 400 h, la CCM realimentada con acetato produjo un voltaje ligeramente mayor a la CCM alimentada con melaza, alrededor de 130 mV para el acetato de sodio y alrededor de 100 mV para la melaza. Por otro lado, en la CCM que no fue realimentada disminuyó la producción de voltaje alrededor de 10 mV, posiblemente debido al agotamiento del sustrato suministrado desde el inicio de la corrida (Figura 19a).

Se observó que la melaza al igual que el acetato de sodio, también produce bioelectricidad en cantidades similares, por lo que también puede funcionar como un modelo de sustrato para estudiar la dinámica poblacional de consorcios microbianos. Como más adelante se muestra en el análisis de microscopía electrónica de barrido, existen algunas evidencias que la biopelícula puede presentar algunas características diferentes a la biopelícula obtenida en la CCM realimentada con acetato de sodio.

Por otro lado, en cuanto a la densidad de potencia y potencia volumétrica, la CCM realimentada produjo una densidad de potencia máxima de 24 mW/m² y una potencia volumétrica alrededor de 900 mW/m³, mientras que la CCM realimentada con melaza produjo una densidad de potencia máxima de 18 mW/m² y una potencia volumétrica de alrededor de 700 mW/m³, esto en ambas CCM a las 420 h aproximadamente (Figura 19b).

Comparado con los experimentos que carecían de catalizador la CCM alimentada con acetato de sodio, la densidad de potencia y la potencia volumétrica aumentaron entre 10 y 30 veces ([figura 13c y d](#)). Sin embargo, comparado con otros autores la densidad de potencia producida en este estudio resulta ligeramente menor, probablemente por el uso de diferentes inóculo y tipos de sustratos. Por ejemplo, [Liu et al.](#), (2004) reportaron una CCM en condiciones similares con ánodo de grafito y cátodo de tela de carbón con Pt como catalizador, los autores encontraron que la densidad de potencia máxima producida fue de 26 mW/m² cuando la CCM fue alimentada con agua residual de una planta de tratamiento.

Recientemente, [Sirinutsomboon, B.](#) (2014) modeló una CCM de una sola cámara con el uso de melazas que predijo que el grosor de la biopelícula y DQO menores a 5000 g/L incrementan la producción de bioelectricidad en estos dispositivos, este antecedente sustenta el pre tratamiento de la melaza al diluirla y disminuir el DQO. Por otro lado, la densidad de potencia producida en este experimento resulta varios órdenes de magnitud menor comparados con los reportados por otros autores ([Zhang et al., 2009](#); [Mohanakrishna et al., 2010](#); [Zhang et al., 2013](#); [Sevda et al., 2013](#)). Estas diferencias se deben principalmente a las arquitecturas y tipo de CCM usadas en dichos estudios.

Cuando comparamos las tres CCM de este experimento encontramos diferencias entre las curvas de polarización, principalmente en aquellas que fueron realimentadas; el valor de la pendiente en la regresión lineal es ligeramente menor en la CCM realimentada con acetato de sodio que en la CCM realimentada con melazas, aun así, la diferencia es tan solo del 25 % lo que significa que aunque la producción de bioelectricidad es similar, la biopelícula podría ser distinta en ambos sistemas después de la realimentación ([Figura 19c](#)).

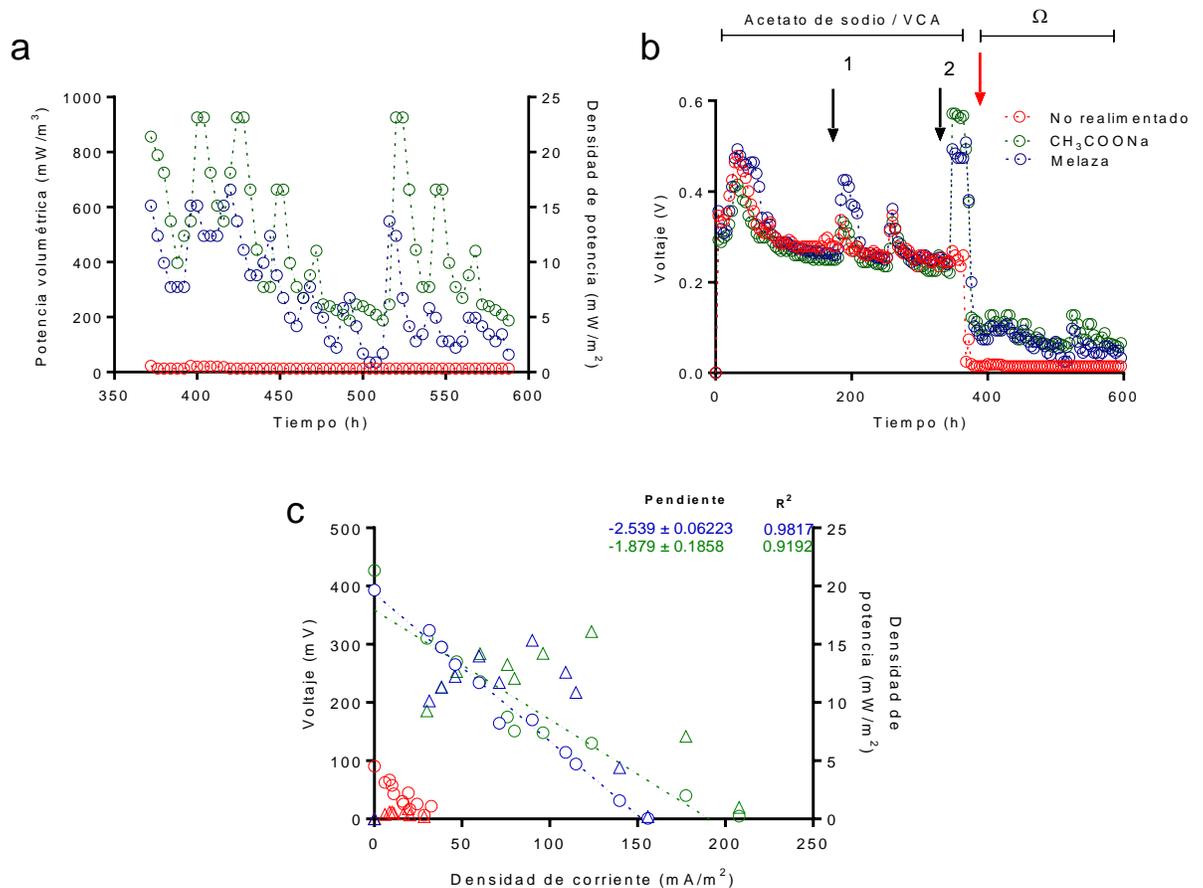


Figura 19. Producción de bioelectricidad usando melazas como sustrato. a) Voltaje a circuito abierto y cerrado con realimentación de melaza o acetato de sodio (colores azul y verde, respectivamente, después de las 400 h); b) Densidad de potencia y potencia volumétrica; c) Curvas de polarización. (El patrón de colores es el mismo a partir del circuito cerrado, mientras que los triángulos representan la densidad de potencia y los círculos el voltaje en 20c).

El análisis de microscopía electrónica de barrido (Figura 20) muestra una densidad y morfología celular similar en la superficie de los ánodos de las CCM realimentada con acetato de sodio (Figura 20b) y melazas (Figura 20a). Sin embargo, se observa un grosor mayor en la estructura de la biopelícula de la CCM realimentada con acetato de sodio (figura 20b), esto se puede asociar con las características de cada sustrato. En el caso del acetato de sodio, resulta más sencillo de asimilar por bacterias electrogénicas; y la melaza contiene algunos componentes que afectan el desarrollo de microorganismos, como por ejemplo algunos sólidos disueltos y melanoidinas (Palmonari et al., 2020). Además, se puede observar una delgada capa directamente adherida a la superficie del electrodo a diferencia de las imágenes que corresponden a

la CCM realimentada con melazas (figura 20d y f), lo que puede ser una capa exopolisacáridos, como sugieren algunos reportes (Zhang et al., 2011).

Comparada con otros autores, la biopelícula aquí mostrada no posee una diversidad de microorganismos aparentemente grande en función de la morfología, tal como las micrografías presentadas por Chung y Okabe (2009), quienes identificaron a los grupos de firmicutes y proteobacteria como la mayor población durante sus experimentos. En las micrografías de la figura 20, no pueden observarse pequeños filamentos denominados nano-cables reportados por otros autores como Zhang et al., 2008 e Ishii et al., 2008, debido a la capacidad del análisis y las características de la muestra, se obtuvo una resolución mayor a 5 μm , aunque el equipo podría llegar a resoluciones en el orden de nanómetros (nm).

Cuando se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio con los mostrados por Zhang et al., 2011, se puede asumir que la pequeña y delgada capa presente en la CCM realimentada con acetato de sodio (figura 20d, e y f) podría estar compuesta por exopolisacárido (EPS), producido por la propia biopelícula. En el modelo de estos autores también alimentan la CCM con acetato de sodio y asocian positivamente una mayor producción de bioelectricidad con la cantidad de EPS.

En esta fase del estudio se determinó que la melaza puede generar bioelectricidad en CCM de una sola cámara con catalizador, que el sistema de inoculación y las características de las CCM son reproducibles bajo condiciones similares, y que los análisis de SEM son útiles en la caracterización de la densidad y estructura de la biopelícula. Sin embargo, resultan necesarios análisis de abundancia y diversidad microbiana para poder observar cambios en su composición, bajo diferentes condiciones, así como análisis de EIS para la descripción de procesos de difusión de especies químicas de interés.

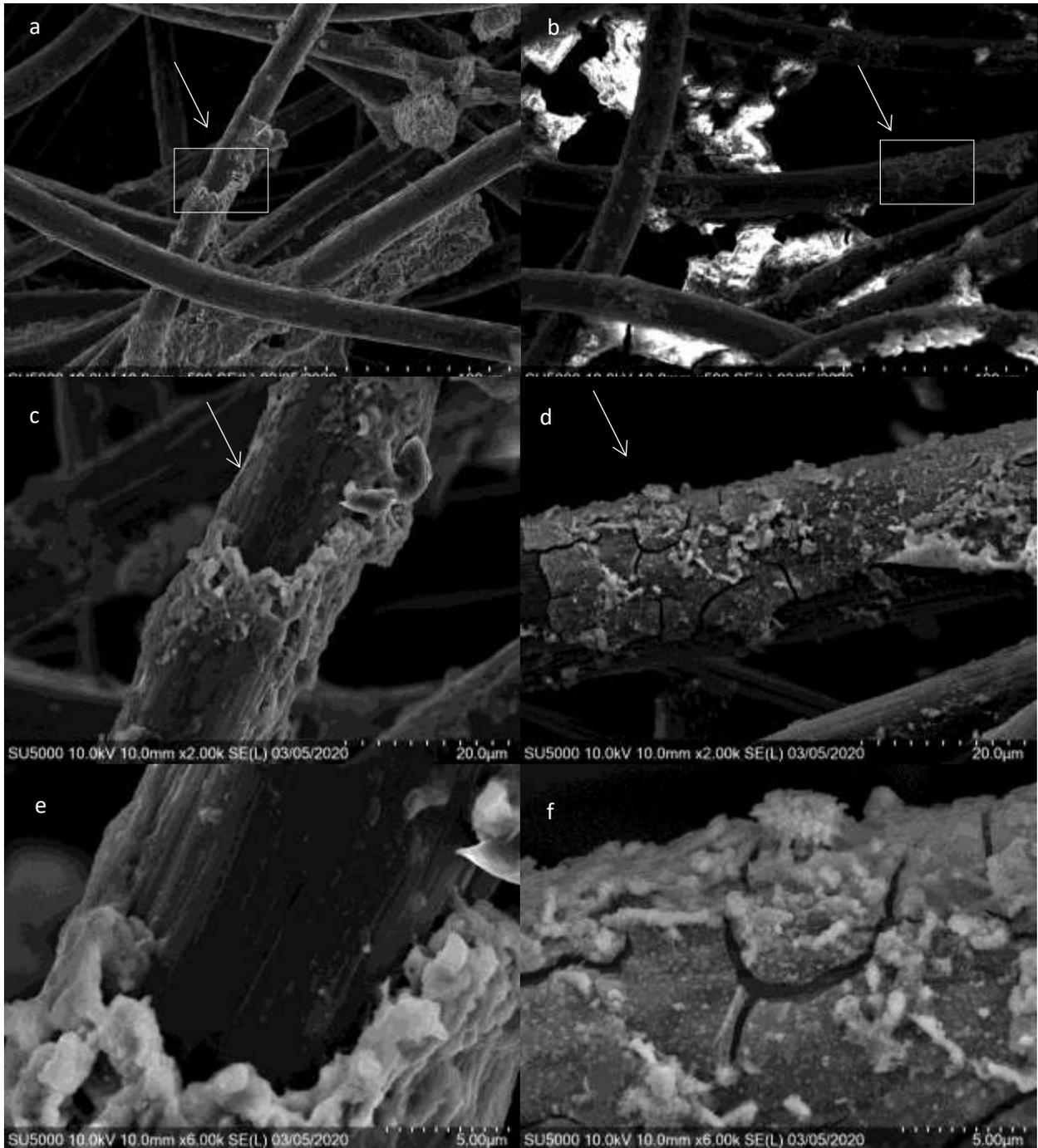


Figura 20. Análisis de microscopía electrónica de barrido; b, d y f) Se muestran fragmentos de ánodos de CCM realimentadas con acetato de sodio; a, c y e) Fragmentos de ánodos de CCM realimentadas con melazas. Los cuadros y flechas blancas presentan los sitios de magnificación.

Producción de bioelectricidad a partir del tratamiento vinazas y melazas en CCM de dos cámaras

Tres CCM de doble cámara se inocularon con 500 mg de lodos granulares anaerobios y en la zona catódica se adicionó ferrocianuro de potasio 100 mM como católito. En las zonas anódicas se suministraron como sustrato melaza, vinaza tequilera o vinaza mezcalera diluidas hasta un valor de DQO similar en las tres CCM, alrededor de 3 g/L. El voltaje máximo producido a circuito abierto fue entre 500 y 600 mV durante un periodo de 300 h. Posteriormente, se cerró el circuito con una resistencia externa de 1000Ω. El seguimiento de la producción de voltaje a circuito cerrado se realizó en seis ciclos de operación con un análisis de EIS.

El ciclo C0 se presentó desde la hora 0 hasta las 180 h, operado a circuito cerrado. Durante éste ciclo se permitió el desarrollo de la biopelícula y solo se dio seguimiento al voltaje. La vinaza mezcalera mostró un voltaje alrededor de 50 mv a las 100 h que fue más alto respecto a la melaza y vinaza tequilera, ambas CCM presentaron un voltaje similar, entre 10 y 15 mV. Cuando se observó un decremento sustancial en el voltaje, se sustituyó el sustrato por uno nuevo, la [Figura 21](#) se señala los recambios de sustrato por flechas verticales en color negro. En el ciclo 0 no se realizaron pruebas electroquímicas ya que se consideró que en esta fase la biopelícula necesita desarrollarse y particularmente las bacterias electroactivas.

El ciclo C1 se presentó desde las 180 h hasta las 280 h. Después del recambio de sustratos, se observó un incremento en el voltaje en todas las CCM al cabo de algunas horas. La vinaza mezcalera produjo el mayor voltaje de 108 mV. Mientras que la melaza y la vinaza tequilera, que produjeron 80 y 50 mV, respectivamente ([figura 21](#)). Los valores de voltaje más altos para los tres sustratos se lograron alrededor de 45 h después del arranque del ciclo C1. Todas las pruebas electroquímicas se realizaron alrededor de 6 horas después del recambio de sustrato, con una duración aproximada de 30 minutos tanto para curvas de polarización o EIS. Los resultados de las pruebas electroquímicas y su interpretación se presentan más adelante. La [figura 21](#) muestra el recambio de sustrato pero también la hora aproximada de la aplicación de la prueba electroquímica (aproximadamente 6 h después del recambio de sustrato) para cada ciclo: C1 (200 h), C2 (300 h) y C3 (400 h).

Después del recambio de los sustratos para el inicio del ciclo C2, nuevamente se observó un incremento en el voltaje de todas las CCM. Sin embargo, en éste ciclo la vinaza tequilera produjo un voltaje ligeramente mayor que los obtenidos con los otros dos sustratos, de 110 mV. Mientras que la melaza produjo 100 mV y la vinaza mezcalera 80 mV. Se obtuvieron las curvas de polarización y los análisis de EIS alrededor de las 300 h (unas 6 h desde el arranque del ciclo C2), con una duración de unos 30 min cada una.

En el ciclo 3 (C3), los voltajes producidos fueron similares en todas las CCM cerca de las 400 h y en la mayor parte del ciclo. Sin embargo, la vinaza tequilera alcanzó un voltaje máximo de 160 mV, mientras que el resto de las CCM alrededor de 140 mV (figura 21). Las pruebas electroquímicas se realizaron con regularidad 6 h después del inicio del ciclo.

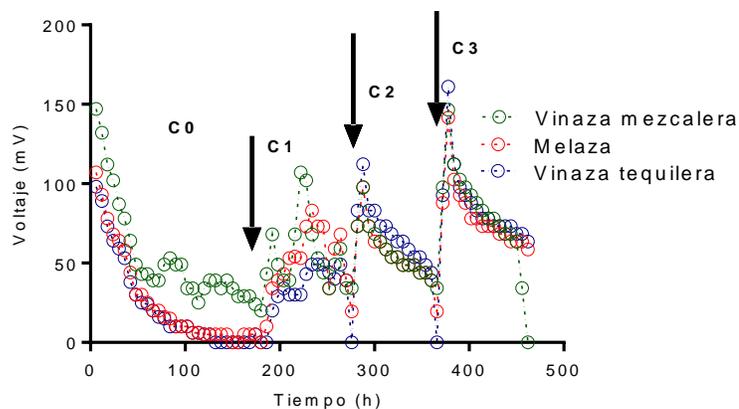


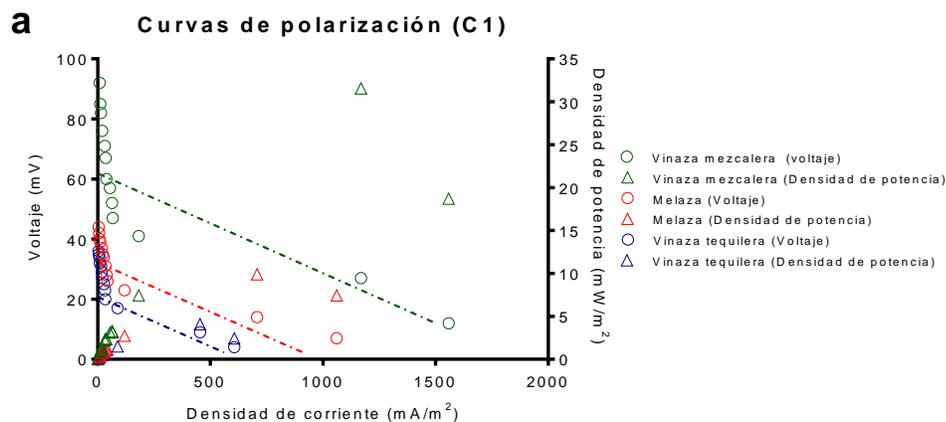
Figura 21. Producción de voltaje a circuito cerrado en CCM de dos cámaras. a) voltaje de los ciclos C1, C2 y C3; b) Producción de voltaje durante los ciclos C1-C6 (se tomaron los tres valores consecutivos más altos de cada CCM en los ciclos C1-C6).

En la [Figura 22a](#), la curva de polarización/potencia del ciclo C1 muestra que el reactor alimentado con la vinaza mezcalera presentó rendimiento más alto en la densidad de potencia con un valor cercano a los 30 mW/m² y un voltaje de 27 mV, en comparación con los reactores alimentados con los otros sustratos. Estos datos coinciden con los datos de del ciclo C0 donde también este sustrato produjo el voltaje más alto ([Figura 21](#)). En las pruebas de EIS, la gráfica de Nyquist muestra diferencias entre los valores de impedancia a bajas frecuencias ([Figura 22b](#), EIS) identificado como elemento Warburg, que se ha visto están asociadas a efectos de difusión, por ejemplo, difusión de oxígeno

en cátodos aireados (en este estudio no aplica ya que se utilizó ferrocianuro de potasio como católito) o con fenómenos de hidrofobicidad en el ánodo (Sekar y Ramasamy, 2013).

En la ampliación de la prueba de EIS-C1, se observa que el valor correspondiente a la resistencia del electrolito R_S (valor de resistencia en Z' desde 0 hasta el primer punto de la curva, se observa en la Figura 22c, EIS-C1 ampliación) es menor para la vinaza tequilera en comparación con la R_S de los otros sustratos la cual es similar. Sin embargo, el reactor alimentado con vinaza tequilera presenta el mayor valor de resistencia de transferencia de carga R_{CT} (valor en Z' del diámetro del semicírculo; Figura 22c, EIS ampliación), lo cual concuerda con su bajo rendimiento en las curvas polarización/potencia en esta etapa.

La CCM alimentada con vinaza mezcalera no presenta ningún semicírculo observable antes del comportamiento lineal de curva asociado al elemento Warburg, en este caso asumimos que el valor de R_{CT} es pequeño debido a que presentó el mejor rendimiento en el histograma de voltaje (Figura 21) y en las curvas de polarización a pesar de que R_S es mayor al de la vinaza tequilera y similar al de la melaza durante esta etapa (Figura 22c, EIS-C1 ampliación). Es decir, el voltaje más alto producido es efecto de la menor resistencia de transferencia de carga observada tanto en las curvas de polarización como en el valor de R_{CT} en la gráfica de Nyquist que puede deberse a un enriquecimiento de los consorcios electrogénicos en la biopelícula.



