

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Y
UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS



**MASTER OFICIAL EN HIDROLOGÍA
Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS**

PROYECTO DE FIN DE MASTER

**BIODREGADACIÓN ELECTROGÉNICA DE ACETATO
EN PILAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS**

AUTOR:
Zulema Borjas Hernández

DIRECTOR:
Dra. Abraham Esteve Núñez(UAH)

Alcalá de Henares, 15 de Junio de 2012

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	7
Pilas o celdas de combustible microbianas [Microbial Fuel Cells-MFCs).....	9
Los microorganismos en una MFC: microorganismos electrogénicos.....	11
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
Cultivo discontinuo (batch) de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	15
Cultivo continuo (quimiostao)de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	17
Celda de combustible microbiana.....	19
Ensayo electroquímico.....	20
Cromatografía Líquida de Alta Presión.....	20
Resultados	21
Ensayo en MFC con medio mínimo	22
Ensayo de la influencia del inóculo sobre la MFC.....	23
Ensayos de competidores y de inhibidores.....	24
Ensayo con agua residual real.....	28
Discusión	31
Conclusiones	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una MFC.....	10
Figura 2. Respiración de Fe(III).....	11
Figura 3. <i>Geobacter sulfurreducens</i> sobre electrodo polarizado.....	12
Figura 4. Los electrones resultantes de la oxidación de un sustrato intracelular son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor terminal de electrones extracelular.....	12
Figura 5. Cultivo anaerobio de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	13
Figura 6. Representación de las diversas formas de transferencia electrónica.....	13
Figura 7. Esquema de la introducción de MFC en la depuración de aguas residuales.....	15
Figura 8. A la izquierda, esquema de los elementos del sistema en continuo o quimiostato. A la derecha, fotografía de los elementos del quimiostato de 21 utilizado en el proyecto.....	18
Figura 9. A la izquierda, fotografía del prototipo MFC en posición frontal de donde se distinguen en la parte inferior las conexiones de entrada a la celda. A la derecha, perfil del prototipo donde se aprecia cada uno de los casetes y marcos que la constituye.....	19
Figura 10. Fotografía de la disposición las partículas de grafito en la cámara anódica de la MFC.....	20
Figura 11. Cronoamperometría obtenida en la MFC a partir de la oxidación electrogénica de acetato por <i>G.sulfurreducens</i>	22

Figura 12. Figura 12. Fotografías del biorreactor de 2l con cultivo de <i>G.sulfurreducens</i> en limitación de ATE utilizado para inocular la MFC.....	22
Figura 13. Gráfico de la cronoamperometría obtenida tras la inoculación de un cultivo limitado en ATE en la MFC.....	23
Figura 14. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 0,5ppm de nitrato, potencial aceptor de electrones presente en aguas residuales.....	25
Figura 15. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 1,5 ppm de nitrato.....	26
Figura 16. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 70ppm de sulfato.....	26
Figura 17. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 10ppm y 100ppm de Fe(III).....	27
Figura 18. Cronoamperometría durante el burbujeo de hasta 2ppm de O ₂ en la que se observa una oxidación parcial de las células y una recuperación de las mismas a las pocas horas.....	28
Figura 19. Cronoamperometría con agua residual. Las adiciones corresponde con un incremento de 30mM de buffer bicarbonato.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Composición de sales del medio mínimo FWM.....	16
Tabla 2. Composición del stock de minerales.....	16
Tabla 3. Composición del stock de vitaminas.	18
Tabla 4. Datos de concentración de acetato obtenidos por HPLC.....	24
Tabla 5. Características del agua residual procedente de una laguna anaerobia.....	29

RESUMEN

Las pilas de combustible microbianas (MFC) son dispositivos que permiten la obtención de energía eléctrica a partir de energía química teniendo como catalizador a un microorganismo electrogénico. Éstos son capaces de ceder los electrones obtenidos de la oxidación de un sustrato a superficies sólidas como un electrodo polarizado, proceso denominado bioelectrogénesis.

La hidrólisis de la materia orgánica en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales, da lugar a la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, principalmente acetato, además de CO₂ y H₂. En la etapa final, éstos se digieren hasta metano, un gas de efecto invernadero que constituye el producto de la metanogénesis. La propuesta bioelectrogénica en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales consiste en la sustitución de la etapa metanogénica, y posterior combustión de biogás, por un dispositivo MFC con *Geobacter sulfurreducens* como catalizador biológico. De esta forma, se lograría una completa oxidación de acetato a CO₂ y la generación de energía eléctrica limpia en una única etapa.

El objetivo de este proyecto es optimizar las condiciones de operación de una MFC comercial para aplicar este dispositivo en la depuración de aguas residuales enriquecidas en acetato. Para ello se pretende estudiar el efecto de ciertas variables que puedan influir en el funcionamiento de la MFC. La primera de ellas es el tipo de inóculo empleado en el sistema. Se ha demostrado que la fisiología del inóculo de *Geobacter sulfurreducens* obtenida mediante su cultivo en limitación de aceptor terminal de electrones (ATE), permite no sólo reducir los tiempos de arranque de la MFC en 3 veces, sino también lograr una mayor tasa de oxidación del acetato. Otro de los parámetros estudiados es el efecto de la presencia de determinados compuestos en el agua residual que puedan alterar el metabolismo del biocatalizador de la MFC. Se trataría de compuestos que, o bien resulten ser competidores potenciales del electrodo, o bien sean sustancias inhibidoras del cultivo del microorganismo.

Los resultados del proyecto han permitido concluir que la fisiología del inóculo obtenida con la limitación de ATE es la óptima tanto para la operación del sistema MFC como para la consecución del objetivo de este proyecto, la degradación de acetato. Además, se ha comprobado que compuestos presentes en las aguas residuales no afectan al proceso electrogénico. La posibilidad de ensayar un agua residual real ha permitido demostrar la viabilidad operacional del sistema MFC para su posible aplicación a una escala real.

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal del tratamiento de las aguas residuales es la eliminación de materia orgánica y el mecanismo para conseguirlo es el metabolismo bacteriano. Éste se basa en la utilización de la materia orgánica en un proceso llamado catabolismo en el que, la transformación química de la materia orgánica a productos finales, va acompañada de la liberación de energía que se destina, en parte, para la supervivencia celular.

Dependiendo del microorganismo del que se trate, el catabolismo puede ser oxidativo o fermentativo. El primero consiste en una reacción redox en la que la materia orgánica es el reductor oxidado por un oxidante, el cual puede ser el oxígeno (respiración aerobia) u otros como nitrato, sulfato e incluso algunas especies metálicas (respiración anaerobia). De forma contraria, el catabolismo fermentativo carece de un aceptor de electrones externo como oxidante. Normalmente, la vía catabólica produce compuestos intermedios como el piruvato que actúa como aceptor de electrones. Las fermentaciones se producen habitualmente en condiciones anaerobias [9].