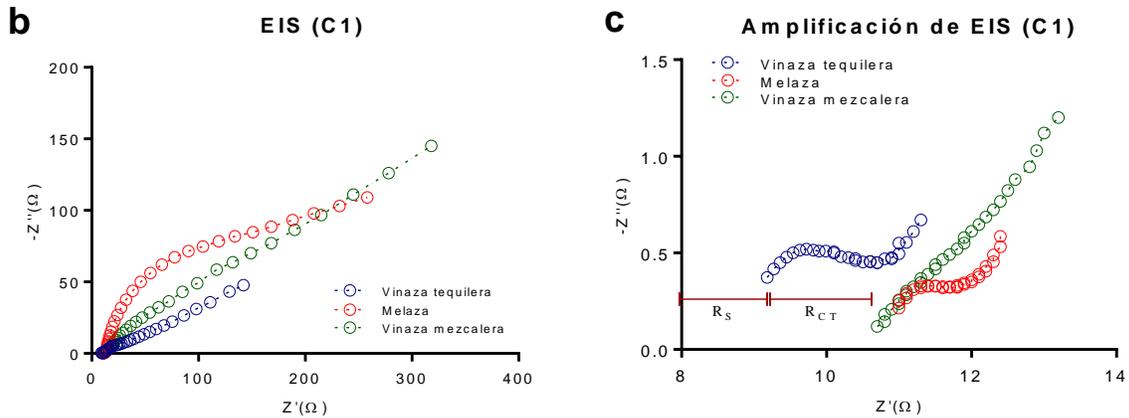


Figura 22. Pruebas electroquímicas el ciclo C1 (180-280 h). a) Curva de polarización; b) Gráfica de Nyquist; c) Amplificación de la región de altas frecuencias en b.

En los ciclos C2 y C3, las curvas de polarización mostraron una mejora en el rendimiento del reactor alimentado con vinazas tequileras produciendo una densidad de potencia máxima alrededor de 60 mW/m^2 cuando el voltaje fue de 40 mV para ambos casos (Figura 23a y Figura 24a); esta mejora en el rendimiento concuerda con el voltaje producido durante el ciclo C2 y al inicio del ciclo C3 (Figura 21). Mientras que el reactor alimentado con vinaza mezcalera produjo una D_p de 40 mW/m^2 en ambas etapas y las melazas produjeron una D_p alrededor de las 25 mW/m^2 , ambas con un voltaje alrededor de los 20 mV . Esto se puede atribuir a los cambios en la composición microbiana durante el experimento, lo que supone que los consorcios electrogénicos aumentaron su presencia en la biopelícula alimentada con vinaza tequilera.

En las pruebas de EIS, se observaron diferencias en las impedancias a bajas frecuencias, sin embargo a altas frecuencias, en el ciclo C3 se observó la formación de un semicírculo en el reactor alimentado con vinaza mezcalera así como una disminución en el valor de R_s (figura 23c y figura 24c), efecto que concuerda con el voltaje observado hacia el final del ciclo C3, donde el voltaje es ligeramente mayor en el reactor alimentado con vinaza mezcalera (figura 21). Es decir, una disminución en R_s se relaciona con un incremento en el voltaje y a densidad de potencia producidas. Respecto al reactor alimentado con melaza, no se presentaron grandes cambios durante las pruebas electroquímicas, por lo tanto, tuvo un rendimiento bajo comparado al de ambas vinazas, las cuales presentaron los valores de R_s durante el ciclo C3.

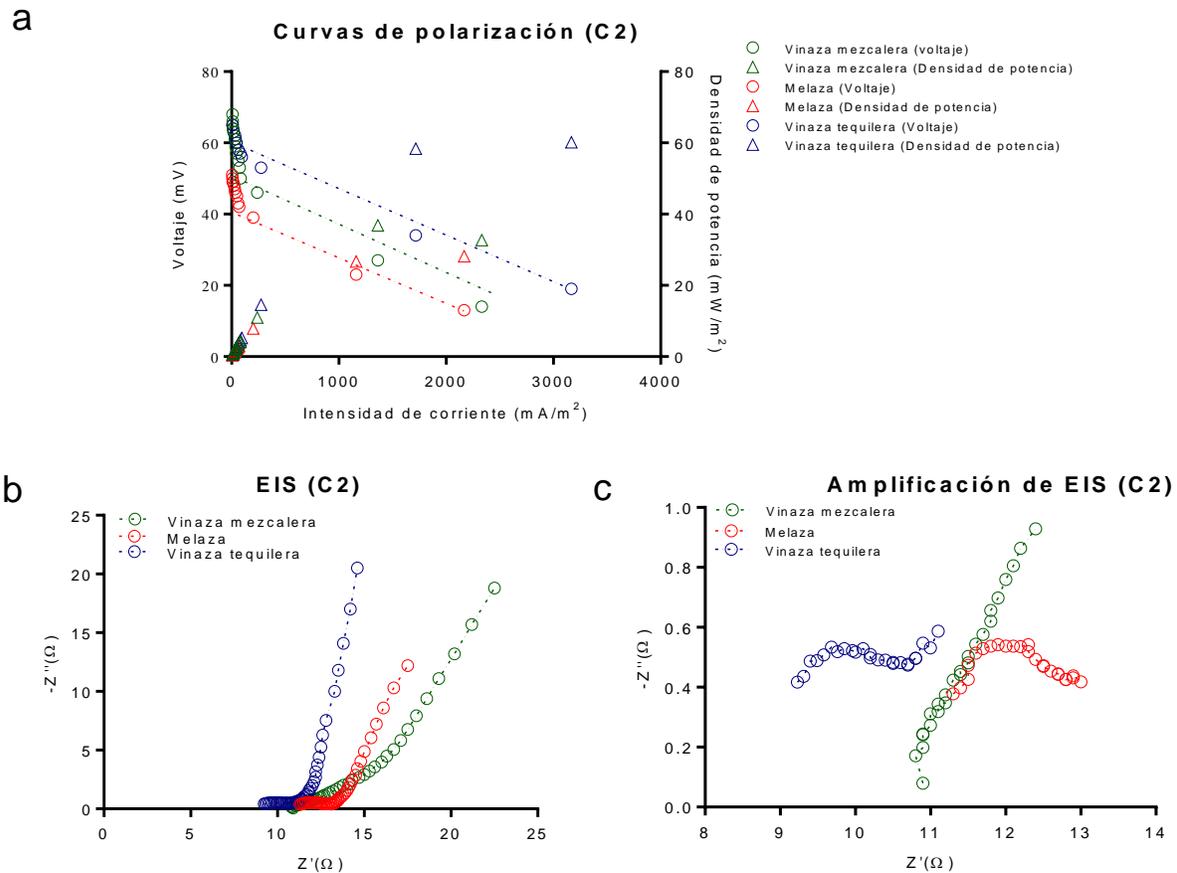


Figura 23. Pruebas electroquímicas del ciclo C2 (380-480h). a) Curva de polarización; b) Gráfica de Nyquist; c) Ampliación de la región de altas frecuencias en b.

Con el objetivo de describir el comportamiento de las CCM de dos cámaras alimentadas con melaza y vinazas (datos mostrados anteriormente), se extendió la corrida por tres ciclos adicionales (C4, C5 y C6), en los cuáles se analizaron los elementos capacitivos, Warburg y resistencias internas con un modelado de circuitos equivalentes. Además, se cambiaron los catolitos al mismo tiempo que los sustratos, para disminuir el efecto del cátodo sobre la producción de electricidad; es decir, para controlar variables como el pH y el cambio de concentración del ferrocianuro de potasio.

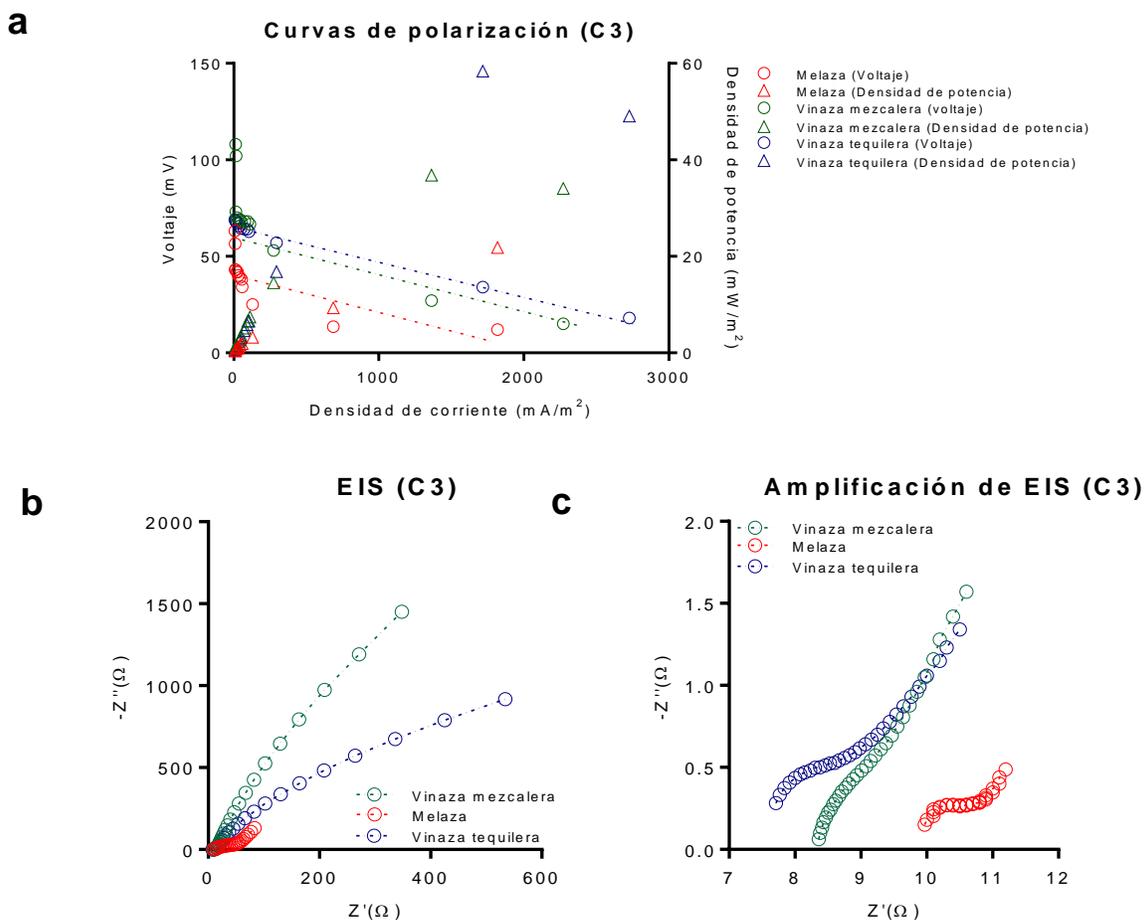


Figura 24. Pruebas electroquímicas del ciclo C3 (280-380h). a) Curva de polarización; b) Gráfica de Nyquist; c) Ampliación de la región de altas frecuencias en b para el ciclo C3.

La [Figura 25a](#) muestra el voltaje producido durante el ciclo C4 en modo circuito cerrado con una resistencia de 1000 Ω. Se observa un incremento en el voltaje durante las primeras horas en las tres CCM entre los 90 y 120 mV. Durante las primeras 20 horas de este ciclo, el voltaje de los tres CCM disminuyó alrededor del 80 %. Sin embargo, este efecto fue más evidente en la CCM alimentada con vinaza tequilera que produjo los voltajes menores durante las siguientes 60 h, entre 0 y 15 mV. La caída de voltaje en la CCM alimentada con vinaza tequilera, que presentó el mayor voltaje durante las primeras horas, se atribuye a un supuesto agotamiento del sustrato más rápido que en las otras dos CCM. En el caso de las CCM alimentadas con vinaza mezcaleras o melazas se observó un comportamiento similar, produciendo voltajes entre 5 y 25 mV, en el mismo periodo de tiempo.

En las Figuras 25b y 25c se muestran los espectros del análisis de EIS, el cual se obtuvo justo después de los picos más altos de voltaje. En la figura 25b se observa el espectro completo, mientras que en la figura 25c se observa una amplificación de las curvas en la zona de altas frecuencias.

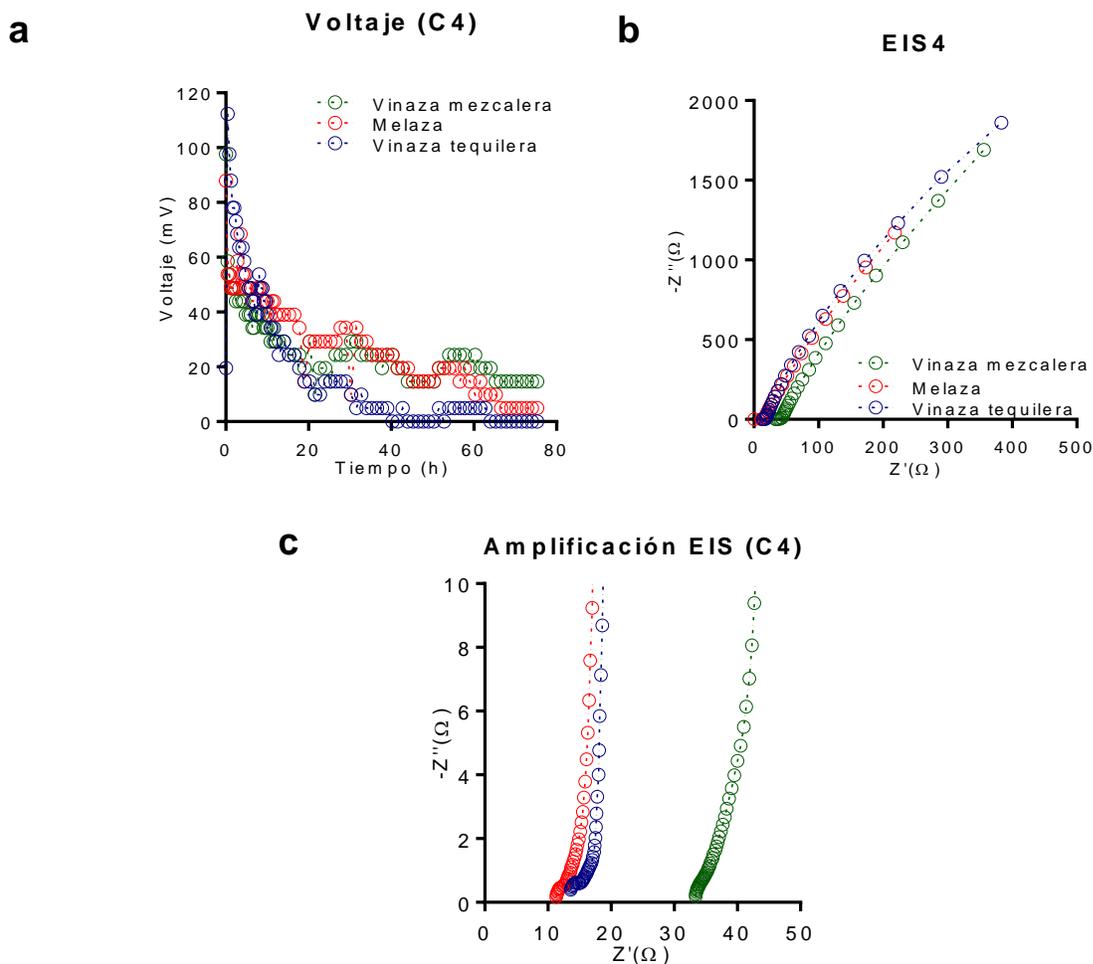


Figura 25. Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C4 (380-480h). a) voltaje del ciclo C4; b) Gráfica de Nyquist; c) Ampliación de la región de altas frecuencias en b para el ciclo C4.

La Figura 26a muestra el voltaje producido durante el ciclo C5 en modo de circuito cerrado, se produjo un incremento en el voltaje durante las primeras horas en las CCM alimentadas con vinazas tequileras y mezcaleras entre 90 y 110 mV. Sin embargo, ese incremento no fue tan notorio para la CCM alimentada con melazas, la cual alcanzó un voltaje de 50 mV. Durante las primeras 15 horas de este ciclo, el voltaje de las tres CCM disminuyó entre 60 y 70 %, alrededor de 15 % menos que el ciclo anterior y 5 h más rápido. Este efecto fue menos apreciable en la CCM alimentada con vinaza mezcalera

que produjo los voltajes más altos durante las siguientes 20 h, entre 20-40 mV. La posible causa se atribuye a las pruebas electroquímicas que se hicieron después de 6 h del comienzo de este ciclo y pudieron afectar el metabolismo y la composición de las biopelículas, en particular de los microorganismos electrogénicos.

En el caso de las CCM alimentadas con vinaza tequileras o melazas, presentaron un comportamiento similar, produciendo voltajes alrededor de los 20 mV durante las siguientes 20 h, no se produjo ningún voltaje después de las 30 h de operación. En las Figuras 26b y 26c se muestran las gráficas Nyquist del análisis de EIS, en la Figura 26b se observa espectro completo mientras que la Figura 26c se observa una amplificación de las curvas en altas frecuencias.

Los resultados del ciclo C6 se muestran en la Figura 27. La Figura 27a muestra la producción de voltaje a circuito cerrado. En este ciclo, la CCM alimentada con vinaza mezcalera presentó el voltaje más alto durante las primeras horas del presente ciclo. Mientras que las CCM alimentadas con vinaza tequileras y melazas produjeron un voltaje de 60-80 mV como máximo durante las primeras 5 horas ya que posterior a eso se realizaron las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Después de las primeras 10 h el voltaje disminuyó hasta 20-40 mV en las tres CCM y se mantuvo por unas 30 h. Posteriormente, el voltaje disminuyó de manera similar en las CCM alimentadas con melaza y vinaza mezcalera, mientras que la CCM alimentada con vinaza tequileras se mantuvo alrededor de los 30 mV durante el resto de la corrida.

Las CCM alimentadas con vinaza tequileras y con melaza presentaron un incremento de aproximadamente 5 Ω en las resistencias de solución R_s , en comparación con el ciclo anterior, alrededor de los 15-18 Ω . Mientras que la CCM alimentada con vinaza mezcalera presenta una resistencia de solución muy similar a la del ciclo anterior. La vinaza mezcalera presentó mejores capacidades de producir voltaje durante este ciclo.

En las Figuras 27b y 27c, se muestran las gráficas de Nyquist correspondientes al ciclo C6 en el tratamiento de vinazas y melaza en CCM de doble cámara. Sin embargo, debido al tamaño de los semicírculos de altas frecuencias, se complica determinar la resistencia de transferencia de carga con un análisis gráfico.

Las CCM alimentadas con vinaza tequilera y con melaza presentan resistencias de solución similares (R_s), entre 11 y 13 Ω (Figura 25c), mientras que la CCM alimentada con vinaza mezcalera presenta la mayor resistencia de solución con aproximadamente 33 Ω . Las resistencias R_s de la vinaza tequilera y melaza fueron similares durante los ciclos C4, C5 y C6 (figura 25c, 26c y 27c). Sin embargo, la resistencia R_s de la CCM alimentada con vinaza mezcalera se redujo considerablemente. Lo que explica la mejora en el rendimiento de la CCM alimentada con vinaza mezcalera hacia el final de ciclo C6 en comparación con los ciclos anteriores.

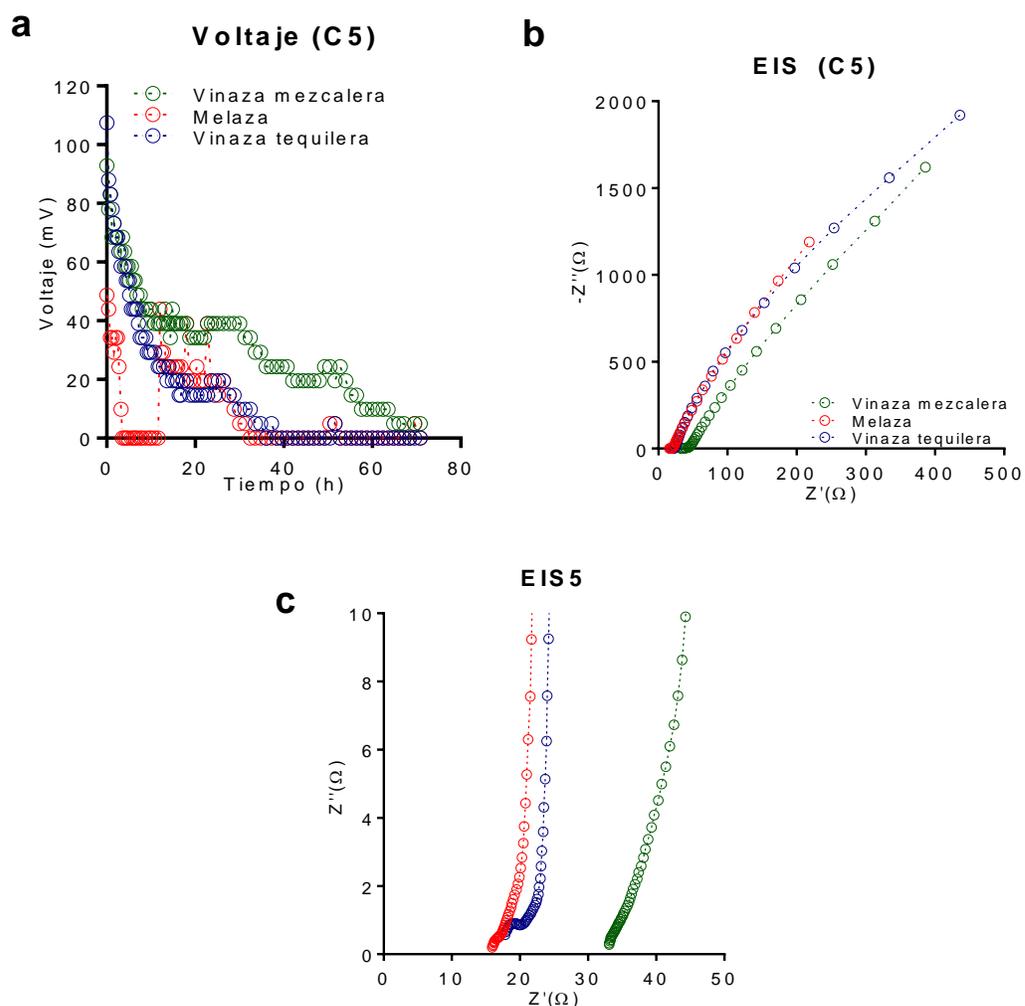


Figura 26. Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C5 (480-580h). a) voltaje del ciclo C5; b) Gráfica de Nyquist; c) Ampliación de la región de altas frecuencias en b para el ciclo C5.

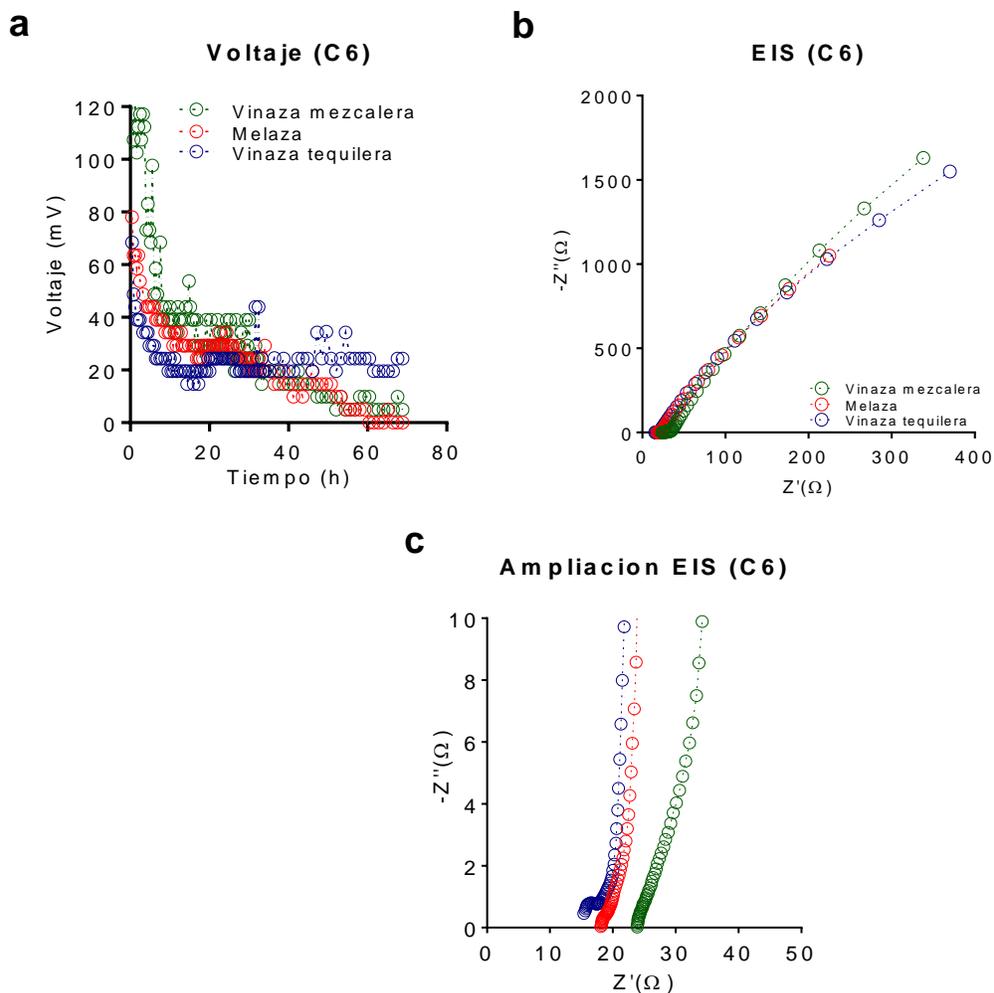


Figura 27. Voltaje y pruebas electroquímicas del ciclo C6 (580-680h). a) voltaje del ciclo C6; b) Gráfica de Nyquist; c) Ampliación de la región de altas frecuencias en b para el ciclo C6.

Se observó una disminución en la resistencia de la solución de la vinaza tequilera, gráficamente se observa un desplazamiento hacia la izquierda (origen) de la curva correspondiente a la CCM alimentada con las vinazas tequileras respecto a los ciclos anteriores. Además, esto coincide con algunos reportes dónde tanto el tamaño del semicírculo y la longitud de la parte lineal de la curva se asocia al valor de la resistencia interna, es decir a mayor tamaño del semicírculo y menor longitud de la parte lineal, la resistencia de la CCM deberá ser mayor y por lo tanto más ineficiente (Herrera-Hernández *et al.*, 2019).

Los picos de densidad de potencia más altos fueron producidos por las vinazas tequilera durante las primeras horas de los ciclos C4 y C5, y por la vinaza mezcalera en el ciclo C6 (Figura 28). Estos ciclos del experimento se analizaron por separado, ya que las

condiciones del catolito fueron distintas en cuanto a tiempo de residencia y pH, respecto a los ciclos anteriores.

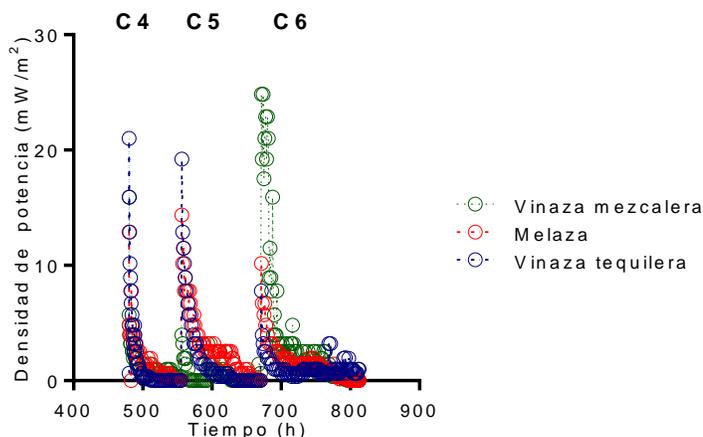


Figura 28 Densidad de potencia. Densidad de potencia producida durante el tratamiento de vinazas y melazas en CCM de dos cámaras en los ciclos C4-C6.

La [Figura 29a](#) muestra los voltajes consecutivos más altos para los ciclos de operación C1-C6. Un análisis estadístico mostró que las CCM alimentadas con vinazas tequileras y mezcateras produjeron un voltaje significativamente mayor que la CCM alimentada con melaza durante toda la corrida, esto se hizo comparando los valores medios de cada ciclo entre todas las CCM ([anexo 10](#)). Durante los primeros tres ciclos donde no hubo un recambio del catolito cada ciclo, solo se encontró una diferencia significativa en el ciclo C1, mientras que en los ciclo C2 y C3 los valores medios fueron similares entre las tres CCM. Por otro lado, en los ciclos C4, C5 y C6 se observó que ambas vinazas produjeron un voltaje significativamente mayor en comparación con la CCM alimentada con melaza ([Figura 29a](#)). En esta sección de ciclos (C1, C2 y C3) se puede resumir que el voltaje fue similar durante los ciclos mientras que las diferencias se observan a partir del ciclo C4 ya que el catolito se comenzó a cambiarse regularmente cada ciclo.

En los ciclos C4-C6 se observó una disminución en el voltaje en todas las CCM respecto al ciclo C3 (anterior) y posterior al recambio del ferrocianuro de potasio ([Figura 29a](#)). Sin embargo, la CCM que más rápido recuperó el voltaje producido fue la CCM alimentada con vinaza mezcatera, posteriormente en la CCM alimentada con vinaza tequilera y al final la CCM alimentada con melaza. Las CCM que resistieron a la disminución de voltaje fueron las CCM alimentadas con ambas vinazas las cuales mostraron también una

disminución en los valores de las resistencias R_s . Otra posible explicación de ésta disminución de voltaje se puede asociar un decremento del potencial catódico como efecto del recambio del catolito, la concentración de protones en el catolito disminuye al con cada recambio el cual se puede asumir como un cambio en el pH (datos no colectados). Finalmente, la CCM alimentada con vinaza tequilera que mostró las mejores características como sustrato alimentado a las CCM durante los ciclos C4 y C5, así como la CCM alimentada con vinaza mezcalera que lentamente produjo el mayor voltaje de las tres CCM durante el ciclo C6 (Figura 29a).

Por otro lado, para identificar si hubo una diferencia significativa entre las densidades de potencia producidas en las tres CCM, se realizó un análisis estadístico en el cual se tomaron los tres datos consecutivos de las densidades de potencia más altas en los ciclos C4, C5 y C6, los datos se analizaron con una prueba de Tukey con un valor de $\alpha=0.05$ (Anexo 6), los tiempos que se tomaron fueron a las 480 h, 570 h y 670 h. Durante el ciclo C4 la CCM alimentada con vinaza tequilera presentó una densidad de potencia significativamente mayor en comparación con las densidades obtenidas en las CCM alimentadas con melaza y vinaza mezcalera, mientras que entre las CCM alimentadas con melaza y vinaza mezcalera no se encontró una diferencia significativa. En el ciclo C5, la densidad de potencia obtenida en la CCM alimentada con vinaza tequilera fue significativamente mayor a la densidad de potencia de la melaza y similar a la producida por la CCM alimentada con vinaza mezcalera. En el ciclo C6, la CCM alimentada con la vinaza mezcalera presentó una densidad de potencias significativamente mayor respecto a las CCM alimentadas con melaza y vinaza tequilera entre las cuales no se encontró ninguna diferencia significativa (Figura 29b).

En la CCM alimentada con vinaza de tequilera se obtuvieron densidades de potencia similares en el los ciclos C4 y C5, pero fue significativamente menores que en el ciclo 6. En la CCM alimentadas con vinaza mezcalera se obtuvieron densidades de potencia diferentes en cada ciclo, se observó un incremento gradual en cada ciclo, la mayor densidad de potencia se obtuvo en el ciclo C6, que fue significativamente mayor que las densidades de potencia de las demás CCM obtenidas en los ciclos anteriores. Sin embargo, las densidades de potencia producida por la CCM alimentadas con vinaza

mezcalera fueron significativamente menores a las de la CCM alimentada con vinaza tequilera en los ciclos C4 y C5.

La densidad de potencia en la CCM alimentada con melaza fue similar en los ciclos C4 y C6, y la menor de todas las densidades en el ciclo C5. La densidad de potencia en la CCM alimentada con melaza durante el ciclo C4 fue significativamente menor que la obtenida en la CCM alimentada con vinaza de tequilera y similar a la determinada en la CCM alimentada con vinaza mezcalera. La densidad en la CCM con melaza durante el C5 fue significativamente menor que las obtenidas en las CCM con vinaza tequilera y vinaza mezcalera. La densidad de potencia en la CCM alimentada con melaza durante el ciclo C6 fue significativamente menor que la obtenida en la CCM con vinaza mezcalera. Los datos fueron calculados por el promedio de los tres datos consecutivos más altos que corresponden a los tiempos en los cuales se realizaron las pruebas electroquímicas (EIS).

El análisis muestra que aunque la proporcionalidad entre voltaje y densidad de potencia cambia por el promedio calculado, los valores de las densidades de potencia muestran diferencias significativas cuando se comparan con el voltaje producido (Figura 29a). Por lo tanto, podemos asumir que el mejor sustrato fueron ambas vinazas entre las cuales no hubo una diferencia significativa, pero si lo fue cuando ambas vinazas fueron comparadas con la melaza, la cual mostró el rendimiento más bajo de las tres CCM.

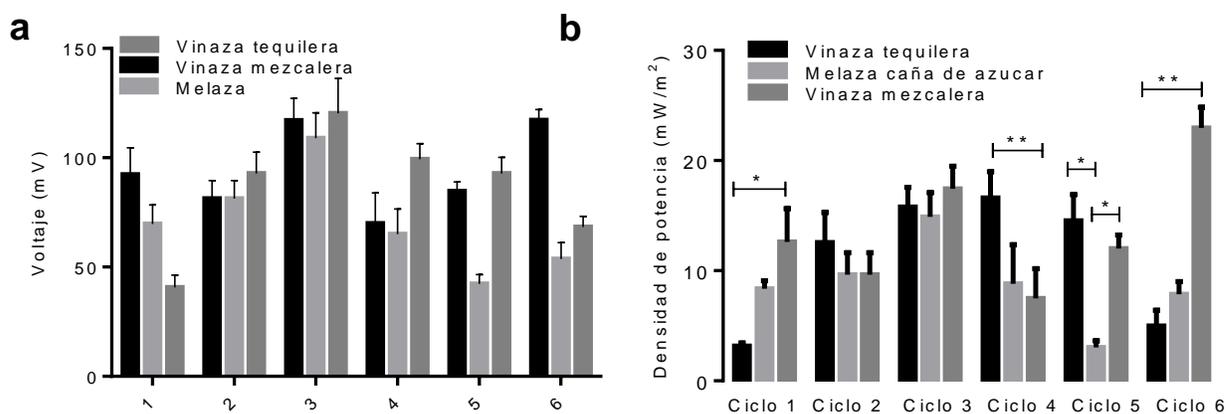


Figura 29. Voltaje y densidad de potencia máximos producidos en CCM de dos cámaras. a) Voltaje de los ciclos C1-C6; b) Densidad de potencia de los ciclos C1-C6.

En la [Tabla 8](#) se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la presente investigación en relación a las variables de operación de las CCM y la densidad de potencia producida. Además se comparan los resultados obtenidos con los reportados otros autores en condiciones similares.

Tabla 8. Resumen de resultados en este estudio respecto al rendimiento de las CCM

Configuración	Catalizador	Sustrato	Inóculo	DQO _R	EC	Dp (mW/m ²)	Referencia
Una cámara	Sin catalizador	Acetato	Lodos anaerobios	79.8	40	1.8	Presente estudio
Una cámara	Sin catalizador	Acetato	Sedimentos	81.4	28	1.4	Presente estudio
Dos cámaras	NA	Acetato	Lodos anaerobios	ND	ND	12.5	Presente estudio
Dos cámaras	NA	Glucosa	Lodos anaerobios	ND	ND	1.5	Presente estudio
Una cámara	Pt/C	Acetato	Lodos anaerobios	ND	ND	23.2	Presente estudio
Una cámara	Pt/C	Melaza	Lodos anaerobios	ND	ND	16.6	Presente estudio
Dos cámaras	NA	Melaza	Lodos anaerobios	48.8	6.1	14.3	Presente estudio
Dos cámaras	NA	Vinaza t	Lodos anaerobios	49.3	8.7	21.1	Presente estudio
Dos cámaras	NA	Vinaza M	Lodos anaerobios	52.2	8.95	24.8	Presente estudio
Dos cámaras	NR	Vinaza M	Lodos planta trata.	83	NR	80 W/m ³	López-Velarde et al., 2017
Una cámara	NR	Melaza	Lodos anaerobios	88	NR	7.5	Lee et al., 2016
Dos cámaras	NA	Melaza	Lodos anaerobios	50	NR	17	Lee et al., 2016
Una cámara	NR	Melaza	Lodos anaerobios	90	NR	7.9	Lee et al., 2016
Stack	APV	Melaza	Lodos activados	74-91	NR	16.1	Wu et al., 2017
Dos cámaras	NA	Melaza	NR	85	NR	3.28 W/m ³	Yang et al., 2022
Dos cámaras	Ag ⁺	Melaza	Lodos activados	81	8.5	65	Zhang et al., 2013

Pt/C, Platino y carbono; NA, No aplica; NR, No reportado; ND, No determinado; APV, alcohol polivinílico

Debido al pequeño tamaño de los semicírculos de altas frecuencias en los gráficos de Nyquist, se complica determinar la resistencia de transferencia de carga con un análisis gráfico de EIS (descrito anteriormente). Por lo tanto, se presentan estos datos calculados con un ajuste de un modelo de circuitos equivalentes R (Q (RW)) para los valores de resistencias y los valores asociados con procesos capacitivos (CPE) y de difusión (W).

Mediante un análisis de modelado por circuitos equivalentes de las pruebas de EIS, se determinaron los valores de R1, resistencia óhmica; R2, resistencia de transferencia de carga; Q2, elementos de fase constante y W2, elementos Warburg de acuerdo con los resultados publicados por Sanduja 2016. De acuerdo con lo reportado por [Sindhuja et al. \(2016\)](#), el valor de R1 representa la resistencia óhmica e indica la resistencia producida

por las soluciones (anolito y catolito) y por el transporte de protones a través de la membrana, por lo tanto se ve afectada por su ensuciamiento de la membrana.

Por otro lado, R_2 representa las resistencias de transferencia de carga anódica y catódica, además, este valor es inversamente proporcional a las velocidades de reacción producidas en sus respectivas cámaras, por lo tanto un valor pequeño significa un mayor potencial redox lo que se traduce a un mayor voltaje. Q_2 , representa las capacitancias de la doble capa eléctrica correspondientes a las interfaces cátodo/catolito y ánodo/anolito, por lo tanto valores altos de Q_2 significa energía desaprovechada para producir corriente eléctrica en la CCM. Finalmente, W_2 se asocia a los procesos de difusión a través de la superficie de los electrodos, es decir, valores altos podrían deberse a la acumulación de iones y/o electrones sobre la superficie de los electrodos.

En la [Tabla 9](#) se muestran los valores obtenidos por el modelado de circuitos equivalentes con el modelo R (Q (RW)). En términos generales, se observó un incremento en R_1 conforme avanzaba el número de ciclos en todas las CCM, lo que significa que la resistencia por parte de los electrolitos aumenta por la generación de electrones y protones que atraviesan la MIP. De manera conjunta los valores de R_2 mostraron un decremento en el transcurso de los ciclos de operación C4 y C6, esto se explica cómo un incremento del potencial redox producido por la generación de electrones por parte de la biopelícula y el poder reductor del ferrocianuro de potasio.

Por otra parte, Q_2 disminuyó para el ciclo C5 pero incrementa en el ciclo C6, lo que podría asociarse al desarrollo de nuevos consorcios microbianos o crecimiento de los ya existentes posterior al cambio de las condiciones de operación como el recambio de electrolitos, mientras que el incremento en C6 podría representar que los consorcios han llegado a una fase de crecimiento estacionaria, según la cinética de Monod ([Kargi, 2009](#)). W_2 disminuyó para las CCM alimentadas con vinazas pero incrementó para la CCM alimentada con melaza, lo anterior se puede interpretar con la relación al rendimiento de las CCM. Es decir, las CCM alimentadas con ambas vinazas mostraron el mejor rendimiento a comparación con la CCM alimentada con melaza y fueron las que a su vez mostraron menor efecto Warburg o menor acumulación de iones y electrones que se traduce en mayor generación de bioelectricidad.

En particular, el valor más pequeño de R1 se presentó en la CCM alimentada por melaza (13.3-19.9 Ω), debido a que probablemente la biopelícula obtuvo una baja producción de electrones y protones (la menor producción de bioelectricidad). Mientras las CCM alimentadas con ambas vinazas presentaron un valor de R1 más grande, entre 15.8 y 37.5 Ω . Particularmente, en la CCM alimentada con la vinaza mezcalera, la cual presentó la densidad de potencia más grande en el ciclo C6, se interpreta como una acumulación de iones y protones la cual se puede asociar a la densidad de potencia más alta debido a que hay una mayor cantidad disponible. Sin embargo, en algunos casos dónde el potencial redox es limitado puede significar lo contrario.

El valor de R2 disminuyó en mayor medida en la CCM alimentada con vinaza mezcalera respecto a las demás CCM, el valor inicial en C4 respecto al valor final en C6, la diferencia fue de $3 \times 10^8 \Omega$. Por lo tanto, se puede relacionar ese efecto con la mayor densidad de potencia producida durante el ciclo 6, es decir, una tendencia de disminución mayor en el cambio en la resistencia R2 o resistencias de transferencia de carga anódica y catódica representa un mejora en el rendimiento de la CCM (Figura 29). Por otro lado, la diferencia en la resistencia R2 de las otras CCM fue menor comparada con la de la CCM alimentada con vinaza mezcalera ($1.4 \times 10^8 - 2.2 \times 10^8 \Omega$), por lo que la transferencia de carga entre ambos electrodos puede asociarse a la baja densidad de potencia producida hacia el final de ciclo C6 en las otras CCM.

En relación a los valores de R2 y los valores más bajos de Q2 y W2 se presentaron en las CCM alimentadas con vinaza tequilera y mezcalera (Q2, $6.5 \times 10^{-3} - 7.91 \times 10^{-3}$; W2, $2.0 \times 10^{-4} - 8.5 \times 10^{-4}$). Estos resultados concuerdan con que ambas vinazas obtuvieron una mayor densidad de potencia, la CCM alimentada con vinaza tequilera durante los ciclos C4 y C5 y la CCM alimentada con la vinaza mezcalera durante el ciclo 6 (Figura 29). Mientras que los valores de la CCM alimentada con melaza fueron altos para Q2 y R2 (Q2, $9.34 - 10.37 \times 10^{-3}$; W2, $2.4 - 13.4 \times 10^{-4}$).

Tabla 9 Valores del modelado de circuitos equivalentes en las pruebas de EIS en CCM de doble cámara para el tratamiento de vinazas y melazas

Experimento	$R_1(\Omega)$	$R_2(\Omega) \times 10^8$	$CPE(Q_2) \times 10^{-3}$	$W_2(\Omega S^{-1/2}) \times 10^{-4}$
MC4	13.3	2.8	10.37	2.4
MC5	18.5	1.8	9.34	13.0
MC6	19.9	1.4	10.1	13.4
VM4	36.7	4.9	7.25	8.5
VM5	37.5	3.4	6.98	6.6
VM6	38.3	1.9	7.91	5.4
VT4	15.8	4.4	6.89	5.4
VT5	20.9	3.5	6.5	2.0
VT6	27.3	2.2	7.23	3.1

R_1 , resistencia óhmica; R_2 , resistencia transferencia de carga; Q_2 , que representa las capacitancias de la doble capa eléctrica correspondientes a las interfaces entre el ánodo/ anolito y cátodo/catolito; Elementos de fase constante; W_2 , Elemento Warburg. MC, melaza de caña; VM, vinaza mezcalera; VT, vinaza tequilera.

Algunos datos reportados muestran que los modelados de circuitos equivalentes conectados en serie (como en este estudio) funcionan bien al obtener la caracterización de las resistencias internas con las salidas de voltaje y corriente de la CCM. Sin embargo, no se logra describir correctamente la dinámica en función del flujo de electrones y el almacenamiento de la carga en la doble capa ([Park et al., 2017](#)), por lo que estudios adicionales pueden ampliar más la información del fenómeno. Las CCM se pueden considerar como dispositivo que genera elementos capacitivos y muestran aumento y disminución de cargas debido a factores externos al sistema, como por ejemplo: agotamiento de sustratos, dinámica en las poblaciones o consorcios microbianos, cinéticas de reacción propias de los mecanismos de intercambio de electrones, etcétera. Por estos motivos un solo modelo de circuitos equivalentes no describe apropiadamente los fenómenos que ocurren al interior de una CCM, es necesario acoplar técnicas como la microscopía electrónica de barrido o los estudios de composición microbiana.