Tanto la respiración aerobia como el catabolismo fermentativo son los dos metabolismos en los que se basa el tratamiento de las aguas residuales. La respiración aerobia es la responsable del tratamiento secundario de las aguas a través del proceso de los fangos activados mientras que, los microorganismos fermentativos, son empleados en los digestores anaerobios de las EDAR.

Centrándonos en el tratamiento anaerobio se puede decir que éste es la única alternativa para el tratamiento de aguas residuales con una elevada carga orgánica ya que permite su tratamiento sin conllevar una producción elevada de fangos. Además da lugar a poblaciones bacterianas más estables a los cambios en la carga orgánica del agua a tratar.

Este tratamiento es un proceso fermentativo en el que la materia orgánica se convierte a metano y CO₂ en ausencia de oxígeno. Tiene lugar en cuatro pasos catalizados por tres grandes grupos tróficos (bacterias hidrolíticas, acetogénicas y metanogénicas), que utilizan de forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo. Las cuatro etapas son las siguientes:

Hidrólisis: es el paso inicial de la degradación anaerobia ya que los microorganismos

implicados son capaces de utilizar únicamente materia orgánica soluble que atraviese la membrana celular. En la hidrólisis, moléculas complejas o macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) son degradadas por la acción de enzimas extracelulares de las bacterias hidrolíticas proporcionando sustratos orgánicos para la digestión anaerobia. También hay que tener en cuenta que se trata de un proceso muy variable dependiente de la temperatura, tiempo de retención hidráulico, composición del sustrato, pH [25].

Acidogénesis: en la acidogénesis tiene lugar la fermentación de las moléculas orgánicas solubles de bajo peso molecular en ácidos grasos con un número bajo de carbonos como ácido acético, fórmico, propiónico, valérico, butírico, láctico y etanol básicamente, además de H₂ y CO₂.

Acetogénesis: en la acetogénesis los productos de la acidogénesis se transforman en acetato y CO₂. Además hay una producción de hidrógeno H₂. Aunque algunos de los productos obtenidos en la etapa anterior, como el H₂ y el acético pueden ser ya metabolizados por los organismos metanogénicos (los últimos de la digestión anaerobia), el resto de los ácidos grasos volátiles deben ser transformados aún en productos más sencillos, en acetato y en H₂ mediante la acción de las bacterias acetogénicas. El principal inhibidor de la acetogénesis es la acumulación de H₂ (sólo a presiones parciales bajas (10⁻⁴ y 10⁻⁵) de H₂ las reacciones acetogénicas son termodinámicamente favorables). Como solución a esto se cuenta con los microorganismos acetogénicos denominados homoacetogénicos. Éstos son capaces de crecer produciendo únicamente acetato pero sin producir hidrógeno ya que lo consumen como sustrato. De esta forma, los homoacetogénicos mantienen una baja presión parcial de H₂ permitiendo la actividad de las bacterias acetogénicas.

Metanogénesis: la metanogénesis es la etapa que finaliza la digestión anaerobia con la formación de metano. En función al sustrato que metabolizan se distinguen 2 grupos de microorganismos: 1) Hidrogenotróficos: consumen H₂/CO₂ y fórmico; 2) Acetoclásticos: consumen acetato, metanol y algunas aminas.

De las cuatro etapas, la que se considera más controvertida es la última, la metanogénesis y no sólo por ser la etapa más lenta sino también por ser realizada por bacterias muy sensibles a cambios en variables como el pH, la temperatura, etc. En caso de verse afectadas, su actividad

metabólica se reduciría conllevando una acumulación de productos intermedios, principalmente de H₂, que como ya se ha explicado antes, impediría la finalización de la digestión. Por esta misma razón, actualmente se opta por una configuración del tratamiento en el que, las etapas de hidrólisis y acidogénesis-acetogénesis se realizan en un reactor independiente al de la metanogénesis. De esta forma se puede lograr un control más exhaustivo de las condiciones óptimas de crecimiento en ambos reactores en serie.

Aunque el sistema anaerobio sea un sistema eficaz en el tratamiento de aguas residuales con una elevada carga orgánica, lleva de asociado una consecuencia contraproducente, la producción de gas metano. Este gas, aunque se considere un gas combustible, es un gas invernadero altamente influyente en el problema del calentamiento global, solo superado por el dióxido de carbono. El metano, aunque se encuentre en proporciones menores que el dióxido de carbono, es capaz de absorber hasta 25 veces más energía por molécula que el dióxido de carbono. Por tanto, una reducción en las emisiones de tal gas constituye una atenuación en el calentamiento global.

Pilas o celdas de combustible microbianas o [Microbial Fuel Cells (MFCs)].

Con el descubrimiento de bacterias con capacidad de generar electricidad (microorganismos electrogénicos) nació el concepto de bioelectrogénesis, una nueva disciplina que se constituye como una fuente potencial de posibilidades en la búsqueda de nuevas alternativas a las energías convencionales.

La principal herramienta de la bioelectrogénesis son las denominadas pilas microbianas (Microbial Fuel Cell, MFC). Una MFC es un dispositivo que utiliza a los microorganismos electrogénicos para generar corriente eléctrica a partir de su metabolismo oxidativo. Ésta se genera gracias a la capacidad de estos microorganismos de respirar un electrodo polarizado [2], normalmente de grafito o también de otros materiales como el oro [3].

El esquema básico y general de una MFC es el siguiente:

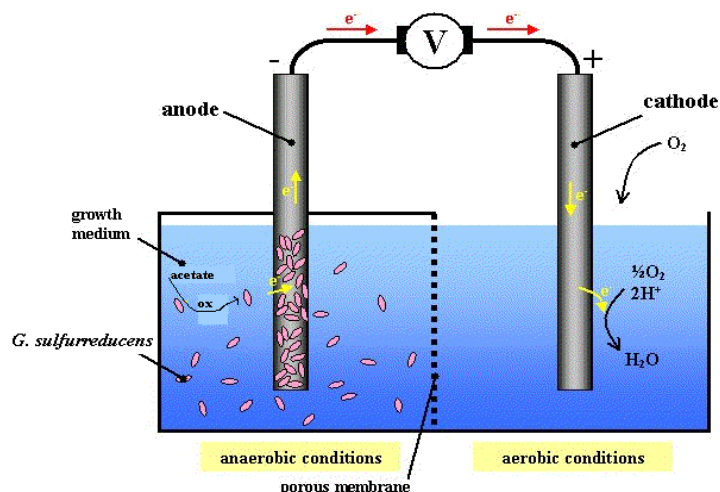


Figura 1: Esquema de una MFC.