En un reciente estudio, [Kandpal et al. \(2021\)](#) modelaron con diferentes circuitos equivalentes una CCM de una cámara con ánodo de grafito inoculada con *Bacillus subtilis*. Los autores muestran un incremento en la pendiente de la parte lineal en la gráfica de Nyquist en diferentes tiempos de la corrida, además las longitudes de la línea disminuyó ligeramente. Durante esta investigación para las muestras de ambas vinazas, se observa un efecto similar en el transcurso de los ciclos C1, C2 y C3. Lo que sugiere que los mejores sustratos para las CCM son las vinazas en relación con la densidad de potencia obtenida. Otros datos similares que coinciden con los autores fueron un

aumento del CPE y la resistencia óhmica con el transcurso de la corrida así como una disminución en la resistencia de transferencia de carga.

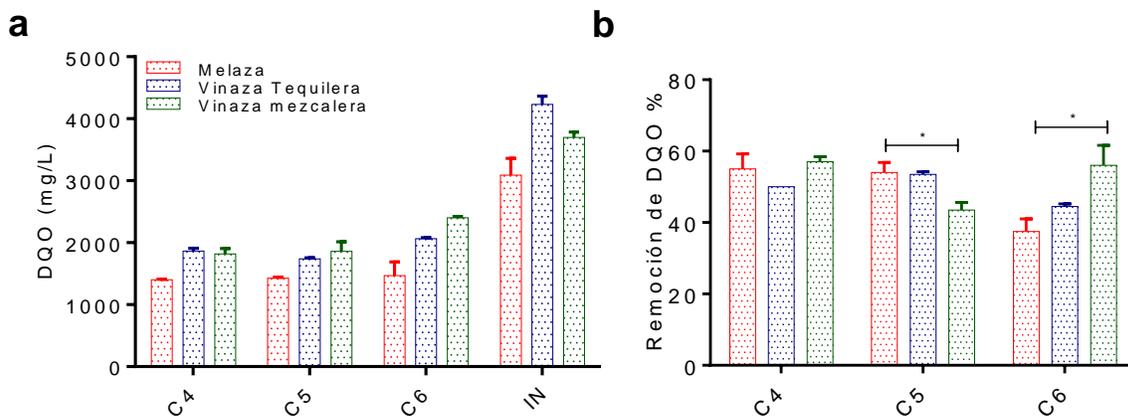
En otro estudio, [Bian *et al.* \(2018\)](#) operaron una CCM de una cámara con un ánodos carbonizados impreso en 3D ya que presenta mejor biocompatibilidad con la biopelícula de *Shewanella oneidensis* y con un modelado de circuitos equivalentes obtuvieron la caracterización de las resistencias. La resistencia óhmica (R_s) mostró menores valores de resistencia comparado con la de un ánodo de tela de carbón, por lo que los autores señalan que existe una mayor transferencia de masa entre el sustrato y el ánodo. Esto significa que el ánodo carbonizado impreso en 3D presenta mejores características que un control de tela de carbón. Sin embargo, otro factor a considerar es el tamaño del poro, el cual puede variar y se relaciona con los procesos de difusión. Aunque existen varios estudios en la caracterización de CCM con EIS, se recomienda profundizar más sobre el tema de modelado por circuitos equivalentes en procesos dinámicos asociados al transporte de nutrientes, iones y electrones a través de la doble capa.

En resumen, las vinazas tanto tequileras (en los ciclos C4 y C5) y mezcaleras (ciclo C6), produjeron mayores cantidades de densidad de potencia en comparación con la melaza resultados apoyados con los valores obtenidos por el modelado de circuitos equivalentes en las pruebas de EIS. Los ciclos anteriores no se consideraron debido a que los recambios del cátodo fueron irregulares. Es decir, a partir del ciclo C4 pueden garantizarse condiciones similares en el cátodo por lo que el efecto puede atribuirse exclusivamente a los fenómenos que ocurren en el ánodo.

Durante los ciclos C4, C5 y C6, se determinó la degradación de la materia orgánica en las tres CCM, midiendo la DQO tanto en la entrada, como en la salida de cada alimentación de sustrato para cada ciclo (C4, C5 y C6). Las CCM fueron alimentadas con las soluciones de los sustratos con valores de DQO de 3088 ± 271 , 4230 ± 132 y 3696 ± 90 g/L para la melaza, vinaza tequilera y vinaza mezcalera, respectivamente ([Figura 30a](#)). La [Figura 30b](#) muestra la remoción de materia orgánica respecto a la DQO. Se observan porcentajes de remoción de la DQO entre 40 y 60 por ciento en todas las CCM. La CCM alimentada con melaza presentó una alta remoción en el ciclo C4 y C5, pero la remoción disminuyó significativamente en el ciclo C6. Mientras que en la CCM alimentada con vinaza mezcalera

mostró un incremento de remoción de la DQO en el ciclo C6. Los análisis estadísticos se realizaron aplicando una prueba múltiple de Tukey y un valor de $\alpha=0.05$ (Anexo 4). Varios reportes muestran valores de remoción de DQO que van desde el 20-90% para las vinazas tequileras (de Jesús Franco-León et al., 2021; Moguel-Castañeda et al., 2020; Barcia et al, 2020). Mientras que las melazas muestran valores de remoción de DQO 60 y 80 % (Wu et al., 2017; Javed et al., 2021).

En la Figura 30c se muestra la eficiencia coulómbica calculada, la mayor eficiencia coulómbica en el ciclo C4 se presentó en la CCM alimentada con vinaza mezcatera con un valor cercano al 10 por ciento. El ciclo C5 la eficiencia coulómbica fue similar a la del ciclo C4 para ambas vinazas mientras que solo la melaza mostró una eficiencia coulómbica del 4 por ciento. Finalmente en el ciclo C6 la mayor eficiencia coulómbica fue producida nuevamente por las CCM alimentadas con las respectivas vinazas con un valor ligeramente superior al 10 por ciento, la eficiencia coulómbica obtenida en la CCM alimentada con melaza fue significativamente menor. Los análisis se hicieron con una prueba múltiple de Tukey y un valor de $\alpha=0.05$ (Anexo 5). Se observó un incremento en la eficiencia coulómbica de las CCM alimentada con vinaza tequilera en el transcurso de la operación, lo cual se puede atribuir a un enriquecimiento de microorganismos electrogénicos que pudiera estar sucediendo.



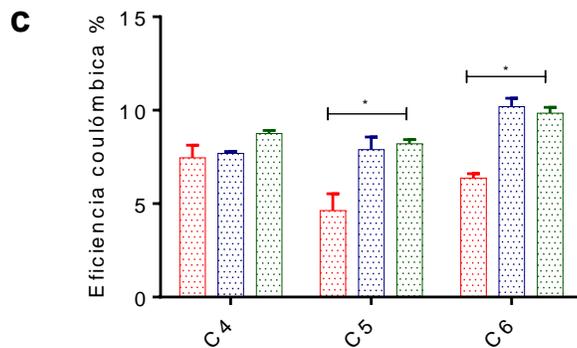


Figura 30. Degradación de materia orgánica y eficiencia coulombica. a) Demanda química de oxígeno; b) Remoción de la DQO; c) Eficiencia coulombica.

Al final de la corrida, se obtuvo la biopelícula asépticamente y se extrajo el DNA genómico con el kit DNeasy Power Soil (MOBIO), siguiendo las indicaciones del fabricante. La [Figura 31](#) muestra una imagen del gel de electroforesis (agarosa al 1%) de una muestra de 5 µl de DNA genómico obtenido. En el carril A se observan las bandas que corresponden al marcador de peso molecular con tamaños de 100 hasta 5000 pares de bases, en B se muestra el DNA genómico correspondiente a la biopelícula obtenida del ánodo de la CCM alimentada con vinaza tequilera, en C de la CCM alimentada con la vinaza mezcalera, en D con melaza y en E del inóculo. Aunque la banda correspondiente a la muestra es tenue, no muestra degradación de DNA, por lo que la calidad es suficiente para el análisis de secuenciación.

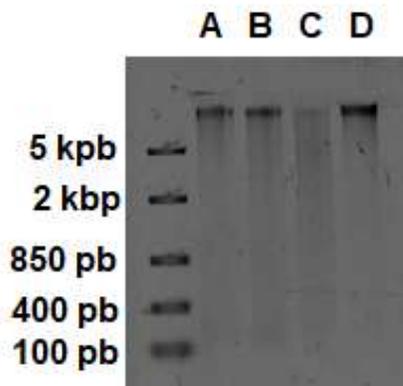


Figura 31. Gel de electroforesis del DNA genómico extraído a partir de las muestras de la biopelícula obtenida en CCM de doble cámara para el tratamiento de vinazas y melazas. A) Marcador de peso molecular B) Vinaza tequilera. C) Vinaza mezcalera. D) Melaza. E) Inóculo.

El DNA de las muestras e inóculo fueron enviados a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM (UUSMB-IBt-UNAM) para realizar la secuenciación de las regiones variables V3-V4 del gen ribosomal 16S con la plataforma Illumina Miseq con un tamaño de 2x300 pb en secuencias pareadas con más de 80,000 lecturas por muestra. Los cebadores que utilizaron fueron 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNG-GCWGCAG para Forward y 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACGGGTATCTAATCC para Reverse (Klindworth *et al.*, 2013). Una vez realizada la secuenciación masiva, la UUSMB nos envió los datos en formato fastq (calidad y secuencias) y posteriormente se analizaron con el software QIIME2 con ayuda de la Dra. Elizabeth Ernestina Godoy Lozano del Instituto Nacional de Salud Pública.

En la [Figura 32](#) se muestra el análisis de calidad de las secuencias obtenido con el programa FastQC. El índice de Phred muestra la relación de errores de secuenciación en número de bases. Es decir un valor de 10, del índice corresponde a un error (una base) por cada diez; un valor de 20 indica 1 error por cada 100; un valor de 30, 1 error por cada 1000 y 40, un error por cada 10000 bases. Errores aceptables de secuenciación se consideran valores del índice de Phred mayores a 20 (valor intermedio).

El intervalo en la sección roja de la gráfica contiene valores de 0-20, el intervalo color naranja contiene los valores de 20-28 y la zona verde contiene los valores de 28-34 en el índice de Phred. Las líneas azul y roja representan la mediana y la media, respectivamente. La calidad tiende a disminuir al final de la corrida por lo que las secuencias pueden cortarse en el sitio determinado de mala calidad antes del empalme o unión de secuencias F y R (Forward y Reverse). Se determinó cortar por encima de las 280 pb en las secuencias R1 y 220 de las secuencias R2 Reverse para aumentar la calidad promedio de las secuencias ([Figura 32](#)).

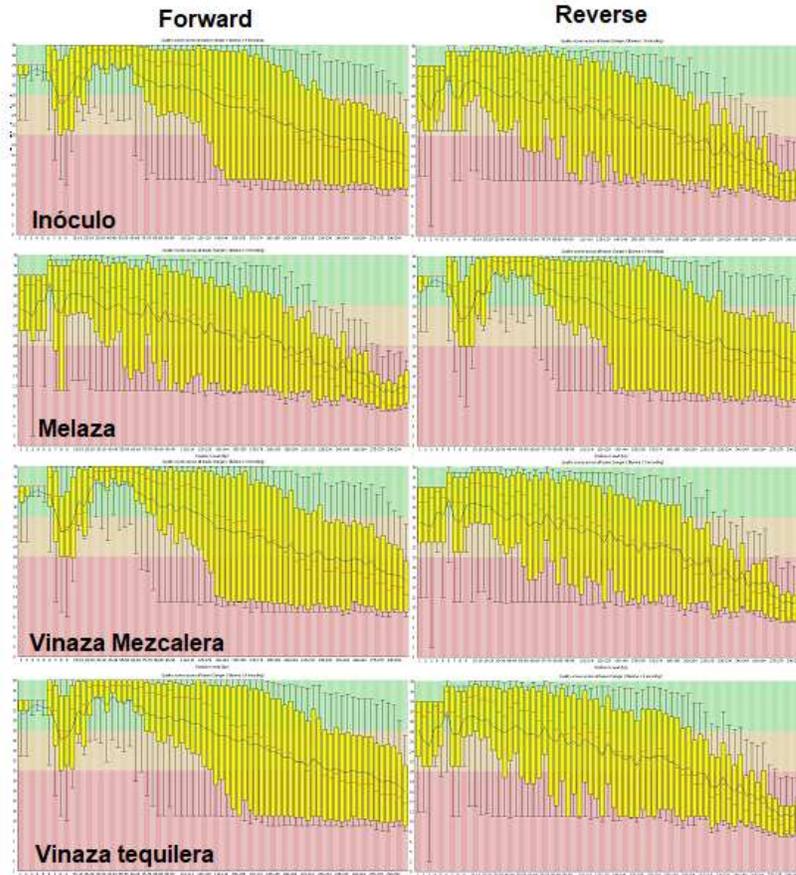


Figura 32. Análisis de calidad de secuencias obtenidas de las regiones variables V3-V4 del gen ribosomal 16S.

Posteriormente, se filtraron las secuencias, se eliminaron los ruidos, se unieron las secuencias F y R, y se eliminaron las secuencias quiméricas con DADA2, utilizando QIIME2. En la [Tabla 10](#) se muestra un resumen del análisis de calidad en relación al número de secuencias obtenidas después de cada etapa.

Tabla 10. Análisis de calidad de las secuencias del gen 16S rRN

Secuencia/Muestra	Entrada	Filtrada	Sin ruido	Unida	Sin quimeras
Inóculo	85,645	2,538	1,671	808	808
Melaza	83,038	1,995	1,669	1,104	484
Vinaza M.	77,516	2,193	1,685	772	476
Vinaza T.	96,826	3,424	2,559	1,405	968

Finalmente, se realizó la anotación taxonómica por medio de la agrupación de las secuencias en ASV con DADA2 utilizando el software QIIME2. La base de datos que se utilizó fue SILVA v138 ([Quast et al., 2012](#)). QIIME2 nos permite generar una reconstrucción filogenética y con el software ITool ([Letunic & Bork, 2007](#)) se realizó la

visualización del árbol filogenético. Con la matriz de abundancia con a nivel de género se determinaron los análisis de alfa y beta diversidad.

Determinación de la composición microbiana en CCM alimentadas con vinazas y melaza

Las bibliotecas pueden presentar diferentes tamaños entre las muestras por lo que es necesario una normalización aleatoria para poder compararlas y la rarefacción es un análisis previo a la determinación de la diversidad (Cameron et al., 2021). El limitado número de taxones identificados en una comunidad microbiana puede ser soportado por una buena profundidad secuenciación cuando las curvas de rarefacción se vuelven asintotas (Wong et al., 2011).

Se obtuvieron un total de 61 ASV (algoritmo de DADA2) como resultado del análisis de secuencias utilizando el programa QIIME2, lo que representa una baja riqueza. La profundidad es suficiente cuando el comportamiento de la curva es lineal, en este caso desde las 25 lecturas. Por lo tanto, las curvas de rarefacción obtenidas (Figura 33) muestran un comportamiento asintótico que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para las muestras, es decir, que no se trata de una subrepresentación (Weiis et al., 2017). El mayor número de ASV se presentó en la CCM alimentada con vinaza mezcalera, mientras que la vinaza tequilera presento el menor número de ASV y el inóculo al igual que la melaza obtuvieron un número similar de ASV. Esto significa que la muestra con mayor número microorganismos identificados a nivel de género (taxones) fue la biopelícula obtenida en la CCM alimentada con vinaza mezcalera.

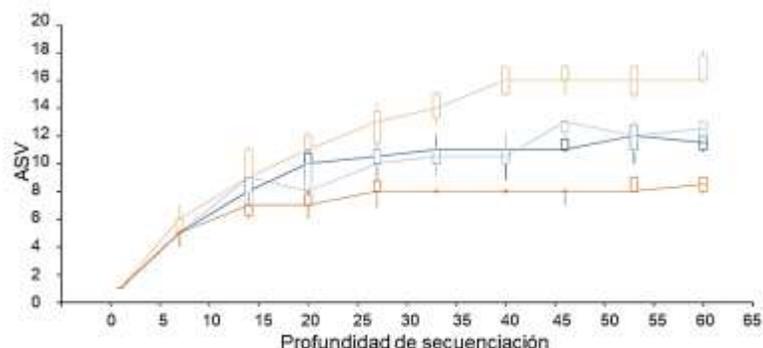


Figura 33. Curva de rarefacción en relación de las variantes secuencias de amplicones respecto a la profundidad de secuenciación. Naranja fuerte, vinaza tequilera; azul fuerte, inóculo; azul tenue, melaza; naranja tenue, vinaza mezcalera.

Según la definición de Faith, la diversidad filogenética es una medida de identidad de un taxón (a cualquier nivel) en relación al largo de una rama en un árbol filogenético para este subgrupo (Faith et al, 2004). Con base en que la filogenética es conjunto de características similares en un grupo de organismos. Por lo tanto, la diversidad filogenética de Faith (FPD, por sus siglas en inglés) nos representa una medida cualitativa de la riqueza de un consorcio microbiano de acuerdo con sus similitudes entre taxones. La Figura 34 muestra en el eje de la variable independiente la profundidad de secuenciación, la cual fue suficiente a partir de las 25 lecturas donde inicia el comportamiento asintótico, esto para poder analizar la FDP. El inóculo presentó una mayor riqueza con un valor de FDP alrededor de 2.5, mientras que el resto de las muestras, presentaron valores de FDP entre 0.6 y 1.2 (Figura 34).

Esto significa que en el inóculo existe una mayor variedad grupos de microorganismos con características filogenéticamente diferentes, respecto a las biopelículas obtenidas en las CCM. En segundo lugar, la melaza de caña de azúcar y la vinaza mezcalera presentaron valores de FDP similares entre 1 y 1.2, mientras que la vinaza tequilera presentó el menor valor de FDP entre 0.6 y 0.8 en la asíntota (para determinar si la profundidad de secuenciación es suficiente, el comportamiento de la curva debe ser asintótico) (Figura 34). De acuerdo con estos resultados, la vinaza tequilera muestra un menor número de taxones relacionados filogenéticamente que aunado al incremento de la densidad de potencia observado con este sustrato apoya la hipótesis de la reducción de consorcios respecto al inóculo y su especialización para la producción de bioelectricidad, esto relacionado con los resultados de los ciclos C4 y C5 respecto a la densidad de potencia producida. Además, la eficiencia coulombica relacionada con ambas vinazas también muestra valores más altos (Figura 29 y Figura 30b y 30c). Podemos asumir que la presión selectiva de los factores de operación de esta CCM, es decir el tipo de sustrato, favoreció el desarrollo consorcios electrogénicos poco diversos pero de alta producción de bioelectricidad. Sin embargo, la remoción de DQO fue similar en los ciclos C4 y C5 entre todas las CCM, sólo en C6 se observa una diferencia significativa de la CCM alimentada con vinaza mezcalera sobre las otras dos CCM.

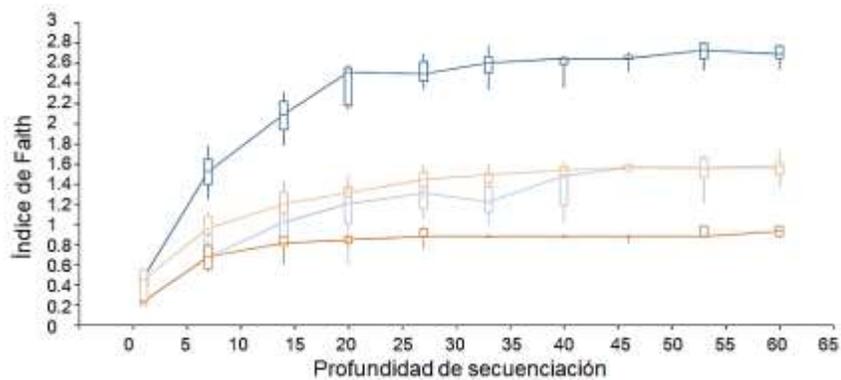


Figura 34. Curva de rarefacción en relación con el índice de diversidad de Faith respecto a la profundidad de secuenciación. Naranja fuerte, vinaza tequilera; azul fuerte, inóculo; azul tenue, melaza; naranja tenue, vinaza mezcalera.

La [Figura 35](#) muestra un análisis de PERMANOVA utilizando el índice de unifrac ponderado el cual además de la diversidad también considera la abundancia, donde se observa que las comunidades identificadas en las biopelículas son significativamente distintas a las que fueron identificadas en el inóculo, estos resultados sugieren que las comunidades cambiaron durante la producción de bioelectricidad en las CCM, lo que nos hace pensar que los microorganismos electrogénicos pudieron ser favorecidos por el sistema que produjo mayor densidad de potencia. Es decir, la CCM alimentada con vinaza tequilera en los ciclos C4 y C5, y la CCM alimentada con vinaza mezcalera durante el ciclo C6.

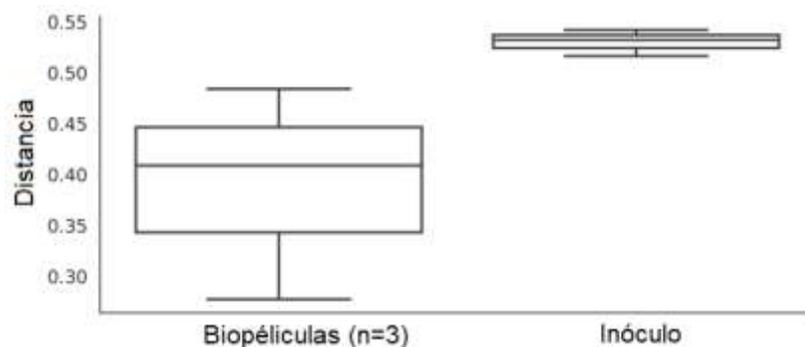


Figura 35. Análisis PERMANOVA utilizando el índice Unifrac ponderado para relacionar las comunidades identificadas en las biopelícula con las del inóculo.

El siguiente árbol filogenético construido con la herramienta iTOL v6 (Interactive tree of life) ([Letunic y Bork, 2021](#)) muestra las ASV identificadas a nivel de familia y género de todas las muestras incluyendo el inóculo (no se encuentran clasificadas por muestra). En el inóculo se encontraron 5 taxones correspondientes a archaeas, esto es común ya que

la fuente del inóculo corresponde a lodos granulares anaerobios y esto ha sido reportado por otros autores (Díaz *et al.*, 2003), el resto fueron bacterias (Figura 36).

En el árbol filogenético se observa el grupo divergente de las archaeas de las familias *Methanosaetaceae*, *Pedosphaeraceae* y *Anaerolineaceae*, identificadas en el inóculo. Además, se observan varias *Pseudomonas* presentes en las todas las CCM (Figura 36), lo que indica a uno de los microorganismos probablemente responsables de la producción de bioelectricidad en todas las CCM, además, se observa la capacidad de crecer con diferentes sustratos como lo fueron la vinaza mezcalera, vinaza tequilera y melaza.

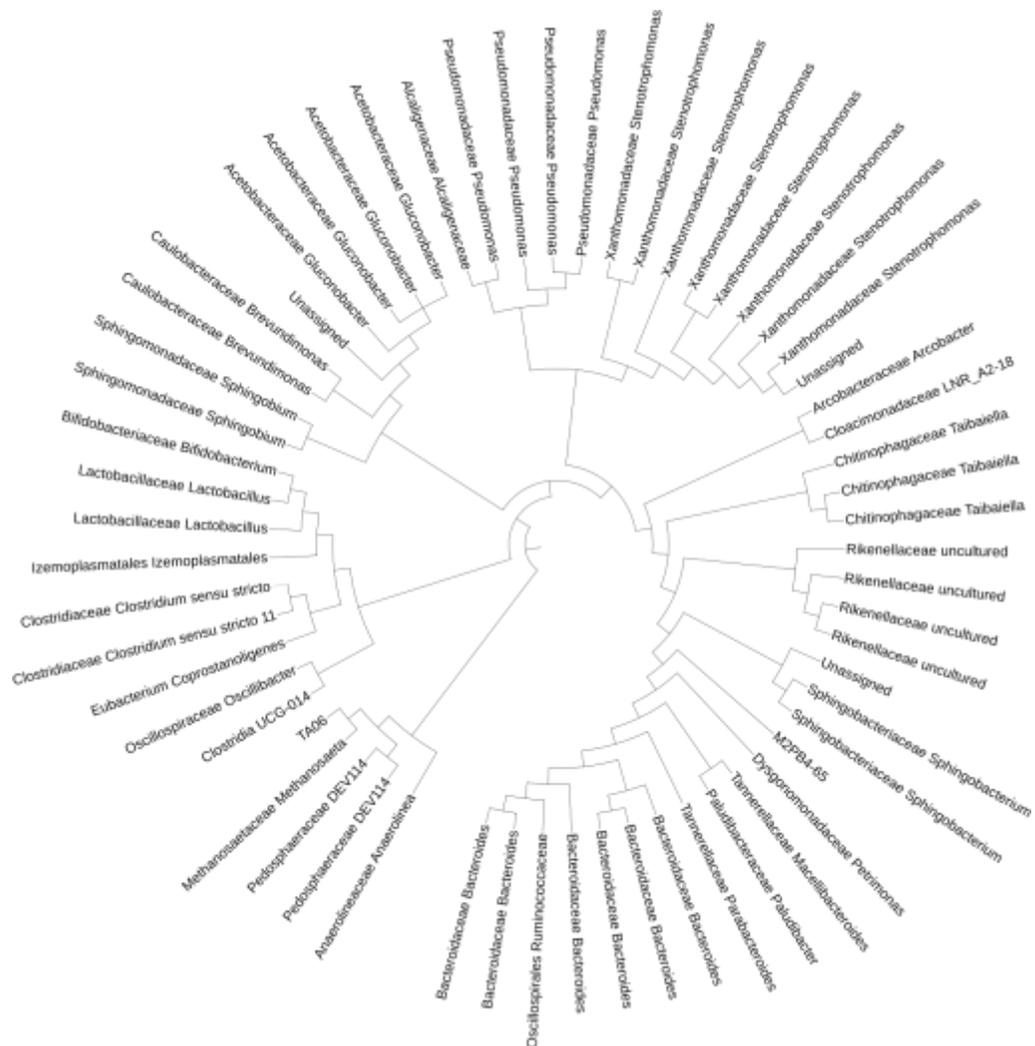


Figura 36. Árbol filogenético. Se muestra la relación filogenética de los microorganismos identificados en todas las muestras incluyendo el inóculo.

El análisis de ecología microbiana mostró un incremento del Phylum *Firmicutes* en todas las biopelículas de las CCM respecto al inóculo. Mientras que en el inóculo este *Phylum* presentó una abundancia relativa del 8%, en las CCM alimentadas con vinaza mezcalera, melaza y vinaza tequilera fue del 26, 20 y 11% respectivamente ([Anexo 7](#)). Otro *Phylum* que presentó un sustancial incremento fue *Proteobacteria*, mientras que en el inóculo no se observa dentro de los *Phylum* más abundantes, el *Phylum* *Proteobacteria* fue el más abundante en las CCM alimentadas con vinaza mezcalera y con melaza, mientras que fue el segundo más abundante en la CCM alimentada con vinaza tequilera. En la CCM alimentada con vinaza tequilera el *Phylum* más abundante fue *Bacteroidetes* con 62% y coincide con la abundancia relativa más alta en el inóculo ([Anexo 7](#)).

Por otro lado, a nivel de *Clase* el grupo *Alphaproteobacteria* presentó abundancias considerables en todas las CCM a diferencia del inóculo, mientras que el grupo *Gammaproteobacteria* estuvo presente en dos de las tres CCM, vinaza tequilera y melaza con 16 y 55%, respectivamente. Otros grupos presentes a nivel de *Clase* en las biopelículas de las CCM fueron *Bacteroidia*, *Clostridia* y *Bacilli* con abundancias desde el 5 hasta el 20%. Estos grupos fueron identificados también en el inóculo ([Anexo 8](#)).

Al nivel de orden, el grupo de *Bacteroidales* presentó la mayor abundancia relativa en la biopelícula de la CCM alimentada con vinaza tequilera y en el inóculo 53 y 44% respectivamente, en la CCM alimentada con vinaza mezcalera fue el grupo *Acetobacterales* (57%) y en la CCM alimentada con melaza el grupo de *Xanthomonadales* (31%). El orden *Pseudomonadales* estuvo presente en la vinaza tequilera y en la melaza con 15 y 20% de abundancia relativa, respectivamente ([Anexo 9](#)).

La [Figura 37](#) muestra las abundancias relativas a nivel de familia de las comunidades obtenidas en las biopelículas de las CCM y el inóculo. Interesantemente, la familia *Acetobacteraceae* representa más del 50 % de la comunidad en la CCM alimentada con melaza, presumiblemente, debido al contenido de azúcares en este sustrato ([Palmonari et al., 2020](#)). En el caso de la CCM alimentada con vinaza tequilera se identificaron las familias más abundantes como *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadeaceae*. Y en la

CCM alimentada con vinaza mezcalera la familia más abundante fue *Rikenellaceae*. En el inóculo, la familia más abundante fue la de *Bacteroidaceae*.

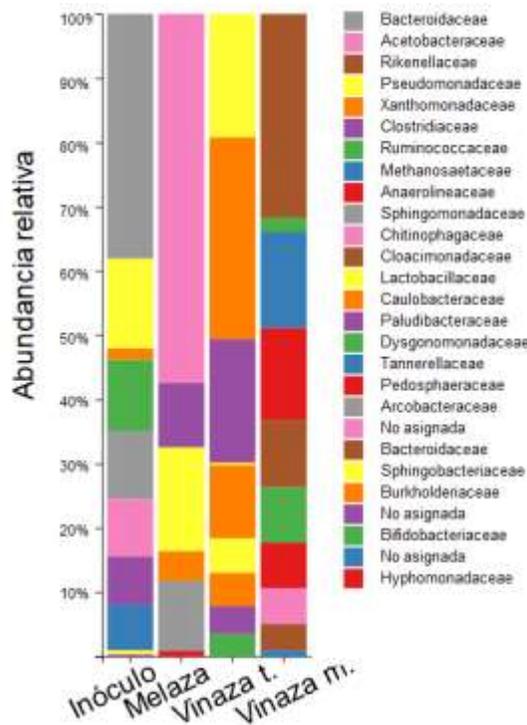


Figura 37. Gráfica de barras con las principales familias asignadas a los microorganismos identificados en la producción de bioelectricidad en CCM alimentadas con vinazas y melaza.

La asignación taxonómica con QIIME2 permitió una resolución hasta nivel de género. En la Figura 38 se muestran los géneros más abundantes, en la CCM alimentada con vinaza mezcalera los géneros identificados fueron: *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* y *Taibaiella*. En la CCM alimentada con vinaza tequilera, los géneros con mayor abundancia fueron: *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Arconobacter* y *Brevundimona*. En la biopelícula obtenida de la CCM alimentada con melaza se identificaron los géneros *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Lactobacillus* y *Sphingobacterium*. Finalmente, los microorganismos más abundantes en el inóculo fueron las archaeas *Methanosaeta* y *Pedosphaeraceae*.

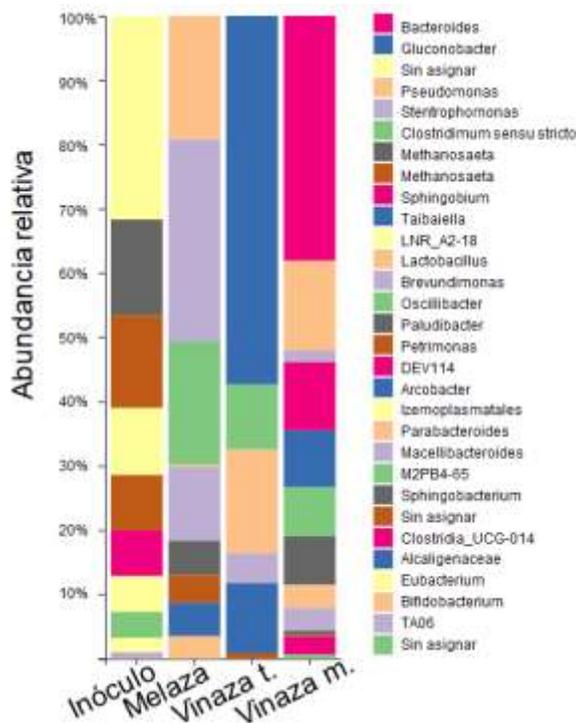


Figura 38. Gráfica de barras con los principales géneros asignados a los microorganismos identificados en la producción de bioelectricidad en CCM alimentadas con vinazas y melaza.

Los análisis de diversidad beta muestran diferencias en cada una de las estructuras de comunidades microbianas asignadas. Se obtuvieron análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés) para los índices Bray-Curtis, Jaccard, Unifrac ponderado y sin ponderar. En los PCoA, los índices de Bray-Curtis y Jaccard mostraron distancias similares entre cada una de las muestras ([Figura 39a](#) y [b](#)). Mientras que ambos índices de Unifrac mostraron que todas las muestras tanto las de las biopelículas como las del inóculo son únicas ([Figura 39c](#) y [d](#)).

A pesar de que varios géneros fueron identificados en más de una muestra, en los análisis de beta diversidad -la cual compara la diversidad microbiana entre varias muestras- se observan grandes diferencias entre cada una de ellas, lo que indica que el sustrato alimentado en las CCM resulta un factor a considerar en el desarrollo de consorcios microbianos únicos productores de electricidad ([Figura 38](#)).

Para el índice Unifrac ponderado que toma en cuenta la abundancia y la riqueza, las comunidades de la CCM alimentada con melaza se encuentran a una distancia corta respecto a las comunidades del inóculo ([Figura 39c](#)). Esto sugiere una mayor similitud

entre las comunidades de la biopelícula de la CCM alimentada con melaza y la del inóculo, estos resultados concuerdan con la menor densidad de potencia y eficiencia coulombica producidas por ésta CCM (figura 29 y Figura 30c). En consecuencia, el cambio en la composición microbiana puede estar asociado a la formación de consorcios electrogénicos ya que las CCM alimentadas con ambas vinazas tuvieron un mejor rendimiento en densidad de potencia respecto a la CCM alimentada con melaza. En la CCM alimentada con melaza se caracterizaron los consorcios conformados por los géneros *Pseudomonas*, *Brevundimonas* y *Stenotrophomonas* (Figura 38).

La comunidad de la CCM alimentada con vinaza tequilera fue la que mayor distancia presentó respecto al inóculo en ambos índices Unifrac ponderado y sin ponderar (Figura 39c y d). Es decir, la comunidad microbiana de la CCM alimentada con vinaza tequilera fue la menos parecida al inóculo. Por lo tanto, se infiere que al ser la comunidad de la biopelícula de la CCM alimentada con vinaza tequilera la más variada entre todas las comunidades del resto de las muestras, podría estar relacionada con la formación de consorcios capaces de producir alta densidad de potencia y eficiencia coulombica mostradas en los ciclos C4 y C5 (Figura 29 y Figura 30c). En los consorcios identificados en esta CCM, estuvieron involucrados los géneros *Gluconobacter*, *Pseudomonas* y *Clostridium* (Figura 38).

La CCM alimentada con vinaza mezcalera también mostró distancias amplias entre el inóculo y el resto de las muestras (Figura 39). Los géneros que conforman los principales consorcios fueron caracterizados como *Bacteroides*, *Pseudomonas* y *Sphingobium* (Figura 38). Debido a que ésta CCM fue la que mostró el mejor rendimiento de densidad de potencia durante el ciclo C6 (Figura 29), se infiere que el desarrollo del consorcio electrogénico se produce más lentamente en comparación al consorcio producido por la CCM alimentada con vinaza tequilera.

En resumen, los índices de diversidad beta muestran que los consorcios formados en las biopelículas obtenidas en las CCM son todas diferentes entre sí y respecto al inóculo. Es decir, cada una de las comunidades microbianas es única.

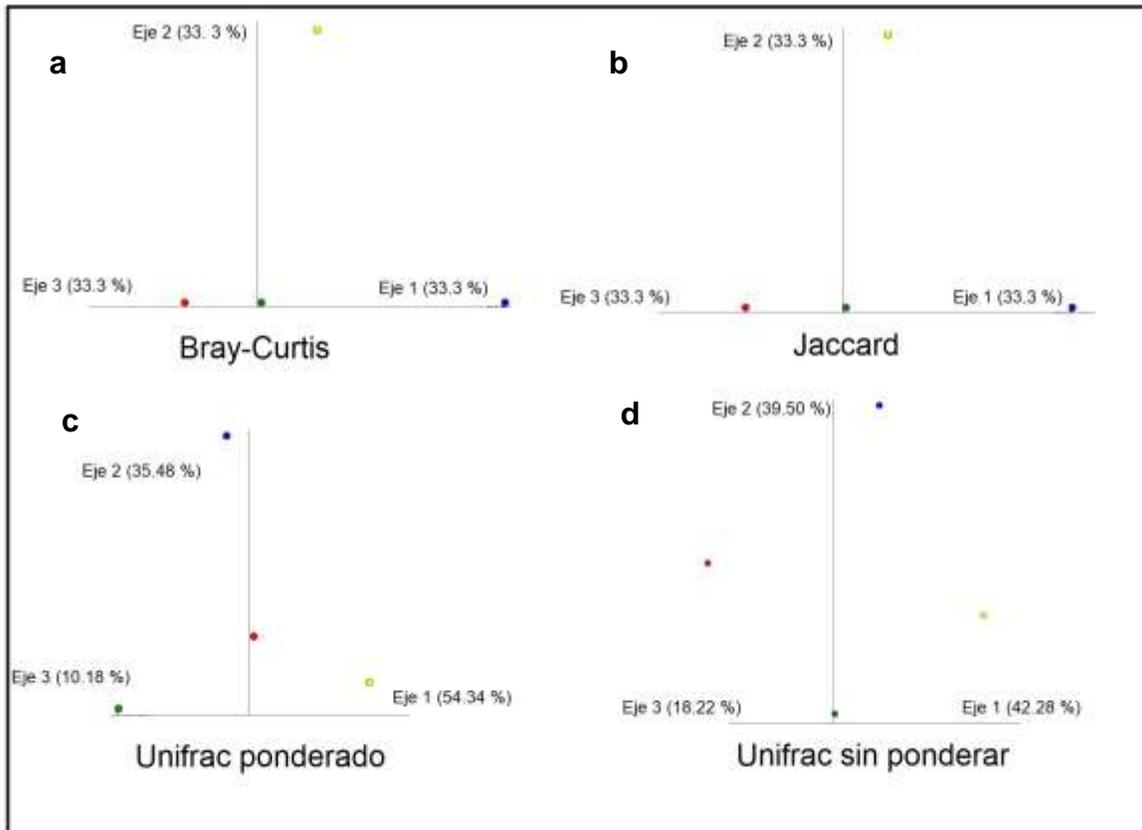


Figura 39. Análisis de coordenadas principales para índices de diversidad beta; a) Índice de bray-curtis, b) Jaccard, c) Unifrac ponderado y d) Unifrac sin ponderar. (Los círculos amarillos corresponden al inóculo, rojo a la melaza, verde a la vinaza mezcalera y azul a la vinaza tequilera).

Diversos autores han reportado que *Pseudomonas* es capaz de generar bioelectricidad bajo condiciones muy específicas. Wang et al., reportan que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* produce fenacinas que funcionan como mediadores en diversos mecanismos intercambio de electrones (Wang et al., 2013). Además, en esta especie se han identificado algunos genes responsables de la formación de Quorum sensing, un tipo de control sobre poblaciones a través de la regulación de varios genes que coinciden con la producción de las Fenacinas (Yong et al., 2011). En algunos casos la regulación de algunos genes como IrrE (ionizing radiation resistance E linkage group), *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de incrementar su rendimiento en la producción de electrones (Luo et al., 2020).

El género de *Gluconobacter* identificado en la CCM alimentada con vinaza tequilera es capaz de generar bioelectricidad a partir de glucosa obtenida desde residuos de lignocelulosa (Krishnaraj et al., 2015; Plekhanova et al., 2020; Adachi et al., 2021).

Krishnaraj *et al.*, encontraron que *Gluconobacter suboxydans* presenta buenas características electrogénicas debido a que produce varias enzimas deshidrogenasas con alta actividad electrocatalítica. Por otro lado Plekhanova *et al.*, encontraron que *Gluconobacter suboxydans* puede actuar como un biosensor junto a nanotubos de carbono de paredes múltiples, ya que no se observó un cambio en la actividad enzimática en la cadena respiratoria del microorganismo (los nanotubos de carbono en ocasiones pueden resultar tóxicos para algunas bacterias). Este biosensor permitió identificar algunos sustratos como glucosa y etanol con señales que van desde los 65-869 nA y 181-1048 nA, respectivamente. En un estudio reciente, Adachi *et al.*, (2021) encontraron que la especie *Gluconobacter oxydans* posee mecanismos directos de transferencia de electrones, debido a que la enzima aldehído deshidrogenasa se encuentra localizada en la membrana de este microorganismo y además presenta fuerte actividad electrocatalítica. Otros reportes recientes se enfocan a estudiar su amplia maquinaria enzimática para la degradación de diferentes sustratos (Habe *et al.*, 2021; Kataoka *et al.*, 2021), lo que supone que se trata de un microorganismo que puede ser desarrollado bajo distintos sustratos en las CCM.

Clostridium es el otro género identificado en la CCM alimentada con vinaza tequilera además de *Pseudomonas* y *Gluconobacter*. Un reporte reciente describe la dinámica poblacional de algunos géneros electroactivos en CCM (Rivalland *et al.*, 2022). Rivalland *et al.*, investigaron el papel de *Clostridium* en un sistema de cooperación inter especies utilizando CCM, en el experimento se desarrolló una biopelícula primaria dominada por *Desulfuromonas*. Sin embargo, cuando el rendimiento disminuyó, *Clostridium* fue capaz de aumentar el rendimiento promoviendo el posterior crecimiento de *Geobacter*. Por lo tanto, *Clostridium* se puede asociar con otros microorganismo electrogénicos. En otro reporte reciente, Hou *et al.*, demostraron que *Clostridium kluyveri* es capaz de crecer en un medio de cultivo obtenido a partir de ácidos grasos de cadena corta que incluye acetato, propionato y butirato (Huo *et al.*, 2022). Esto concuerda con el uso de sustratos como las vinazas y que algunas contienen este tipo de compuestos. Finalmente, el género *Clostridium* se reporta frecuentemente en sistemas electroquímicos aunque su papel en particular no se ha descrito concretamente (Yang *et al.*, 2021; Bhatti *et al.* 2022; Guan & Yu, 2021).

Además de *Pseudomonas*, otro género preponderante en la comunidad de la biopelícula obtenida de la CCM alimentada con vinaza mezcalera fue *Bacteroides*, una bacteria metal reductora (Wang et al., 2010). *Bacteroides* ha sido descrita como una bacteria fermentativa por algunos autores, es decir, una bacteria que es buena degradadora de sustratos complejos. Por ejemplo, Li et al. (2013) investigaron la degradación de sustratos a partir de un lixiviado de residuos alimenticios ácidos en CCM, el enriquecimiento del género *Bacteroides* se asoció a la degradación de la materia orgánica, mientras que la producción de bioelectricidad en la CCM se atribuye al desarrollo de géneros como *Geobacter*. Otro estudio similar acerca este género indica que *Bacteroides* es un buen degradador de xilosa, produciendo intermediarios metabólicos para la producción de bioelectricidad en CCM por microorganismos electrogénicos como *Geobacter* (Mäkinen et al., 2013). Los datos sugieren que *Bacteroides* puede asociarse a consorcios electrogénicos debido a que es capaz de degradar sustratos complejos, generando así un sintrofismo con microorganismos como *Pseudomonas* (Figura 38) o *Geobacter*. En la CCM alimentada con vinaza mezcalera coinciden estas características, debido a que la máxima densidad de potencia producida fue en el ciclo C6 (Figura 29), lo supone que *Bacteroides* posiblemente favoreció el desarrollo de *Pseudomonas*.