Un MFC está constituida básicamente por dos cámaras. Una cámara anódica anaerobia y una catódica aireada. Los microorganismos, localizados en la cámara anódica, metabolizan sustratos orgánicos transfiriendo extracelularmente los electrones obtenidos a la superficie del electrodo. Estos electrones son transferidos al cátodo a través de una red eléctrica. Ambas cámaras se encuentran separadas por una membrana de intercambio catiónico a través de la cual se crea un flujo de protones (del ánodo al cátodo) que, combinados con los electrones generados y con el oxígeno presente en la parte aerobia, forman agua. Por lo tanto, se genera una corriente eléctrica de un modo similar a una pila de combustible química pero con un catalizador biológico en la superficie del ánodo. Es decir, se obtiene energía eléctrica a partir de energía química [2]. Mientras que las condiciones sean las adecuadas para la supervivencia de los microorganismos electrogénicos, la MFC tiene el potencial de producir electricidad de forma indefinida [6].

Dependiendo de las condiciones de la pila y del metabolismo del microorganismo, la diferencia de potencial que se obtiene puede oscilar normalmente entre 0.3-0.5 V [6] utilizando sustratos orgánicos como la glucosa y el acetato.

Teniendo en cuenta este fenómeno, las posibles aplicaciones de una MFC se pueden dividir en dos: la producción de energía eléctrica a partir de energía química y la biorrecuperación de suelos y aguas.

Las aguas residuales constituyen una fuente potencial de energía a través de su contenido en materia orgánica; esta fuente energética representa casi 7 veces la energía invertida en el tratamiento de dichas aguas [12]. Las MFC permiten, por tanto, estimular la degradación de dicha materia orgánica por la presencia de un ATE alternativo (electrodo) obteniendo la energía correspondiente. En ese sentido, la depuración de aguas constituye la principal aplicación de las MFC.

Otras ventaja de la tecnología MFC es la versatilidad de sustratos viables para su funcionamiento. Varios estudios están demostrando que cualquier compuesto degradable por bacterias electrogénicas puede convertirse en energía [19]. El perfil de sustratos incluye al acetato [2], glucosa [8], celulosa [23], piridina [30], fenol [14], *p*-nitrofenol [31] y residuos de industrias como la del chocolate [20] además de contaminantes derivados del petróleo [15].

Es importante destacar que, con las MFC, generalmente se produce una menor cantidad de biomasa que la que se produce a sus equivalente aerobios además, sin la necesidad de una aireación intensiva, se reducen los costes energéticos [26].

Los microorganismos en una MFC: microorganismos electrogénicos.

Se ha observado que la mayoría de los microorganismos electrogénicos descubiertos son organismos reductores de compuestos metálicos de hierro o manganeso entre otros [28], es decir, que respiran óxidos metálicos extracelulares mediante transferencia de electrones a los mismos. Reduciendo estos compuestos logran conservar la energía necesaria para el crecimiento celular, es decir, que realizan una reducción disimilatoria de los metales [29].

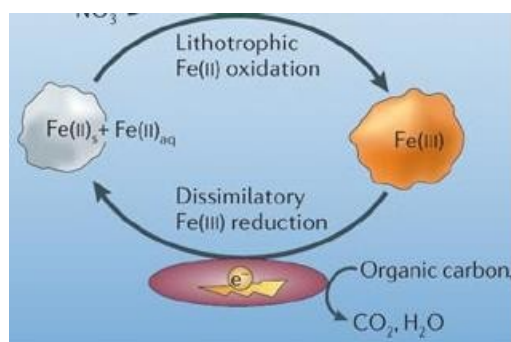


Figura 2. Respiración de Fe(III). Uso de Fe(III) como TEA (aceptor final de electrones).

En el medio ambiente el hierro se encuentra formando minerales como óxidos, hidróxidos, fosfatos y sales de sulfatos que tienen una solubilidad muy baja. Consecuentemente, aunque el hierro sea el cuarto elemento más abundante en la superficie terrestre, se considera como un elemento muy poco disponible para los microorganismos[4]. Aún así, la reducción microbiana del ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) es de especial importancia en el ciclo geológico del hierro [24] ya que, las propias bacterias han desarrollado mecanismos que le permiten reducir el metal mediante mecanismos de transferencia extracelular.

Los microorganismos más representativos capaces de realizar esta respiración extracelular son los incluidos en la familia Geobacteraceae. Algunas especies del género *Geobacter* son incluso capaces de usar un electrodo polarizado como ATE [1], de vital importancia en la aplicación de estos microorganismos en la producción de energía en dispositivos MFC. [23,24].

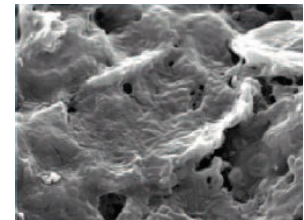


Figura 3. *Geobacter sulfurreducens* sobre electrodo polarizado.

Dentro del género *Geobacter* la especie más estudiada es *Geobacter sulfurreducens*, actualmente considerada modelo de estudio de la respiración extracelular ya que se localiza de forma predominante en ambientes naturales de reducción de Fe (III). El genoma completo de *G.sulfurreducens* ha sido secuenciado [18] lo que ha permitido incluso desarrollar un modelo metabólico in silico basado en dicho genoma [17] que puede ofrecer aproximaciones más acotadas del modelo de respiración celular. Otra ventaja de *G.sulfurreducens* es la posibilidad de cultivarlo con Fe(III) soluble en forma de citrato férrico o con aceptores solubles como el fumarato que facilitan su cultivo y manipulación en el laboratorio.

Por tanto, se puede afirmar que, a través de la respiración de Fe(III) estos microorganismos acumulan Fe(II) en el espacio extracelular (Fig.5):

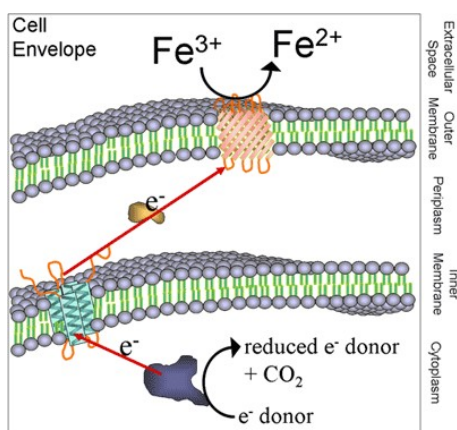


Figura 4. Los electrones resultantes de la oxidación de un sustrato intracelular son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor terminal de electrones extracelular.

Este proceso de transferencia electrónica se debe a la existencia de unas proteínas, denominadas citocromos c, localizadas en la membrana externa como parte de la cadena de transporte electrónico resultando esenciales para el microorganismo [7].

La especie bacteriana *Geobacter sulfurreducens* contiene el mayor número de genes que codifican para citocromos c (103 genes en total). Además, el análisis de su genoma ha revelado que cada uno de estos citocromos se encuentra asociado a múltiples grupos hemo, pudiendo algunos citocromos llegar a presentar hasta 27 centros activos tipo hemo cuando, en otros microorganismos no se suele encontrar más de uno [18].