Finalmente, otra posible asociación identificada en la en la CCM alimentada con melaza fue *Pseudomonas* con *Stenotrophomonas*. En un reporte reciente se observa que familia *Xanthomonas*, a la cual pertenece el género *Stenotrophomonas*, es capaz de producir bioelectricidad por al menos dos mecanismos distintos (Chen et al., 2021). Además, recientemente ha sido identificado en CCM como uno de los microorganismos con grandes abundancias (Rojas-Flores et al., 2021; Li et al., 2019). Sin embargo, la información es limitada en comparación a los géneros descritos anteriormente como electrogénicos.

La figura 40 muestra la relación que existe entre la eficiencia coulombica del ciclo C6 y la diversidad de Faith, mientras que el tamaño del círculo representa el número de ASV asignados en cada uno de los experimentos. La CCM alimentada con vinaza mezcalera mostró la mayor eficiencia coulombica y un índice de Faith de 1.5, similar al de la CCM alimentada con la melaza. Sin embargo, el número de ASV asignado fue mayor en la

biopelícula obtenida en la CCM alimentada con melaza y la eficiencia coulombica fue un 20% menor que en la CCM alimentada con vinaza mezcalera. La CCM alimentada con vinaza tequilera mostró el menor índice de diversidad Faith que fue de 0.9 y generó una eficiencia coulombica de 44%, este valor de eficiencia coulombica se situó en medio de las otras dos CCM que obtuvieron eficiencias de 56 y 37 % para la CCM alimentada con vinaza mezcalera y melaza, respectivamente. Finalmente el índice de Faith que se obtuvo del inóculo fue de 2.65.

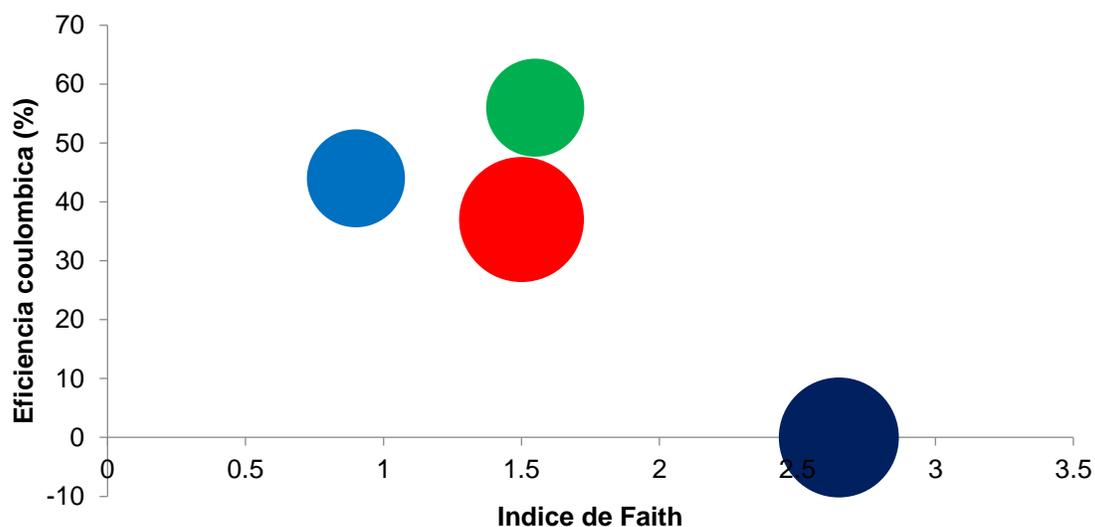


Figura 41. Relación de la diversidad alfa y la eficiencia coulombica. (Círculo azul tenue, CCM alimentada con vinaza tequilera; círculo rojo, CCM alimentada con melaza; círculo verde; CCM alimentada con vinaza mezcalera; círculo azul fuerte, Inóculo; El tamaño de los círculos representa el número de ASV asignados).

Los grupos de microorganismos anteriormente descritos son de los cuales existen reportes en la literatura como responsables de producir bioelectricidad o en la degradación de sustratos en sistemas bioelectroquímicos. Estas posibles asociaciones entre microorganismos que ya han sido identificados como microorganismos electroactivos o fermentativos resultan interesantes para elucidar consorcios capaces de mejorar los rendimientos en la producción de bioelectricidad en CCM. Por ejemplo, la asociación del género *Pseudomonas* con los géneros *Stenotrophomonas*, *Gluconobacter*, *Bacteroides* y *Clostridium*, ya que esto genera un campo de estudio para investigaciones futuras en el área de cocultivos y la caracterización de asociaciones más eficientes para su uso en CCM.

En la [Tabla 11](#) se muestran las comunidades descritas en el presente estudio a nivel de género comparadas con las reportadas por otros autores en estudios similares. Los géneros *Clostridium* y *Lactobacillus* encontrados en la CCM alimentada con vinaza tequilera han sido reportados en procesos alimentados con el mismo sustrato, lo que sugiere que son buenos degradadores de materia orgánica ya que los procesos en los cuales se reportan son para la producción de hidrógeno y metano ([Arellano-García et al., 2021](#); [García-Depraect et al., 2021](#)). De tal modo que los géneros restantes podrían ser responsables de la producción de la bioelectricidad en dicha CCM, por ejemplo *Pseudomonas* ya ha sido reportada como una bacteria electroactiva ([Wang et al., 2013](#)). De manera similar el caso de *Gluconobacter*, otro género encontrado en la CCM alimentada con vinaza tequilera ([Habe et al., 2021](#); [Kataoka et al., 2021](#)). Respecto a la información de la melaza mezcalera existe limitada información, por lo que este estudio será uno de los pocos en caracterizar las comunidades microbianas desarrolladas en una CCM con este sustrato.

Por otra parte, los reportes de CCM alimentadas con melaza son un poco más bastos, Sin embargo la descripción de las comunidades microbianas para este sustrato también han sido poco descritas, en el caso de los reportes que aquí se presentan no hay ninguna coincidencia con los microorganismos identificados en este estudio y los de los autores aquí presentados, lo que significa que la fuente del inóculo es un punto importante a considerar cuándo se describen las comunidades ([Yang., et al., 2022](#); [Tripathi et al., 2022](#)).

La importancia de la fuente del inóculo como del sustrato sobre las poblaciones microbianas desarrolladas en la CCM solo son un par de variables a destacar en el rendimiento de una CCM, los parámetros de operación como el TRH, la configuración de la CCM y la concentración del sustrato son aspectos ligados a la dinámica poblacional que deberán estudiarse más a fondo con técnicas como EIS, SEM y análisis bioinformático para describir de mejor manera esta interesante línea de investigación. En las perspectivas se abordan una serie de sugerencias para la continuación de esta investigación.

Tabla 11 Comunidades microbianas identificadas en procesos con vinazas y melaza

CCM	Sustrato	Microorganismos	Dp (mW/m ²)	Referencia
Dos cámaras	Vinaza mezcalera	<i>Bacteroides</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sphingobium</i> <i>Taibaiella</i>	25	Presente estudio
Dos cámaras	Vinaza tequilera	<i>Gluconobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Clostridium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Arconobacter</i> <i>Brevundimonas</i>	18	Presente estudio
Dos cámaras	Melaza	<i>Pseudomonas</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Lactobaillus</i> <i>Sphingobacterium</i> <i>Clostridium</i>	14	Presente estudio
Lodos de una destilería de melaza	Melaza	<i>Bacteroides</i> <i>Tisierella</i> <i>Firmicutes</i>	No aplica	Tripathi et al., 2022
Dos cámaras	Melaza	<i>Azospirillum</i> <i>Sulfuricurvum</i> <i>Syntrophomonas</i> <i>Curvibacter</i> <i>Clostridium</i>	3 W/m ³	Yang et al., 2022
Producción de metano	Vinaza tequilera	<i>Lactobacillus</i> <i>Acetobacter</i> <i>Sporolactobacillus</i> <i>Caproiciproducens</i>	No aplica	Arellano-García et al., 2021
Producción de hidrogeno por fermentación oscura	Vinaza tequilera	<i>Clostridium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Acetobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	No aplica	García-Depraect et al., 2021

Estos resultados muestran que una baja diversidad alfa (diversidad de Faith) se relaciona con las mayores eficiencias coulómbica obtenidas en las CCM alimentadas con las vinazas mezcalera y tequilera. Por lo tanto, la hipótesis principal de presente trabajo de investigación se cumple, lo que significa que las comunidades microbianas cambian en función del tipo de sustrato. Además, algunos microorganismos coinciden con algunos estudios similares. Sin embargo, la limitación del presente estudio es que no se considera la sucesión de las comunidades en el tiempo de operación y la viabilidad celular que representa los microorganismos metabólicamente activos.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se observaron diferencias en la densidad de potencia producida con diferentes configuraciones de CCM, con el uso o no de catalizador, pH, diferentes tipos de sustratos e inóculos. Con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que el rendimiento de una CCM se ve afectado por diferentes factores, entre ellos se encuentran los parámetros de operación que se analizaron en este trabajo.

Como consecuencia del efecto anterior y aunados los resultados de análisis de composición microbiana, también podemos afirmar que la composición microbiana presente en la biopelícula desarrollada en el ánodo de una CCM cambia en función del tipo de sustrato. Cuando se usaron vinaza tequilera y vinaza mezcalera para alimentar las CCM se pudo desarrollar consorcios electrogénicos. Además, con base a la densidad de potencia y eficiencia coulombica obtenidos, se llegó a la conclusión que las vinazas son un mejores sustratos que la melaza.

Por lo tanto podemos afirmar que se ejerció una presión selectiva por efecto del tipo de sustrato alimentado a la CCM que favoreció un cambio en las poblaciones electroactivas. Además, los análisis de diversidad beta mostraron que la biopelícula más eficiente, es decir la que se desarrolló en la CCM con mejor rendimiento de bioelectricidad, fue también la menos diversa o la menos parecida al inóculo.

Otro resultado que apoya la hipótesis de esta investigación, que los consorcios electrogénicos son menos diversos, el índice diversidad de Faith mostró que la biopelícula con menor riqueza fue la de la CCM alimentada con vinaza tequilera y la cual mostró el mejor rendimiento durante los ciclos C4 y C5. La determinación de la composición microbiana permitió identificar microorganismos previamente reportados como electroactivos y fermentativos en cada una de las CCM. Esto plantea la posibilidad de estudiar diferentes asociaciones por medio de cocultivos como una alternativa para incrementar el rendimiento de las CCM.

En esta investigación, se determinó que los lodos granulares anaerobios produjeron una mayor densidad de potencia respecto a los sedimentos usados como inóculos. El efecto se observó con una CCM de una sola cámara alimentada con acetato de sodio y sin catalizador. Se obtuvieron voltajes a circuito abierto entre 100 y 200 mV y densidades de

potencia alrededor de los 2 mW/m². Estos resultados fueron confirmados con la determinación de las resistencias internas (resistencia de la interfase y resistencia del electrolito) con EIS, los cuales mostraron una resistencia 40% mayor en la CCM inoculada con los sedimentos.

Se determinó que el catalizador incrementa sustancialmente el rendimiento del modelo de CCM de una sola cámara, por lo que se obtuvieron densidades de potencia entre 10 y 30 veces mayores respecto a la CCM de una cámara sin catalizador. Además, se observó que la melaza produce densidades de potencia ligeramente menores al control alimentado con acetato de sodio y que el tipo de sustrato genera biopelículas con distintas características observadas por microscopía electrónica de barrido.

Por otra parte, se evaluaron diferentes parámetros de operación como el tipo de sustrato, su concentración y el pH en CCM de dos cámaras utilizando los dos granulares anaerobios como inóculo. Se comprobó que el acetato de sodio es capaz de generar mayor bioelectricidad en comparación con la glucosa a la misma concentración. En algunos casos la densidad de potencia incrementó a consecuencia del aumento en la concentración de sustrato. Además, el pH 7 produjo el mejor rendimiento en este experimento.

Se determinó que las vinazas usadas como sustratos en las CCM de dos cámaras presentaron rendimientos de voltaje y densidad de potencia más altos en comparación con la melaza. También, que los resultados obtenidos en el modelado de circuitos equivalentes por EIS concuerdan con las características mostradas en la densidad de potencia y eficiencia coulombica para los ciclos C4, C5 y C6.

Se caracterizó la composición microbiana para el tratamiento de vinazas y melaza en CCM de dos cámaras, en la cual se identificaron los géneros más representativos. Entre los cuales se encontraron *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Stentrophomonas* y *Bacteroides*. También se obtuvieron los análisis de diversidad que apoyan la hipótesis de este trabajo en relación con la formación de consorcios especializados para la degradación de materia orgánica y la producción de bioelectricidad, y que los menos diversos fueron aquellos que mostraron el mejor rendimiento. Además, algunos de los microorganismos identificados en la presente investigación ya han sido reportados como

buenos degradadores de materia orgánica, como por ejemplo *Clostridium* y *Lactobacilos*. Ese hallazgo también apoya la hipótesis que suponen asociaciones colaborativas entre microorganismos degradadores y electroactivos, tal como *Pseudomonas* y otros que fueron identificados en este estudio. Una de las limitaciones en el presente estudio fue el seguimiento de la dinámica poblacional ya que por cuestiones operativas solo se colectó la muestra de la biopelícula al final de la corrida de la CCM, por lo que el diseño de nuevas técnicas de muestreo de la biopelícula son necesarias. Sin embargo, esto abre una pauta para el estudio del cambio en las composiciones de microorganismos en relaciones comensalitas en la producción de bioelectricidad en sistemas bioelectroquímicos. En las estructuras de las comunidades microbianas del presente estudio se identificaron varias posibles asociaciones entre microorganismos que ya han sido caracterizados como electroactivos, esto abre un panorama acerca del estudio de cocultivos para el desarrollo de distintos consorcios microbianos, dependiendo la naturaleza del agua residual.

PERSPECTIVAS

Se recomienda hacer aislamiento de los microorganismos más abundantes en las muestras de biopelícula de las vinazas tequileras y mezcaleras como *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacteroides* o *Stenotrophomonas* para Implementar un sistema de inoculación por cocultivos en las CCM y estudiar su asociación en función de la densidad de potencia producida en cada una de las asociaciones.

Además, se recomienda indagar acerca de los mecanismos de intercambio de electrones en dichos microorganismos haciendo un análisis inferencial con la herramienta PICRUS_t y confirmar con un estudio transcriptómico que pueda permitir una mejor definición de la relación sintrófica, así como una caracterización de los mecanismos de intercambio de electrones. Adicional a lo anterior, se recomienda cuantificar con cromatografía de gases y/o líquidos algunos metabolitos clave en el influente y efluente, tal como acetato, propionato, butirato, glucosa, etcétera; con el objetivo de identificar algunas rutas metabólicas involucradas en la relación sintrófica de los coclutivos.

Otra recomendación es afinar la técnica de EIS, para poder hacer un análisis de circuitos equivalentes y comparar con las características morfológicas de la biopelícula observadas con SEM. Además, se recomienda complementar el estudio electroquímico con un análisis de voltamperometría cíclica y lineal para analizar la degradación de sustratos con el objetivo de determinar el rendimiento real de la CCM.

Otro punto que puede complementar el estudio de redes sintróficas es el de viabilidad celular, ya que en el presente estudio no se consideran solo los microorganismos metabólicamente activos en el desempeño del bioánodo y en general el rendimiento de la CCM. Una técnica de viabilidad celular permitirá una mejor descripción de la dinámica poblacional, una limitación que se presentó en el presente estudio.

REFERENCIAS

- Adachi, T., Kitazumi, Y., Shirai, O., & Kano, K. (2021). Direct electron transfer-type bioelectrocatalysis by membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and cyanide effects on its bioelectrocatalytic properties. *Electrochemistry Communications*, 123, 106911.
- Adams, Christopher P. & Kron, Stephen Joseph, (1997). Method for performing amplification of nucleic acid with two primers bound to a single solid support", published 1997-06-24, assigned to Mosaic Technologies Inc. and Whitehead Institute for Biomedical Research
- Aelterman, P., Versichele, M., Marzorati, M., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes. *Bioresource technology*, 99(18), 8895-8902.
- Aiyer, K. S. (2021). Synergistic effects in a microbial fuel cell between co-cultures and a photosynthetic alga *Chlorella vulgaris* improve performance. *Heliyon*, 7(1), e05935.
- Amirdehi, M. A., Khodaparastasarabad, N., Landari, H., Zarabadi, M. P., Miled, A., & Greener, J. (2020). A high-performance membraneless microfluidic microbial fuel cell for stable, long-term benchtop operation under strong flow. *ChemElectroChem*, 7(10), 2227-2235.
- Arellano-García, L., Velázquez-Fernández, J. B., Macías-Muro, M., & Marino-Marmolejo, E. N. (2021). Continuous hydrogen production and microbial community profile in the dark fermentation of tequila vinasse: Response to increasing loading rates and immobilization of biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108049.
- Arreola-Vargas, J., Jaramillo-Gante, N. E., Celis, L. B., Corona-González, R. I., González-Álvarez, V., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Biogas production in an anaerobic sequencing batch reactor by using tequila vinasses: effect of pH and temperature. *Water Science and Technology*, 73(3), 550-556.
- Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT—how do these taxonomies compare? *BMC genomics*, 18(2), 114.
- Barcia, G. E. C., Cervantes, R. A. I., Zuniga, I. T., & Van Den Hende, S. (2020). Converting tequila vinasse diluted with tequila process water into microalgae-yeast flocs and dischargeable effluent. *Bioresource technology*, 300, 122644.
- Bhatti, Z. A., Syed, M., Maqbool, F., Zhao, Y. G., Ying, X., Siddiqui, M. F., & Mahmood, Q. (2022). Potential of molasses substrate for bioelectricity production in microbial fuel cell with the help of active microbial community. *International Journal of Energy Research*.
- Bian, B., Shi, D., Cai, X., Hu, M., Guo, Q., Zhang, C. & Yang, J. (2018). 3D printed porous carbon anode for enhanced power generation in microbial fuel cell. *Nano Energy*, 44, 174-180.
- Bretschger, O., Osterstock, J. B., Pinchak, W. E., Ishii, S., & Nelson, K. E. (2010). Microbial fuel cells and microbial ecology: Applications in ruminant health and production research. *Microbial Ecology*.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J. M., Emelko, M. B., & Müller, K. M. (2021). Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
- Cao, L., Ma, Y., Deng, D., Jiang, H., Wang, J., & Liu, Y. (2020). Electricity production of microbial fuel cells by degrading cellulose coupling with Cr (VI) removal. *Journal of hazardous materials*, 391, 122184.
- Cao, Y., Mu, H., Liu, W., Zhang, R., Guo, J., Xian, M., & Liu, H. (2019). Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities. *Microbial cell factories*, 18(1), 39.
- Cazetta, M. L., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Scarmino, I. S. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource technology*, 98(15), 2824-2828.
- Chae, K. J., Choi, M. J., Lee, J. W., Kim, K. Y., & Kim, I. S. (2009). Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 100(14), 3518-3525.
- Chandra, R., Bharagava, R. N., & Rai, V. (2008). Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology*, 99(11), 4648-4660.
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature biotechnology*, 21(10), 1229.

- Choudhury, P., Ray, R. N., Bandyopadhyay, T. K., Basak, B., Muthuraj, M., & Bhunia, B. (2021). Process engineering for stable power recovery from dairy wastewater using microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46 (4), 3171-3182.
- Chen, G. W., Choi, S. J., Lee, T. H., Lee, G. Y., Cha, J. H., & Kim, C. W. (2008). Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 379-388.
- Chen, L., Wang, M., Feng, Y., Xu, X., Luo, X., & Zhang, Z. (2021). Production of bioelectricity may play an important role for the survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) under anaerobic conditions. *Science of The Total Environment*, 768, 144335.
- Cheng, H. Y., Liang, B., Mu, Y., Cui, M. H., Li, K., Wu, W. M., & Wang, A. J. (2015). Stimulation of oxygen to bioanode for energy recovery from recalcitrant organic matter aniline in microbial fuel cells (MFCs). *Water research*, 81, 72-83.
- Cheng, S., & Logan, B. E. (2007). Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 9 (3), 492-496.
- Cheng, S., Dempsey, B. A., & Logan, B. E. (2007). Electricity generation from synthetic acid-mine drainage (AMD) water using fuel cell technologies. *Environmental Science & Technology*, 41(23), 8149-8153.
- Cheng, S., Kiely, P., & Logan, B. E. (2011). Pre-acclimation of a wastewater inoculum to cellulose in an aqueous-cathode MEC improves power generation in air-cathode MFCs. *Bioresource technology*, 102(1), 367-371.
- Chung, K., & Okabe, S. (2009). Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(5), 965-977.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., & Tiedje, J. M. (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(D1), D633-D642.
- CRM (2018) Consejo Regulador del Mezcal. <http://www.crm.org.mx/>. Consulta 19 de Marzo del 2019.
- Cruz-Salomón, A., Meza-Gordillo, R., Lagunas-Rivera, S., & Ventura-Canseco, C. (2017). Biogas production potential from a native beverage vinasse of Mexico. *Waste Technology*, 5(1), 9-14.
- de Jesús Franco-León, J., Arriola-Guevara, E., Suárez-Hernández, L. A., Toriz, G., Guatemala-Morales, G., & Corona-González, R. I. (2021). Influence of supplemented nutrients in tequila vinasses for hydrogen and polyhydroxybutyrate production by photofermentation with *Rhodospseudomonas pseudopalustris*. *Bioresource Technology*, 329, 124865.
- Dewan, A., Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2008). Scaling up microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 42(20), 7643-7648.
- Diaz, E., Amils, R., & Sanz, J. L. (2003). Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology*, 48(6), 57-64.
- Eriksson, J., Gharizadeh, B., Nordström, T., & Nyren, P. (2004). Pyrosequencing™ technology at elevated temperature. *Electrophoresis*, 25(1), 20-27.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, 6, 348.
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M., & Sanchez-Flores, A. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific reports*, 8(1), 12034.
- Estrada-Arriaga, E. B., Guadarrama-Pérez, O., Silva-Martínez, S., Cuevas-Arteaga, C., & Guadarrama-Pérez, V. H. (2021). Oxygen reduction reaction (ORR) electrocatalysts in constructed wetland-microbial fuel cells: effect of different carbon-based catalyst biocathode during bioelectricity production. *Electrochimica Acta*, 370, 137745.
- Faith, D. P., Reid, C. A. M., & Hunter, J. (2004). Integrating phylogenetic diversity, complementarity, and endemism for conservation assessment. *Conservation Biology*, 18(1), 255-261.
- Finch, A. S., Mackie, T. D., Sund, C. J., & Sumner, J. J. (2011). Metabolite analysis of *Clostridium acetobutylicum*: fermentation in a microbial fuel cell. *Bioresource technology*, 102(1), 312-315.
- Franks, A. E., Nevin, K. P., Jia, H., Izallalen, M., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2009). Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm. *Energy & Environmental Science*, 2(1), 113-119.

- García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2020). Upgrading of anaerobic digestion of tequila vinasse by using an innovative two-stage system with dominant lactate-type fermentation in acidogenesis. *Fuel*, *280*, 118606.
- García-Depraect, O., Muñoz, R., Rodríguez, E., Rene, E. R., & Leon-Becerril, E. (2021). Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46* (20), 11284-11296.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology*, *12*(1), 69.
- Guan, C. Y., & Yu, C. P. (2021). Evaluation of plant microbial fuel cells for urban green roofs in a subtropical metropolis. *Science of The Total Environment*, *765*, 142786.
- Guo, X., Sun, C., Lin, R., Xia, A., Huang, Y., Zhu, X., & Murphy, J. D. (2020). Effects of foam nickel supplementation on anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer. *Journal of hazardous materials*, *399*, 122830.
- Habe, H., Sato, Y., Tani, H., Matsutani, M., Tanioka, K., Theeragool, G., ... & Yakushi, T. (2021). Heterologous expression of membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding genes for glyceric acid production using *Gluconobacter* sp. CHM43 and its derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(18), 6749-6758.
- HaoYu, E., Cheng, S., Scott, K., & Logan, B. (2007). Microbial fuel cell performance with non-Pt cathode catalysts. *Journal of power sources*, *171*(2), 275-281.
- Hassan, S. H., Abd el Nasser, A. Z., & Kassim, R. M. (2019). Electricity generation from sugarcane molasses using microbial fuel cell technologies. *Energy*, *178*, 538-543.
- Hall, M., & Beiko, R. G. (2018). 16S rRNA gene analysis with QIIME2. In *Microbiome analysis* (pp. 113-129). Humana Press, New York, NY.
- Herrero-Hernandez, E., Greenfield, D., Smith, T. J., & Akid, R. (2019). Evaluation of the performance of a mediatorless microbial fuel cell by electrochemical impedance spectroscopy. *Electroanalysis*, *31*(6), 1189-1194.
- Hidalgo, D., Tommasi, T., Cauda, V., Porro, S., Chiodoni, A., Bejtka, K., & Ruggeri, B. (2014). Streamlining of commercial Berl saddles: A new material to improve the performance of microbial fuel cells. *Energy*, *71*, 615-623.
- Huang, J., Yang, P., Guo, Y., & Zhang, K. (2011). Electricity generation during wastewater treatment: An approach using an AFB-MFC for alcohol distillery wastewater. *Desalination*, *276*(1-3), 373-378.
- Huo, W., Fu, X., Bao, M., Ye, R., Shao, Y., Liu, Y., & Lu, W. Manipulating and Effect of Electron Acceptors on Caproate Production Based on Food Waste Two-Phase Chain Elongation Fermentation System. Available at SSRN 4033370.
- IEA, *International energy agency* (2018). <https://www.iea.org/>
- Ishii, S. I., Shimoyama, T., Hotta, Y., & Watanabe, K. (2008). Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *Bmc Microbiology*, *8*(1), 6.
- Ishii, S. I., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Wu, A., Yamanaka, Y., Neelson, K. H., & Bretschger, O. (2013). Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water research*, *47* (19), 7120-7130.
- Ishii, S. I., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Tenney, A., Chain, P. S., Scholz, M. B., & Bretschger, O. (2013b). A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. *Nature communications*, *4*, 1601.
- Islam, M. A., Karim, A., Mishra, P., Dubowski, J. J., Yousuf, A., Sarmin, S., & Khan, M. M. R. (2020). Microbial synergistic interactions enhanced power generation in co-culture driven microbial fuel cell. *Science of The Total Environment*, *738*, 140138.
- Jadhav, G. S., & Ghangrekar, M. M. (2009). Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration. *Bioresource Technology*, *100*(2), 717-723.
- Javed, M. M., Nisar, M. A., & Ahmad, M. U. (2021). Effect of NaCl and pH on Bioelectricity Production from Vegetable Waste Extract Supplemented with Cane Molasses in Dual Chamber Microbial Fuel Cell.
- Jeddi, M., Karray, F., Loukil, S., Mhiri, N., Ben Abdallah, M., & Sayadi, S. (2020). Anaerobic biological treatment of industrial saline wastewater: fixed bed reactor performance and analysis of the microbial community structure and abundance. *Environmental Technology*, *41* (13), 1715-1725.
- Jing, G., Sun, Z., Wang, H., Gong, Y., Huang, S., Ning, K., & Su, X. (2017). Parallel-META 3: Comprehensive taxonomical and functional analysis platform for efficient comparison of microbial communities. *Scientific reports*, *7*, 40371.

- Kandpal, R., Nara, S., Shahadat, M., Ansari, M. O., Alshahrie, A., Ali, S. W., ... & Malhotra, B. D. (2021). Impedance spectroscopic study of biofilm formation on pencil lead graphite anode in microbial fuel cell. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 128, 114-123.
- Kataoka, N., Hirata, K., Matsutani, M., Ano, Y., Nguyen, T. M., Adachi, O., & Yakushi, T. (2021). Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 1227-1236.
- Kawaichi, S., Yamada, T., Umezawa, A., McGlynn, S. E., Suzuki, T., Dohmae, N., & Nakamura, R. (2018). Anodic and Cathodic Extracellular Electron Transfer by the Filamentous Bacterium *Ardenticatena maritima* 110S. *Frontiers in microbiology*, 9, 68.
- Kim, H. J., Kim, J. H., Jeon, Y., & Kim, S. (2022). Co-substrate-fed microbial fuel cell for enhanced power generation and removal of groundwater contaminants. *Bulletin of the Korean Chemical Society*.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(17), 5112-5120.
- Kracke, F., & Krömer, J. O. (2014). Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC bioinformatics*, 15(1), 410.
- Krishnaraj, R. N., Berchmans, S., & Pal, P. (2015). The three-compartment microbial fuel cell: a new sustainable approach to bioelectricity generation from lignocellulosic biomass. *Cellulose*, 22(1), 655-662.
- Kubota, K., Watanabe, T., Yamaguchi, T., & Syutsubo, K. (2016). Characterization of wastewater treatment by two microbial fuel cells in continuous flow operation. *Environmental technology*, 37(1), 114-120.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current protocols in microbiology*, 27(1), 1E-5.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., & Beiko, R. G. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814.
- Lapinonnière, L., Picot, M., Poriel, C., & Barrière, F. (2013). Phenylboronic acid modified anodes promote faster biofilm adhesion and increase microbial fuel cell performances. *Electroanalysis*, 25(3), 601-605.
- Lee, Y. Y., Kim, T. G., & Cho, K. S. (2016). Characterization of the COD removal, electricity generation, and bacterial communities in microbial fuel cells treating molasses wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51 (13), 1131-1138.
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23 (1), 127-128.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49 (W1), W293-W296.
- Li, F., Yin, C., Sun, L., Li, Y., Guo, X., & Song, H. (2018). Synthetic *Klebsiella pneumoniae*-*Shewanella oneidensis* consortium enables glycerol-fed high-performance microbial fuel cells. *Biotechnology Journal*, 13 (5), 1700491.
- Li, M., & Zhou, S. (2019). Efficacy of Cu (II) as an electron-shuttle mediator for improved bioelectricity generation and Cr (VI) reduction in microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 273, 122-129.
- Li, S., Cheng, C., & Thomas, A. (2017). Carbon-Based Microbial-Fuel-Cell Electrodes: From Conductive Supports to Active Catalysts. *Advanced Materials*. Wiley-VCH Verlag.
- Li, X. M., Cheng, K. Y., Selvam, A., & Wong, J. W. (2013). Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: effect of microbial inocula. *Process Biochemistry*, 48 (2), 283-288.
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., & Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 562 (7725), 140.
- Liu, H., Ramnarayanan, R., & Logan, B. E. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental science & technology*, 38 (7), 2281-2285.

- Liu, J., Guo, T., Wang, D., & Ying, H. (2015). Clostridium beijerinckii mutant obtained atmospheric pressure glow discharge generates enhanced electricity in a microbial fuel cell. *Biotechnology letters*, 37 (1), 95-100.
- Liu, J., Wang, X., Wang, Z., Lu, Y., Li, X., & Ren, Y. (2017). Integrating microbial fuel cells with anaerobic acidification and forward osmosis membrane for enhancing bio-electricity and water recovery from low-strength wastewater. *Water Research*, 110, 74-82.
- Liu, Q., Yang, Y., Mei, X., Liu, B., Chen, C., & Xing, D. (2018). Response of the microbial community structure of biofilms to ferric iron in microbial fuel cells. *Science of the Total Environment*, 631, 695-701.
- Liu, X. W., Huang, Y. X., Sun, X. F., Sheng, G. P., Zhao, F., Wang, S. G., & Yu, H. Q. (2014). Conductive carbon nanotube hydrogel as a bioanode for enhanced microbial electrocatalysis. *ACS applied materials & interfaces*, 6 (11), 8158-8164.
- López Velarde Santos, M., Rodríguez Valadéz, F. J., Mora Solís, V., González Nava, C., Cornejo Martell, A. J., & Hensel, O. (2017). Performance of a microbial fuel cell operated with vinasses using different COD concentrations. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 521-528.
- Luo, J., Li, X., Zhang, J., Feng, A., Xia, M., & Zhou, M. (2020). Global regulator engineering enhances bioelectricity generation in Pseudomonas aeruginosa-inoculated MFCs. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112269.
- Luo, Y., Zhang, F., Wei, B., Liu, G., Zhang, R., & Logan, B. E. (2013). The use of cloth fabric diffusion layers for scalable microbial fuel cells. *Biochemical engineering journal*, 73, 49-52.
- Logan, B. E. & Liu, H. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environmental science & technology*, 38 (14), 4040-4046.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*, 40(17), 5181-5192.
- Logan, B., Cheng, S., Watson, V., & Estadt, G. (2007). Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environmental science & technology*, 41 (9), 3341-3346.
- Logan, B. E., Zikmund, E., Yang, W., Rossi, R., Kim, K. Y., Saikaly, P. E., & Zhang, F. (2018). Impact of Ohmic Resistance on Measured Electrode Potentials and Maximum Power Production in Microbial Fuel Cells. *Environmental science & technology*, 52(15), 8977-8985.
- López Velarde Santos, M., Rodríguez Valadéz, F. J., Mora Solís, V., González Nava, C., Cornejo Martell, A. J., & Hensel, O. (2017). Performance of a microbial fuel cell operated with vinasses using different COD concentrations. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33 (3), 521-528.
- Ma, C., Wen, H., Xing, D., Pei, X., Zhu, J., Ren, N., & Liu, B. (2017). Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant Scenedesmus sp. Z-4. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 111.
- Ma, J., Wang, Z., Zhang, J., Waite, T. D., & Wu, Z. (2017b). Cost-effective Chlorella biomass production from dilute wastewater using a novel photosynthetic microbial fuel cell (PMFC). *Water research*, 108, 356-364.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963.
- Mäkinen, A. E., Lay, C. H., Nissilä, M. E., & Puhakka, J. A. (2013). Bioelectricity production on xylose with a compost enrichment culture. *International journal of hydrogen energy*, 38(35), 15606-15612.
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839.
- Marks, J., Kinkel, J., Sekoai, P., Enweremadu, C., & Daramola, M. (2020). Effect of Combining Different Substrates and Inoculum Sources on Bioelectricity Generation and COD Removal in a Two-Chambered Microbial FuelCell: A Preliminary Investigation. *Rigas Tehniskas Universitates Zinatniskie Raksti*, 24 (2), 67-78.
- Martins, F., Felgueiras, C., Smitkova, M., & Caetano, N. (2019). Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in European countries. *Energies*, 12(6), 964.
- Mehta, T., Coppi, M. V., Childers, S. E., & Lovley, D. R. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe (III) and Mn (IV) oxide reduction in Geobacter sulfurreducens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12), 8634-8641.
- Mei, B. A., Munteshari, O., Lau, J., Dunn, B., & Pilon, L. (2017). Physical interpretations of Nyquist plots for EDLC electrodes and devices. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(1), 194-206.

- Mendez-Acosta H.O., Snell-Castro R., Alcaraz-Gonzalez V., Gonzalez- Alvarez V., Pelayo-Ortiz C. Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester. *Biodegradation* 2010;21:357e63.
- Mohanakrishna, G., Mohan, S. V., & Sarma, P. N. (2010). Bio-electrochemical treatment of distillery wastewater in microbial fuel cell facilitating decolorization and desalination along with power generation. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 487-494.
- Moguel-Castañeda, J. G., Puebla, H., Méndez-Acosta, H. O., & Hernandez-Martinez, E. (2020). Modeling pH and temperature effects on the anaerobic treatment of tequila vinasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(7), 1953-1961.
- Moran-Salazar, R. G., Sanchez-Lizarraga, A. L., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G., Marino-Marmolejo, E. N., Dendooven, L., & Contreras-Ramos, S. M. (2016). Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *SpringerPlus*, 5(1), 1007.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Negassa, L. W., Mohiuddin, M., & Tiruye, G. A. (2021). Treatment of brewery industrial wastewater and generation of sustainable bioelectricity by microbial fuel cell inoculated with locally isolated microorganisms. *Journal of Water Process Engineering*, 41, 102018.
- Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*, 2(1), 1-8.
- NOU, (2018). *Official Norwegian reports*. <https://www.regjeringen.no>
- Oh, S. E., & Logan, B. E. (2006). Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(2), 162-169.
- Otoni, C. A., Simões, M. F., Santos, J. G., Peixoto, L., Martins, C. R., Silva, B. P., & Maiorano, A. E. (2019). Application of microbial fuel cell technology for vinasse treatment and bioelectricity generation. *Biotechnology letters*, 41(1), 107-114.
- Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., & Mammi, L. (2020). Characterization of molasses chemical composition *Journal of dairy science*, 103(7), 6244-6249.
- Park, J. D., Roane, T. M., Ren, Z. J., & Alaraj, M. (2017). Dynamic modeling of a microbial fuel cell considering anodic electron flow and electrical charge storage. *Applied Energy*, 93, 507-514.
- Paster, B. J., & Dewhirst, F. E. (1988). Phylogeny of campylobacters, wolinelas, *Bacteroides gracilis*, and *Bacteroides ureolyticus* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 56-62.
- Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., & Mammi, L. (2020). Characterization of molasses chemical composition. *Journal of dairy science*, 103 (7), 6244-6249.
- Patil, S. A., Surakasi, V. P., Koul, S., Ijmulwar, S., Vivek, A., Shouche, Y. S., & Kapadnis, B. P. (2009). Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. *Bioresource technology*, 100(21), 5132-5139.
- Pietruszka, W. D. (2012). MATLAB® and Simulink® in engineering practice. Wiesbaden: Vieweg Teubner Verlag.
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., & Gorby, Y. A. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883-12888.
- Plekhanova, Y., Tarasov, S., Bykov, A., Prisyazhnaya, N., Kolesov, V., Sigaev, V., & Reshetilov, A. (2019). Multiwalled Carbon Nanotubes and the Electrocatalytic Activity of *Gluconobacter oxydans* as the Basis of a Biosensor. *Biosensors*, 9(4), 137.
- Portilla, O. M., Espinosa, V., Jarquin, L., Salinas, A., Velazquez, G., & Vazquez, M. (2017). Sugar cane molasses as culture media component for microbial transglutaminase production.
- Quail, M. A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P. J., Durbin, R., ... & Turner, D. J. (2008). A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature methods*, 5(12), 1005-1010.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

- Raghavulu, S. V., Goud, R. K., Sarma, P. N., & Mohan, S. V. (2011). Saccharomyces cerevisiae as anodic biocatalyst for power generation in biofuel cell: influence of redox condition and substrate load. *Bioresource technology*, 102(3), 2751-2757.
- Rahimnejad, M., Ghoreyshi, A. A., Najafpour, G., & Jafary, T. (2011). Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial fuel cell operations. *Applied Energy*, 88(11), 3999-4004.
- Ramírez-Ramírez, A. A., Sulbarán-Rangel, B. C., Jáuregui-Rincón, J., Lozano-Álvarez, J. A., la Torre, J. A., & Zurita-Martínez, F. (2021). Preliminary Evaluation of Three Species of Lignolytic Fungi for Their Possible Incorporation in Vertical Flow Treatment Wetlands for the Treatment of Tequila Vinasse. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232 (11), 1-16.
- Ren, H., Lee, H. S., Zhang, J., Gardner, C. L., & Chae, J. (2021). A quantitative extracellular electron transfer (EET) kinetics study of Geobacter sulfurreducens enriched microbial community reveals the transition of EET limiting step during biofilm growth. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(4), 3124-3134.
- Ren, J., Li, N., Du, M., Zhang, Y., Hao, C., & Hu, R. (2021). Study on the effect of synergy effect between the mixed cultures on the power generation of microbial fuel cells. *Bioengineered*, 12(1), 844-854.
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 278-289.
- Rivalland, C., Radouani, F., Gonzalez-Rizzo, S., Robert, F., & Salvin, P. (2022). Enrichment of Clostridia enhances Geobacter population and electron harvesting in a complex electroactive biofilm. *Bioelectrochemistry*, 143, 107954.
- Robles-González V., Galíndez-Mayer J., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H. (2012) Treatment of mezcal vinasses: a review. *J Biotechnol* 157:521–546
- Rocca, J. D., Simonin, M., Blaszcak, J. R., Ernakovich, J. G., Gibbons, S. M., Midani, F. S., & Washburne, A. D. (2018). The Microbiome Stress Project: towards a global meta-analysis of environmental stressors and their effects on microbial communities. *Frontiers in microbiology*, 9, 3272.
- Rojas-Flores, S., Pérez-Delgado, O., Nazario-Naveda, R., Rojas-Alfaro, H., Benites, S. M., La Cruz-Noriega, D., & Otiniano, N. M. (2021). Potential Use of Papaya Waste as a Fuel for Bioelectricity Generation. *Processes*, 9(10), 1799.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., & Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry*, 242 (1), 84-89.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.
- Sakdaronnarong, C. K., Thanosawan, S., Chaithong, S., Sinbuathong, N., & Jeraputra, C. (2013). Electricity production from ethanol stillage in two-compartment MFC. *Fuel*, 107, 382-386.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santos, M. L. V., Valadéz, F. J. R., Solís, V. M., Nava, C. G., Martell, A. J. C., & Hensel, O. (2017). Performance of a microbial fuel cell operated with vinasses using different cod concentrations. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 521-528.
- Saratale, G. D., Saratale, R. G., Shahid, M. K., Zhen, G., Kumar, G., Shin, H. S. & Kim, S. H. (2017). A comprehensive overview on electro-active biofilms, role of exo-electrogens and their microbial niches in microbial fuel cells (MFCs). *Chemosphere*, 178, 534-547.
- Sciarria, T. P., Arioli, S., Gargari, G., Mora, D., & Adani, F. (2019). Monitoring microbial communities' dynamics during the start-up of microbial fuel cells by high-throughput screening techniques. *Biotechnology Reports*, 21, e00310.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., & Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods*, 9(8), 811.
- Sekar, N., Umasankar, Y., & Ramasamy, R. P. (2014). Photocurrent generation by immobilized cyanobacteria via direct electron transport in photo-bioelectrochemical cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(17), 7862-7871.
- Sevda, S., Dominguez-Benetton, X., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Sreerkrishnan, T. R., & Pant, D. (2013). High strength wastewater treatment accompanied by power generation using air cathode microbial fuel cell. *Applied energy*, 105, 194-206.
- Shabani, M., Pontié, M., Younesi, H., Nacef, M., Rahimpour, A., Rahimnejad, M., & Bouchenak Khelladi, R. M. (2021). Biodegradation of acetaminophen and its main by-product 4-aminophenol by Trichoderma harzianum versus mixed biofilm of Trichoderma harzianum/Pseudomonas fluorescens in a fungal microbial fuel cell. *Journal of Applied Electrochemistry*, 51 (4), 581-596.