Un número tan elevado de grupos hemo explica la flexibilidad respiratoria de la bacteria y se supone responsable de la donación de electrones a una aceptor extracelular y/o servir de estructura de almacenamiento de electrones en ausencia de ATE [3].



Figura 5. Cultivo anaerobio de *Geobacter sulfurreducens*.

Hasta ahora se han descrito tres posibles mecanismos microbianos para explicar el transporte exocelular de electrones:

- 1) Citocromos tipo c en superficie externa: por contacto directo con el ATE exocelular. [2].
- 2) Pilis conductores o “nanowires”: estructura puente entre célula y sustrato. [22]
- 3) Mediadores redox solubles: quelantes y “electron shuttles”. Consiste en la producción de moléculas pequeñas solubles que actúan como mediadores. [21].

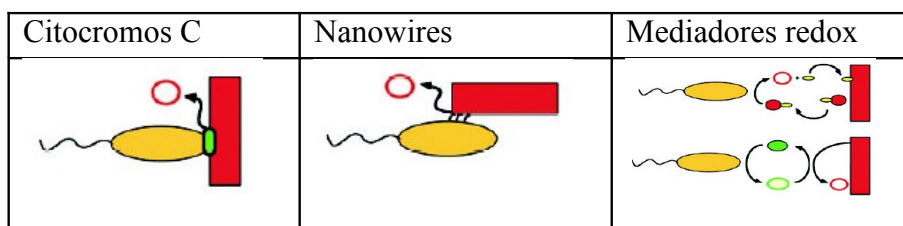


Figura 6. Representación de las diversas formas de transferencia electrónica.

Sin embargo, en *Geobacter* se sabe que la transferencia electrónica se da exclusivamente por contacto directo con el electrodo por lo que, los mediadores quedan descartados. lo que aún queda por dilucidar es si los citocromos son los únicos responsables de la transferencia o si lo son combinados con el pili en el caso que éstos se encuentren presentes.

Como posible modelo de la respiración del electrodo por *Geobacter* se propone que, las células del biofilm más cercanas al electrodo transfieren los electrones por contacto directo mediante sus citocromos de membrana mientras que, las células más alejadas del electrodo, son capaces de combinar los citocromos con una red de “nanowires” conductores para la transferencia electrónica a través del biofilm. A su vez, la oxidación de sustrato orgánico a través del biofilm conlleva a una acumulación de protones dentro de éste pudiendo alcanzarse concentraciones hasta 10 veces mayores que la del medio de cultivo.

Uno de los principales retos actuales es lograr aumentar la productividad electrogénica potenciando las vías de transferencias entre microorganismo y ánodo. Los estudios se orientan hacia la búsqueda de los mecanismos fisiológicos responsables de dicha transferencia. Determinar en qué condiciones el microorganismo tiene una mayor tasa respiratoria, es decir, en qué condiciones se obtienen mayor número de moles de electrones por células y hora. En este intento de conocer mejor a *Geobacter*, es de vital importancia su estudio en las condiciones más representativas posibles del medio natural (normalmente en limitación de sustratos) además de intentar una metodología lo más reproducible posible y controlada. Para tal propósito, el cultivo continuo o quimiostato se ha convertido en la herramienta más eficaz frente a la forma discontinua o batch ya que, su mecanismo permite establecer la limitación en alguno de los sustratos, permitiendo una reproducción fiable del medio natural. Se ha demostrado que la condición de limitación de ATE da lugar a una fisiología de *Geobacter* en que la tasa de respiración es mayor a tasas de crecimiento iguales a las de no limitación. Por lo tanto, se podría concluir que dichas células son electrogénicamente más activas frente a la transferencia exocelular de electrones. [5].

OBJETIVOS

Una de las principales aplicaciones de las MFC es el tratamiento anaerobio de las aguas residuales. En esta aplicación, el acetato como producto intermedio de la degradación, sirve de fuente de carbono y de electrones para las bacterias electrogénicas. Por tanto, la introducción de las MFC en el tratamiento anaerobio de las aguas permitiría, no sólo eliminar el acetato de las mismas evitando así la producción excesiva de gas metano, sino además, sacar un beneficio energético asociado al proceso.

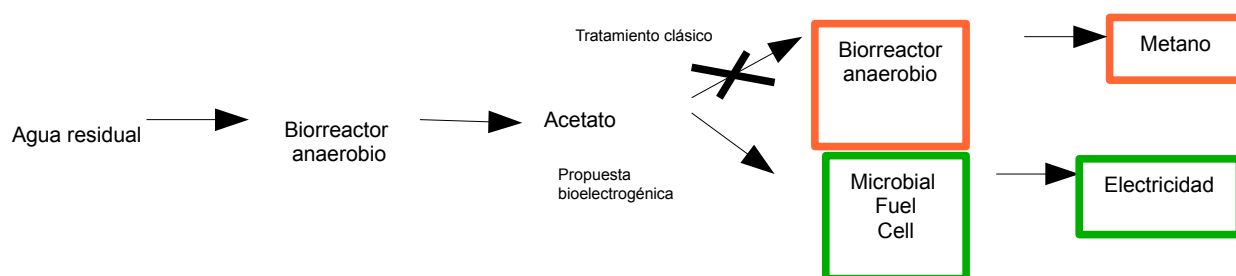


Figura 7: Esquema de la introducción de MFC en la depuración de aguas residuales.

Con la finalidad última de biodegradar acetato de aguas residuales reales mediante una pila de combustible microbiana, en este proyecto se analizará la influencia del tipo de inóculo de *Geobacter sulfurreducens* sobre el rendimiento de la MFC.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se desglosan los materiales y la metodología empleados en la etapa de experimentación del proyecto:

Cultivo discontinuo (batch) de Geobacter sulfurreducens.