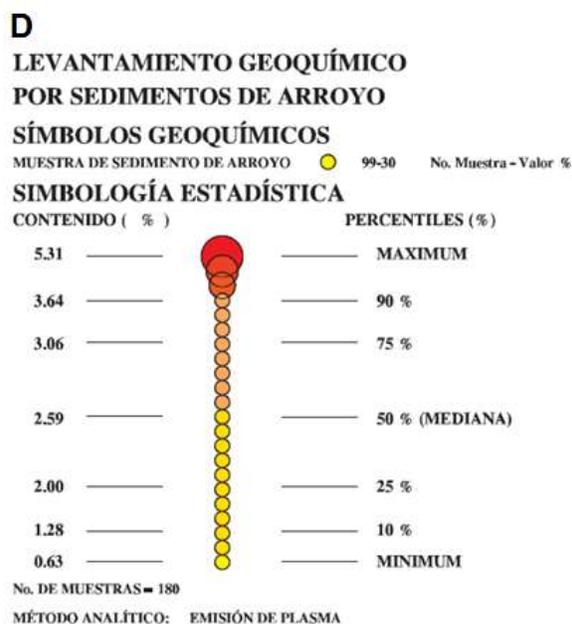
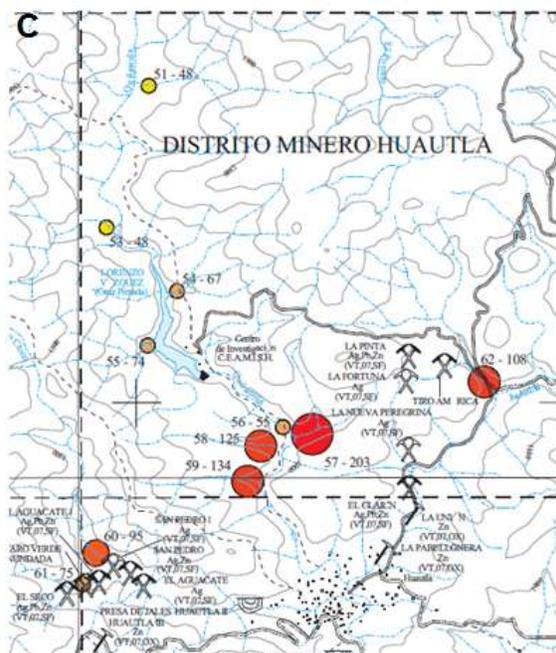
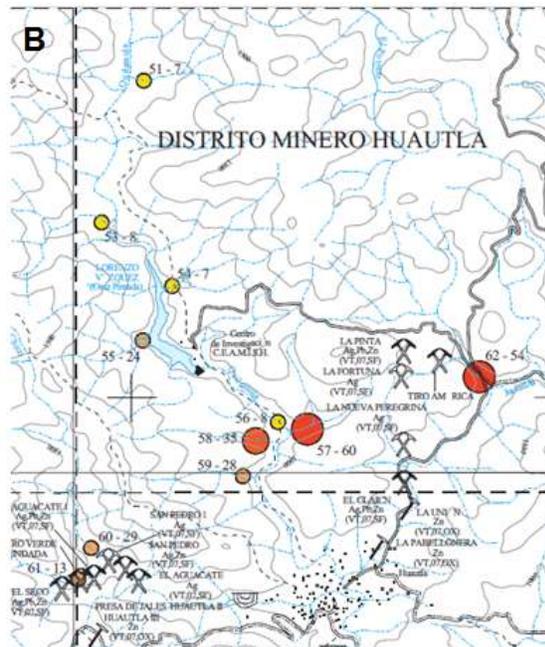
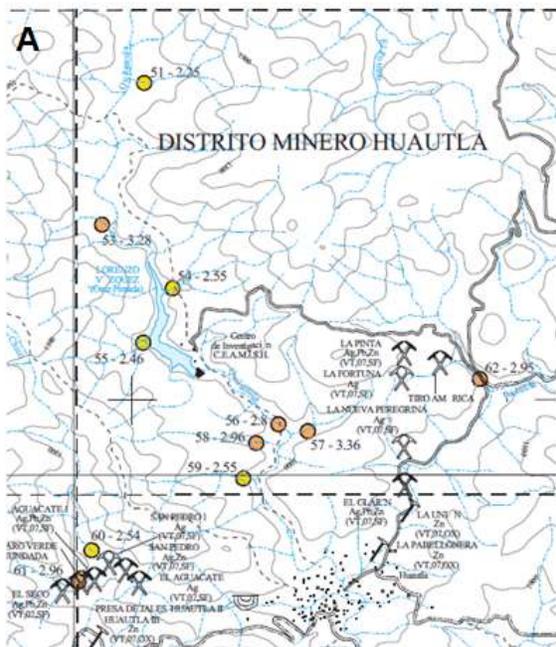
- Shah, N., Molloy, E. K., Pop, M., & Warnow, T. (2021). TIPP2: metagenomic taxonomic profiling using phylogenetic markers. *Bioinformatics*, 37(13), 1839-1845.
- Sheoran, A., Yadav, B. S., Nigam, P., & Singh, D. (1998). Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 38(2), 123-128.
- Shi, L., Squier, T. C., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2007). Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme c-type cytochromes. *Molecular microbiology*, 65(1), 12-20.
- Sindhuja, M., Kumar, N. S., Sudha, V., & Harinipriya, S. (2016). Equivalent circuit modeling of microbial fuel cells using impedance spectroscopy. *Journal of Energy Storage*, 7, 136-146.
- Singh, K., Tripathi, S., & Chandra, R. (2021). Maillard reaction product and its complexation with environmental pollutants: A comprehensive review of their synthesis and impact. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100779.
- Sirinutsomboon, B. (2014). Modeling of a membraneless single-chamber microbial fuel cell with molasses as an energy source. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5(2-3), 93.
- Smith, J. A., Tremblay, P. L., Shrestha, P. M., Snoeyenbos-West, O. L., Franks, A. E., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2014). Going wireless: Fe (III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01122.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674.
- Sogani, M., Pankan, A. O., Dongre, A., Yunus, K., & Fisher, A. C. (2021). Augmenting the biodegradation of recalcitrant ethinylestradiol using *Rhodospseudomonas palustris* in a hybrid photo-assisted microbial fuel cell with enhanced bio-hydrogen production. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124421.
- Thapa, B. S., & TS, C. (2019). *Kluyvera georgiana* MCC 3673: a novel electrogen enriched in microbial fuel cell fed with oilseed cake. *Current Microbiology*, 76 (5), 650-657.
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., ... & Navas-Molina, J. A. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551(7681), 457.
- Thorne, R., Hu, H., Schneider, K., Bombelli, P., Fisher, A., Peter, L. M., & Cameron, P. J. (2011). Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*, 21(44), 18055-18060.
- Thulasinathan, B., Nainamohamed, S., Samuel, J. O. E., Soorangkattan, S., Muthuramalingam, J., Kulanthaisamy, M., & Alagarsamy, A. (2019). Comparative study on *Cronobacter sakazakii* and *Pseudomonas otitidis* isolated from septic tank wastewater in microbial fuel cell for bioelectricity generation. *Fuel*, 248, 47-55.
- Toğrul, H., & Arslan, N. (2004). Mathematical model for prediction of apparent viscosity of molasses. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 281-289.
- Tripathi, S., Purchase, D., Al-Rashed, S., & Chandra, R. (2022). Microbial community dynamics and their relationships with organic and metal pollutants of sugarcane molasses-based distillery wastewater sludge. *Environmental Pollution*, 292, 118267.
- Wang, A., Liu, L., Sun, D., Ren, N., & Lee, D. J. (2010). Isolation of Fe (III)-reducing fermentative bacterium *Bacteroides* sp. W7 in the anode suspension of a microbial electrolysis cell (MEC). *International journal of hydrogen energy*, 35(7), 3178-3182.
- Wang, H., Chen, P., Zhang, S., Jiang, J., Hua, T., & Li, F. (2022). Degradation of pyrene using single-chamber air-cathode microbial fuel cells: Electrochemical parameters and bacterial community changes. *Science of The Total Environment*, 804, 150153.
- Wang, J., Song, X., Wang, Y., Zhao, Z., Wang, B., & Yan, D. (2017). Effects of electrode material and substrate concentration on the bioenergy output and wastewater treatment in air-cathode microbial fuel cell integrating with constructed wetland. *Ecological Engineering*, 99, 191-198.
- Wang, R., Li, H., Sun, J., Zhang, L., Jiao, J., Wang, Q., & Liu, S. (2021). Nanomaterials facilitating microbial extracellular electron transfer at interfaces. *Advanced Materials*, 33 (6), 2004051.
- Wang, V. B., Chua, S. L., Cao, B., Seviour, T., Nesatyy, V. J., Marsili, E., & Yang, L. (2013). Engineering PQS biosynthesis pathway for enhancement of bioelectricity production in *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cells. *PLoS one*, 8(5), e63129.

- Wang, Y., Lin, Z., Su, X., Zhao, P., Zhou, J., He, Q., & Ai, H. (2019). Cost-effective domestic wastewater treatment and bioenergy recovery in an immobilized microalgal-based photoautotrophic microbial fuel cell (PMFC). *Chemical Engineering Journal*, 372, 956-965.
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1), 1-18.
- Wilkinson, T. J., Huws, S. A., Edwards, J. E., Kingston-Smith, A. H., Siu-Ting, K., Hughes, M., & Creevey, C. J. (2018). CowPI: a rumen microbiome focussed version of the PICRUSt functional inference software. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Wong, C. N. A., Ng, P., & Douglas, A. E. (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental microbiology*, 13(7), 1889-1900.
- Wu, C. H., Liu, S. H., Chu, H. L., Li, Y. C., & Lin, C. W. (2017). Feasibility study of electricity generation and organics removal for a molasses wastewater by a waterfall-type microbial fuel cell. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 78, 150-156.
- Xia, X., Cao, X. X., Liang, P., Huang, X., Yang, S. P., & Zhao, G. G. (2010). Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 383-390.
- Xu, C., Poon, K., Choi, M. M., & Wang, R. (2015). Using live algae at the anode of a microbial fuel cell to generate electricity. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15621-15635.
- Yang, J., Cao, X., Sun, Y., Yang, G., & Yi, W. (2022). Recovery of microbial fuel cells with high COD molasses wastewater and analysis of the microbial community. *Biomass and Bioenergy*, 161, 106450.
- Yang, X., & Chen, S. (2021). Microorganisms in sediment microbial fuel cells: Ecological niche, microbial response, and environmental function. *Science of The Total Environment*, 756, 144145.
- Yang, Y., Xu, P., Dong, S., Yu, Y., Chen, H., & Xiao, J. (2021). Using watermelon rind and nitrite-containing wastewater for electricity production in a membraneless biocathode microbial fuel cell. *Journal of Cleaner Production*, 307, 127306.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635.
- Yong, Y. C., Yu, Y. Y., Li, C. M., Zhong, J. J., & Song, H. (2011). Bioelectricity enhancement via overexpression of quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 87-92.
- Zhang, B., Zhao, H., Zhou, S., Shi, C., Wang, C., & Ni, J. (2009). A novel UASB–MFC–BAF integrated system for high strength molasses wastewater treatment and bioelectricity generation. *Bioresour Technol*, 100(23), 5687-5693.
- Zhang, L., Zhou, S., Zhuang, L., Li, W., Zhang, J., Lu, N., & Deng, L. (2008). Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochemistry communications*, 10(10), 1641-1643.
- Zhang, L., Zhu, X., Li, J., Liao, Q., & Ye, D. (2011). Biofilm formation and electricity generation of a microbial fuel cell started up under different external resistances. *Journal of Power Sources*, 196(15), 6029-6035.
- Zhang, X., Cheng, S., Huang, X., & Logan, B. E. (2010). The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 659-664.
- Zhang, Y. J., Sun, C. Y., Liu, X. Y., Han, W., Dong, Y. X., & Li, Y. F. (2013). Electricity production from molasses wastewater in two-chamber microbial fuel cell. *Water Science and Technology*, 68(2), 494-498.
- Zhao, N., Angelidaki, I., & Zhang, Y. (2017). Electricity generation and microbial community in response to short-term changes in stack connection of self-stacked submersible microbial fuel cell powered by glycerol. *Water Research*, 109, 367-374.
- Zhao, X., Huang, J., Lu, J., & Sun, Y. (2019). Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 218-226.
- Zhao, Y. G., Zhang, Y., She, Z., Shi, Y., Wang, M., Gao, M., & Guo, L. (2017). Effect of Substrate Conversion on Performance of Microbial Fuel Cells and Anodic Microbial Communities. *Environmental Engineering Science*.
- Zheng, S., Yang, F., Chen, S., Liu, L., Xiong, Q., Yu, T. & Hou, H. (2015). Binder-free carbon black/stainless steel mesh composite electrode for high-performance anode in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 284, 252-257.

Zhong, K., Li, M., Yang, Y., Zhang, H., Zhang, B., Tang, J., ... & Yang, Z. (2019). Nitrogen-doped biochar derived from watermelon rind as oxygen reduction catalyst in air cathode microbial fuel cells. *Applied Energy*, 242, 516-525.

ANEXOS

Anexo 1. Reporte de levantamiento geoquímico por sedimentos de arroyo para los metales Fe (A), Pb (B) y Zn (C), características del estudio del servicio geológico Mexicano (D)



Anexo 2. Código para arduino del sistema de recolección de datos (voltímetro)

```
const int entrada = A0;
const int entrada2 = A1;
const int entrada3= A2;
const int entrada4= A3;
const int entrada5= A4;
int CCM1= 0;
int CCM2= 0;
int CCM3= 0;
int CCM4= 0;
int CCM5= 0;
float VoltajeCCM1 = 0;
float VoltajeCCM2 = 0;
float VoltajeCCM3= 0;
float VoltajeCCM4= 0;
float VoltajeCCM5= 0;
void setup(){
pinMode(entrada, INPUT);
Serial.begin(9600);
}
void loop(){
CCM1 = analogRead(entrada);
VoltajeCCM1 = (CCM1 * 5.0 )/ 1024.0;
Serial.print("CCM1 (V)= ");
Serial.println(VoltajeCCM1,5);
delay(1);
CCM2 = analogRead(entrada2);
VoltajeCCM2 = (CCM2 * 5.0 )/ 1024.0;
Serial.print("CCM2 (V)= ");
Serial.println(VoltajeCCM2,5);
delay(1);
CCM3 = analogRead(entrada3);
VoltajeCCM3 = (CCM3 * 5.0 )/ 1024.0;
Serial.print("CCM3 (V)= ");
Serial.println(VoltajeCCM3,5);
delay(1);
CCM4 = analogRead(entrada4);
VoltajeCCM4 = (CCM4 * 5.0 )/ 1024.0;
Serial.print("CCM4 (V)= ");
Serial.println(VoltajeCCM4,5);
delay(1);
CCM5 = analogRead(entrada5);
VoltajeCCM5 = (CCM5 * 5.0 )/ 1024.0;
Serial.print("CCM5 (V)= ");
Serial.println(VoltajeCCM5,6);
delay(1);
delay (14400000);
}
```

Anexo 3. Sistema de colección de datos basado en la placa arduino



Anexo 4. Prueba de Tukey para la remoción de DQO

Within each column, compare rows (simple effects within columns)

Number of families 3
 Number of comparisons per family 3
 Alpha 0.05
 Tukey's multiple comparisons test Mean Diff. 95% CI of diff. Significant? Summary

MC

C4 vs. C5 1.000 -7.219 to 9.219 No ns
 C4 vs. C6 17.50 9.281 to 25.72 Yes ***
 C5 vs. C6 16.50 8.281 to 24.72 Yes ***

VT

C4 vs. C5 -3.500 -11.72 to 4.719 No ns
 C4 vs. C6 5.500 -2.719 to 13.72 No ns
 C5 vs. C6 9.000 0.7806 to 17.22 Yes *

VM

C4 vs. C5 13.50 5.281 to 21.72 Yes **
 C4 vs. C6 1.000 -7.219 to 9.219 No ns
 C5 vs. C6 -12.50 -20.72 to -4.281 Yes **

Test details

	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	F
MC								
C4 vs. C5	55.00	54.00	1.000	2.944	2	2	0.480	9
C4 vs. C6	55.00	37.50	17.50	2.944	2	2	8.407	9
C5 vs. C6	54.00	37.50	16.50	2.944	2	2	7.926	9
VT								
C4 vs. C5	50.00	53.50	-3.500	2.944	2	2	1.681	9
C4 vs. C6	50.00	44.50	5.500	2.944	2	2	2.642	9
C5 vs. C6	53.50	44.50	9.000	2.944	2	2	4.323	9
VM								
C4 vs. C5	57.00	43.50	13.50	2.944	2	2	6.485	9
C4 vs. C6	57.00	56.00	1.000	2.944	2	2	0.480	9

Anexo 5. Prueba de Tukey para la eficiencia coulombica.

Within each column, compare rows (simple effects within columns)

Number of families 3
 Number of comparisons per family 3
 Alpha 0.05
 Tukey's multiple comparisons test Mean Diff. 95% CI of diff. Significant? Summary

MC

C4 vs. C5 2.819 1.212 to 4.426 Yes **
 C4 vs. C6 1.086 -0.5207 to 2.693 No ns
 C5 vs. C6 -1.733 -3.340 to -0.1258 Yes *

VT

C4 vs. C5 -0.1990 -1.806 to 1.408 No ns
 C4 vs. C6 -2.497 -4.104 to -0.8899 Yes **
 C5 vs. C6 -2.298 -3.905 to -0.6909 Yes **

VM

C4 vs. C5 0.5522 -1.055 to 2.159 No ns
 C4 vs. C6 -1.081 -2.688 to 0.5263 No ns
 C5 vs. C6 -1.633 -3.240 to -0.02590 Yes *

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	
MC					
C4 vs. C5	7.454	4.635	2.819	0.5756	.927
C4 vs. C6	7.454	6.368	1.086	0.5756	.669
C5 vs. C6	4.635	6.368	-1.733	0.5756	.258
VT					
C4 vs. C5	7.695	7.894	-0.1990	0.5756	.4889
C4 vs. C6	7.695	10.19	-2.497	0.5756	.135
C5 vs. C6	7.894	10.19	-2.298	0.5756	.646
VM					
C4 vs. C5	8.762	8.210	0.5522	0.5756	.357
C4 vs. C6	8.762	9.843	-1.081	0.5756	.655
C5 vs. C6	8.210	9.843	1.633	0.5756	.012

Anexo 6. Prueba de Tukey para la densidad de potencia.

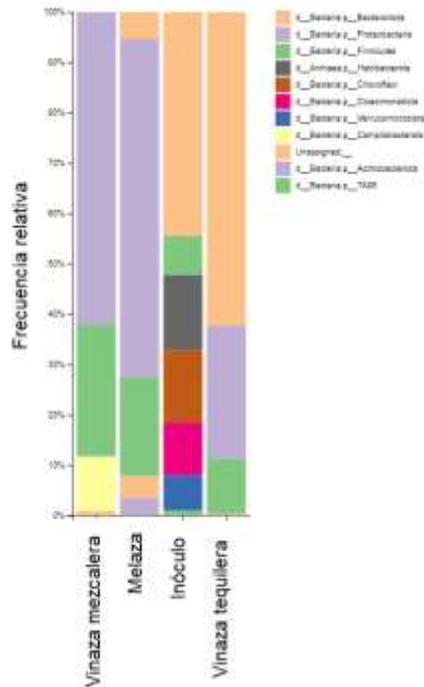
Compare column means (main column effect)

Number of families 1
 Number of comparisons per family 3
 Alpha 0.05

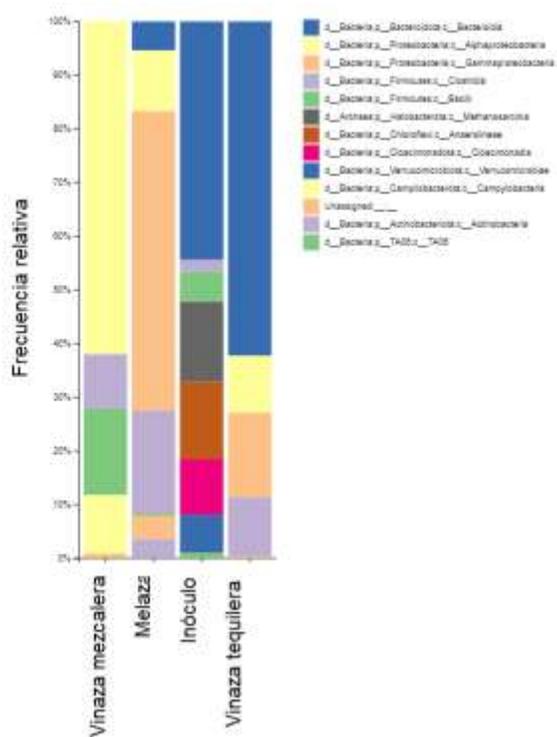
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Vinaza tequilera vs. Melaza caña de azucar	5.466	1.076 to 9.856	Yes	*
Vinaza tequilera vs. Vinaza mezcalera	-2.116	-6.506 to 2.274	No	ns
Melaza caña de azucar vs. Vinaza mezcalera	-7.582	-11.97 to -3.192	Yes	***

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2
Vinaza tequilera vs. Melaza caña de azucar	12.04	6.575	5.466	1.720	9	9
Vinaza tequilera vs. Vinaza mezcalera	12.04	14.16	-2.116	1.720	9	9
Melaza caña de azucar vs. Vinaza mezcalera	6.575	14.16	-7.582	1.720	9	9

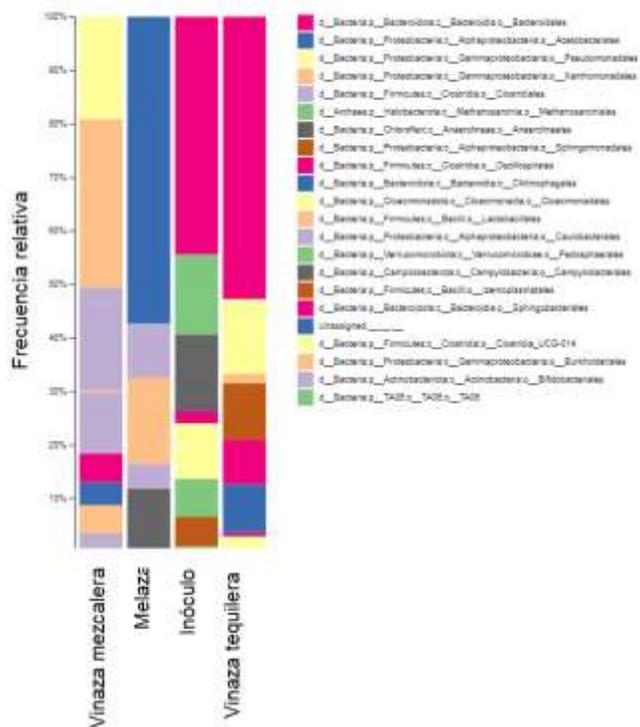
Anexo 7. Calsificación taxonómica a nivel de Phylum



Anexo 8. Calsificación taxonómica a nivel de Clase



Anexo 9. Calsificación taxonómica a nivel de Orden



Anexo 10. Analisis estadístico de la producción de voltaje en CCM de dos cámaras

Compare column means (main column effect)

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary		
Vinaza mezcalera vs. Melaza	23.59	9.374 to 37.80	Yes	***		
Vinaza mezcalera vs. Vinaza tequilera	8.067	-6.148 to 22.28	No	ns		
Melaza vs. Vinaza tequilera	-15.52	-29.74 to -1.307	Yes	*		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2
Vinaza mezcalera vs. Melaza	94.33	70.74	23.59	5.815	18	18
Vinaza mezcalera vs. Vinaza tequilera	94.33	86.26	8.067	5.815	18	18
Melaza vs. Vinaza tequilera	70.74	86.26	-15.52	5.815	18	18

Esta página fue dejada en blanco intencionalmente.