Con la finalidad de disponer a lo largo de todo el proyecto un stock de microorganismo preparado para la experimentación, se inoculó *G. sulfurreducens* al 10% en un volumen final de 50ml en botellas de pyrex de 100ml. Para lograr una atmósfera anaerobia el oxígeno se desplazó con una mezcla de N_2/CO_2 en una proporción 80:20 (ALIGAL-12, AIR-LIQUIDE). Las botellas se mantuvieron en condiciones estancas mediante el uso de septum de butilo sellados con aluminio y en una cámara a $30^\circ C$ para el crecimiento adecuado del microorganismo. El medio de cultivo utilizado es un medio mínimo FWM (freshwater medium) con la siguiente composición [5]:

1) Sales (**Tabla 1.** Composición de las sales del medio mínimo):

Bicarbonato sódico	2,5g/l
Cloruro de amonio	0,5g/l
Bifosfato sódico dihidratado	0,06g/l
Cloruro potásico	0,1g/l

2) Solución de minerales (10ml/l) cuya composición era: (**Tabla2.** Composición del stock de minerales)

Compuesto	g/l
NTA (forma ácida)	1,5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,5g
NaCl	1,0g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1g

ZnCl	0,13g
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,01g
AlK(SO ₄) ₂ -12H ₂ O	0,01g
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄	0,025g
NiCl ₂ -6H ₂ O	0,024g
Na ₂ WO ₄ -2H ₂ O	0,025g

3) Solución de vitaminas (10ml/l) compuesta por: (**Tabla3**. Composición del stock de vitaminas)

Vitamina	mg/l
Biotina	2mg
Ácido fólico	2mg
Piridoxina-H ₂ O	10mg
Riboflavina	5mg
Tiamina	5mg
Ácido nicotínico	5mg
Ácido pantoténico	5mg
Cianocobalamina	0,1mg
Ác. p-aminobenzoico	5mg
Ácido tióctico	5mg

3) Fe (III)-citrato a una concentración final de 100µM.

4) Acetato 20mM como fuente de carbono y donador de electrones. El fumarato se utilizó a una concentración de 40mM como aceptor de electrones. El pH se ajusta a 6,8-7,0. Los medios de cultivo anaerobios se autoclavan mediante un ciclo de 15 minutos a una temperatura de 121°C y una presión de 1atm en autoclave.

Cultivo continuo (quimiostato) de *G.sulfurreducens*:

El cultivo en continuo de *G. sulfurreducens* se llevó a cabo en un biorreactor de 2l. En este caso también se usó FWM como medio de cultivo, sin embargo, como el objetivo que se persigue es obtener células con una mayor tasa respiratoria, el aceptor de electrones ha de estar en limitación. Por tanto, el fumarato (ATE) se suministró en una concentración de 10mM mientras que el acetato, como fuente de carbono y donador de electrones, se usó a una concentración de 10mM. Para el funcionamiento en continuo del sistema se utilizó una bomba peristáltica que alimentaba el reactor desde la botella de suministro del medio con una tasa de dilución de $0,05\text{h}^{-1}$ [32]. Desde la unidad de control del biorreactor se controló el resto de parámetros como agitación del reactor (250rpm), temperatura a 30°C (se mantiene mediante camisa exterior termostatazada) y sonda de nivel para extraer volumen del interior del reactor. Éste se mantuvo anaerobio mediante el aporte continuo de una mezcla filtrada de N_2/CO_2 en una proporción 80:20 (ALIGAL-12, AIR-LIQUIDE). Un esquema simplificado del sistema se representa a continuación:

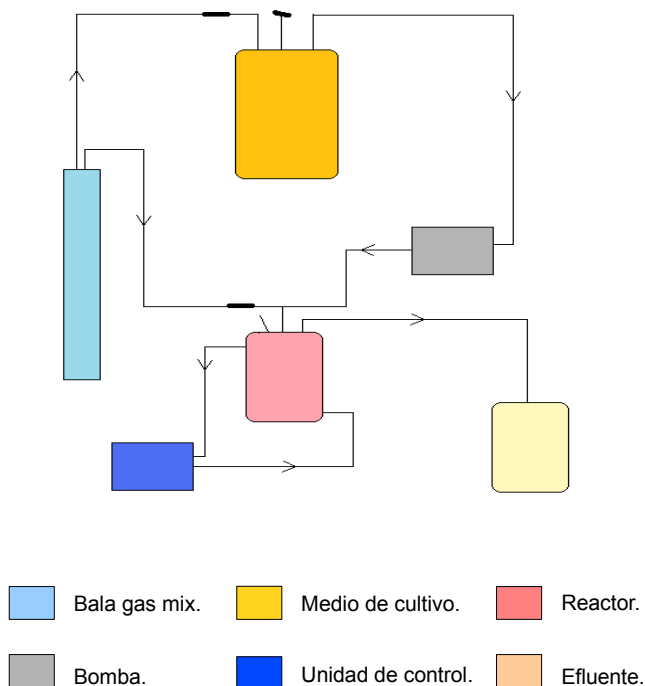


Figura 8. A la izquierda, esquema de los elementos del sistema en continuo o quimiostato. A la derecha, fotografía de los elementos del quimiostato de 2l utilizado en el proyecto

Celda de combustible microbiana:

En este proyecto se pudo trabajar con un diseño innovador de celda de combustible comercial y fabricado por la empresa danesa de celdas de combustible ElectroCELL. Aunque el principio de funcionamiento es el mismo que en una pila convencional en este caso se cuenta con una estructura compacta formada por casetes de PVC y marcos de neopreno que ayudan a su sellado. La disposición de estos casetes permiten obtener distintas configuraciones a partir de la misma celda. Toda la celda se cierra con tornillos dispuestos a lo largo de todo el diámetro de la estructura y se ajustan con llave dinamométrica a una determinada presión con el fin de evitar pérdida del sistema.

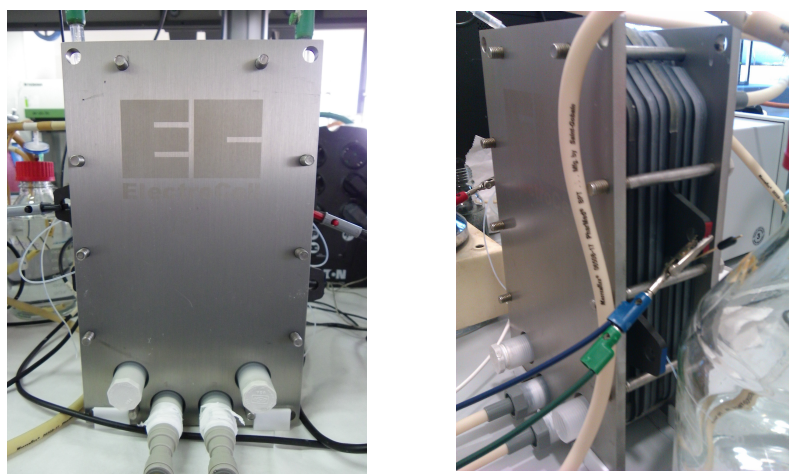


Figura 9. A la izquierda, fotografía del prototipo MFC en posición frontal de donde se distinguen en la parte inferior las conexiones de entrada a la celda. A la derecha, perfil del prototipo donde se aprecia cada uno de los casetes y marcos que la constituyen.

Durante el proyecto se utilizó todo el tiempo la misma estructura en la MFC, una de dos cámaras. Una, la cámara anódica, formada por un lecho de 17mm de partículas de grafito (**Figura 10**). El ánodo se separó del cátodo por una membrana de intercambio catiónico comercial, Nafion 324, que cuenta con un recubrimiento de PVC por una de sus caras. En la cámara catódica, donde se produce la reducción de oxígeno, se colocó un área adecuada de fieltro de carbono y como catalizador se utilizó una solución de sulfato de sodio 0,5M. Siendo *G.sulfurreducens* capaz de transferir electrones a electrodos polarizados, el ánodo del sistema se polarizó con un potenciostato (VoltaLab) a 0,0mV respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl.

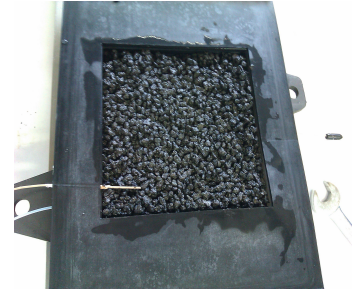


Figura 10. Fotografía de la disposición las partículas de grafito en la cámara anódica de la ECELL.

A parte de la celda ECELL el sistema completo contaba con un tanque de alimentación que contenía medio FWM o los sustratos oxidables por *G. sulfurreducens* a ensayar; en todos los casos los medios carecieron de aceptor de electrones, como el fumarato, ya que en este sistema el ATE era el electrodo. Una bomba peristáltica (Watson Marlow, 205CA) alimentó el anolito y catolito recirculándolos a través del sistema con un caudal de 6l/h. Además, el sistema se situó en un sala termostatzada a 30°C para el óptimo cultivo de la bacteria.

La inoculación de la celda se hizo mediante la recirculación de 500ml de cultivo de *G.sulfurreducens* a través del sistema durante 10minutos. Posteriormente, la celda se dejó en condiciones estanco para asegurar la adhesión de las células a las partículas del ánodo. En el caso de la inoculación con células de quimiostato, ésta se realizaba directamente desde el biorreactor de 2l acoplándolo a la MFC.

Hay que tener en cuenta que al tratarse de un medio puro de *Geobacter sulfurreducens* se intentó mantener las condiciones de esterilidad de la forma más rigurosa posible antes y durante la inoculación. En este sentido, tanto tuberías como conexiones utilizados en el sistema se esterilizaban previamente a cada puesta en marcha. Adicionalmente, la jornada anterior a la inoculación se hacía circular etanol diluido al 70% durante 30 minutos. Para asegurar la evaporación del mismo se dejaba gaseando la MFC también durante 2 horas con gas mix filtrado, de esta forma además se lograba convertir el interior de la celda en una atmósfera anaerobia.

Tras la inoculación el período de acondicionamiento del microorganismo se prolongó de 24 a 48hs. Durante el mismo, el sistema se mantuvo en condiciones estanco, sin recirculación de medio de cultivo. El catolito se mantuvo circulando durante todo momento. Tras este período de acondicionamiento se arrancó el modo continuo mediante la circulación del medio de cultivo fresco o del sustrato a ensayar.

Ensayo electroquímico:

Para su realización se contó con un potenciostato (VoltaLab) y un sistema de adquisición de datos con el software VoltaMaster. Con este equipamiento se realizó el siguiente ensayo electroquímico:

Cronoamperometría: desde la inoculación de la MFC se registró las medida de producción de corriente eléctrica a lo largo del tiempo potenciostatizando el ánodo a 0,0V respecto al electrodo de referencia (Ag/AgCl) situado en la cámara anódica. El intervalo de toma de medida se estableció cada 10s con el fin de disminuir el ruido de fondo provocado por el funcionamiento de la bombas peristálticas y demás equipamiento electrónico cercano a la celda.

Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC):

HPLC acoplado a detector de haz de diodos (Varian) y controlado por software Galaxie. Las condiciones del método empleado para la detección de acetato fueron las siguiente:

Fase móvil, consituida por ácido fosfórico al 0,1%.

Columna de análisis C-610H con precolumna.

Detección a una longitud de onda de 610nm.

Volumen de la muestra inyectada de 50 μ l a un flujo de 0,5ml/min.

Tiempo de retención: 20.7min.

RESULTADOS

Como ya se ha expuesto en este proyecto, se pretende estudiar el comportamiento electrogénico de *Geobacter sulfurreducens* en una nueva celda de combustible comercial.

1) Ensayo en MFC con medio mínimo:

Como primer acercamiento al sistema, se inoculó la MFC con un cultivo discontinuo de *G.sulfurreducens* mediante la circulación del mismo y siguiendo la metodología descrita en el apartado de Materiales y Métodos.

La corriente se registró desde el momento de la inoculación, $t=0$, hasta que se logró la obtención de una corriente estable y constante en “steady-state”, a las dos semanas y media aproximadamente como se puede observar en la figura 11:

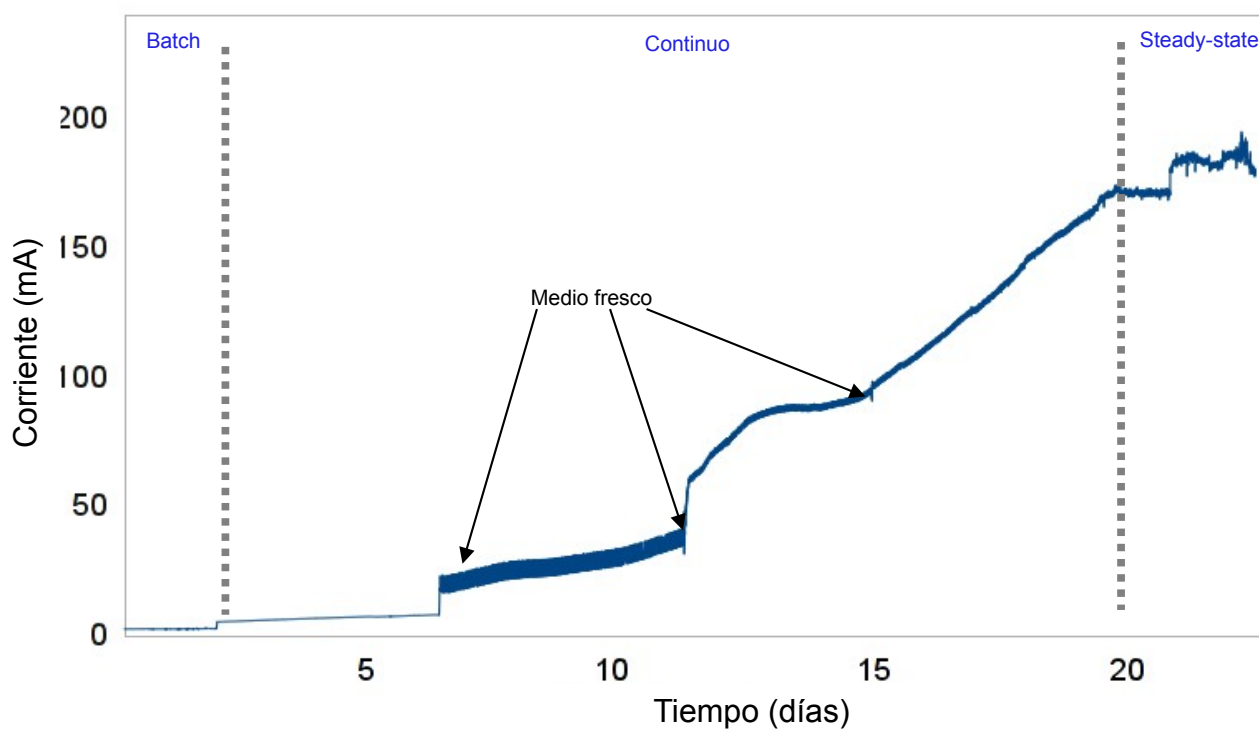


Figura 11. Cronoamperometría obtenida en la MFC a partir de la oxidación electrogénica de acetato por *G.sulfurreducens*.

El máximo de corriente obtenido con estas condiciones fue de 190mA tras 19 días. Los dos primeros días correspondieron a las condiciones estanco del sistema, la operación en continuo del sistema (recirculación de medio fresco) dio lugar a un aumento progresivo de la corriente especialmente a partir del sexto, cuando la corriente aumentó exponencialmente.

Los saltos de corriente que se observan en los días 6, 11 y 16 se corresponden con la sustitución del medio recirculado por medio fresco autoclavado. Una vez alcanzada la corriente en “steady-state” el sistema se detuvo y se procedió a su desmontaje para el siguiente ensayo.

Suponiendo que toda la corriente obtenida en el ensayo procede exclusivamente de la oxidación de acetato, se puede estimar mediante la Ley de Faraday ($Q = n \cdot ne \cdot F$, de donde n es el número de moles de acetato, n es el número de electrones obtenidos por la oxidación de un mol de acetato, y F es la constante de Faraday), el acetato consumido en la obtención de dicha corriente. De esta forma se obtuvo que, a partir del día 5 y durante los siguientes 15 días, se consumieron una media de 2mmoles/día.

2) Ensayo de la influencia del inóculo sobre la MFC:

Una vez puesto a punto el sistema de la MFC, se utilizó como inóculo células de quimiostato bajo limitación de ATE. Para ello, y con el fin de evitar posibles contaminaciones se acopló el quimiostato de 2l directamente a la MFC y así poder recircular el contenido del mismo a través del sistema.

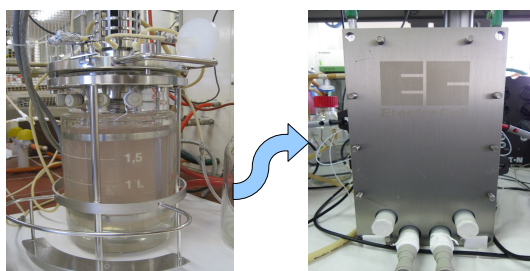


Figura 12. Fotografías del biorreactor de 2l con cultivo de *G.sulfurreducens* en limitación de ATE utilizado para inocular la MFC.

El procedimiento seguido en este caso fue el mismo que con el inóculo en batch con la diferencia de que se utilizó lecho de grafito nuevo. El sistema se polarizó a 0,0V y se empezó a registrar la corriente. La cronoamperometría obtenida demostró que, con las células de quimiostato se logra acortar la fase adaptación del microorganismo al sistema permitiendo alcanzar una corriente “steady-state” en un tiempo menor de 15 días que con las células de batch.

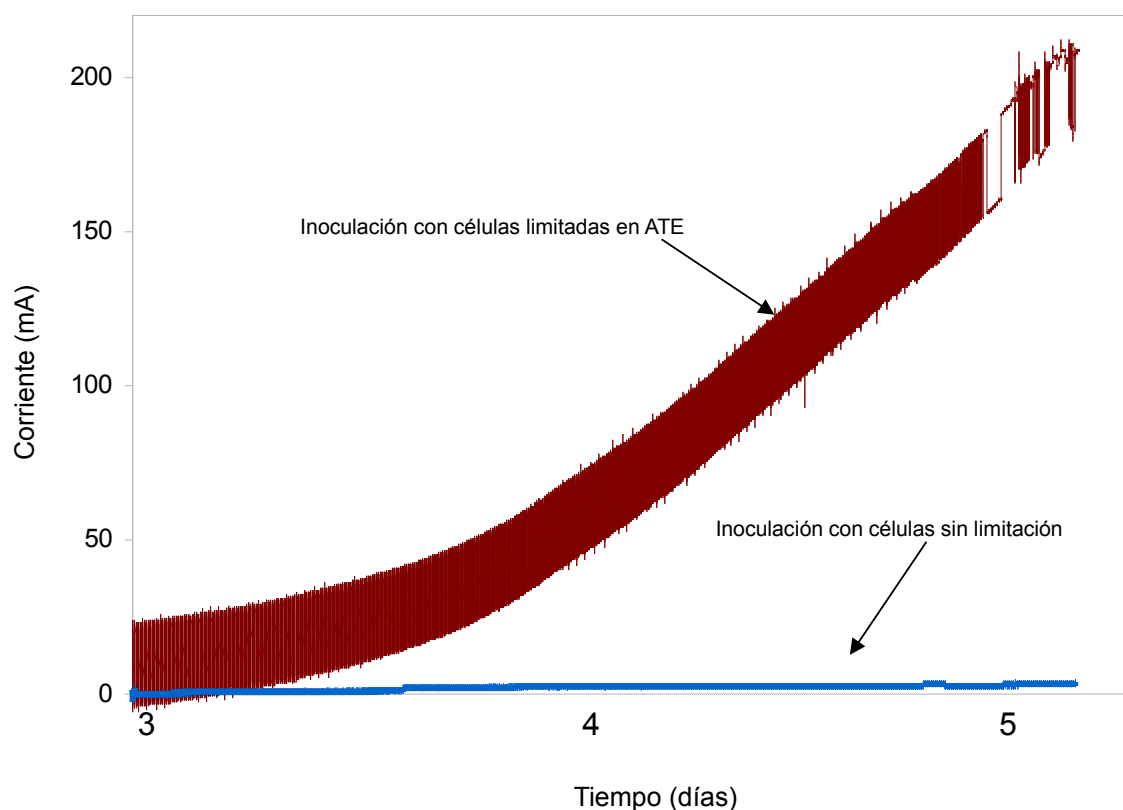


Figura 13. Gráfico de la cronoamperometría obtenida tras la inoculación de un cultivo limitado en ATE en la MFC.

En este ensayo se siguió el mismo procedimiento para la estimación del acetato consumido; se obtuvo que, tras su operación en continuo y hasta alcanzar la corriente en “steady-state” a los 3 días, se oxidaron 13mmoles/día. Estos resultados se respaldaron mediante cromatografía de alta presión confirmándose dicho consumo. Se analizó por HPLC muestra del medio fresco antes de recircularlo obteniéndose una concentración final de 21mM de acetato, y muestra del medio recirculado durante 3 días cuando se alcanzó la corriente en steady-state. Se demostró que la concentración de acetato había disminuido en 4 puntos.

Día 1. Inoculación	21mM acetato
Día 5. Tras 3 días en operación continua.	17mM acetato.

Tabla 4. Datos de concentración de acetato obtenidos por HPLC.

3)Ensayo de potenciales competidores del electrodo y de inhibidores de *G.sulfurreducens*:

Una de las principales finalidades del proyecto es la de emplear un agua residual real para el funcionamiento de la MFC y ver si se logra obtener una depuración de dicha agua de forma simultánea a la generación de electricidad. Se ha considerado oportuno el comprobar si otros componentes en el agua residual pueden afectar al funcionamiento de la MFC. En concreto, que en dicha agua puedan estar presentes otros sustratos que , o que supongan ser una alternativa preferente como aceptor de electrones para el *Geobacter sulfurreducens*, o lo que es lo mismo, un competidor para el electrodo, o que sustratos que puedan ser nocivos para el microorganismo.

De los posibles competidores del electrodo y que pudieran estar presente en aguas residuales reales, se ensayaron en la MFC el nitrato, sulfato, Fe(III) y el oxígeno como posible agente tóxico para el microorganismo.

3.1)Ensayo del efecto del nitrato:

Se optó por probar dos concentraciones de nitratos, que se añadieron en forma de sal de nitrato (NaNO_3). La cronoamperometría registrada durante la adición del nitrato demostró que éste no tiene efecto sobre la producción de corriente, hay que resaltar que las pequeñas variaciones se deben a la parada de la bomba peristáltica durante la adición:

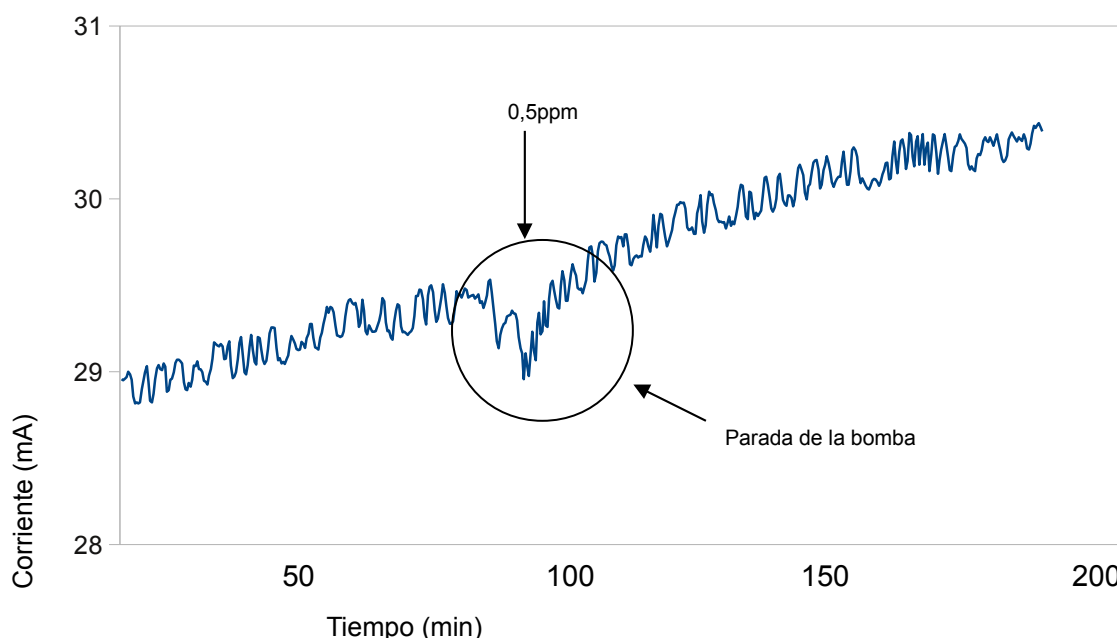


Figura 14. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 0,5ppm de nitrato, potencial aceptor de electrones presente en aguas residuales.

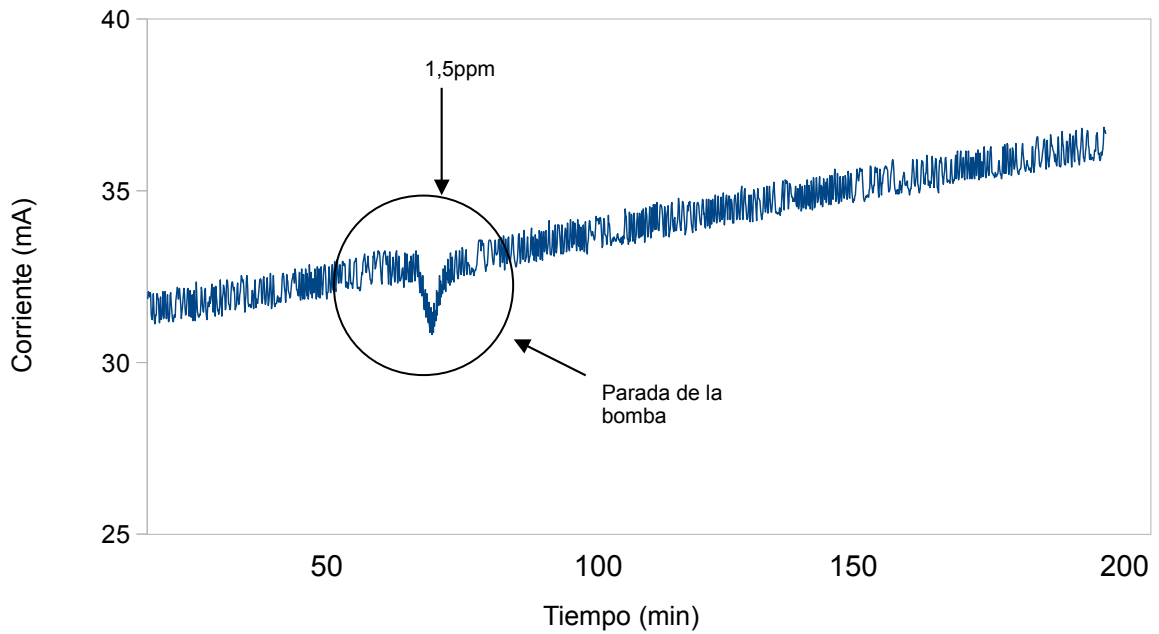


Figura 15. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 1,5ppm de nitrato

3.2) Ensayo del efecto del sulfato:

En este caso se añadió una concentración de 70ppm de sulfato también en forma de sal, Na_2SO_4 . Al igual que con el nitrato, tampoco se observó un efecto sobre la producción de corriente, la alteración de la misma se debe a la parada de la bomba durante la adición:

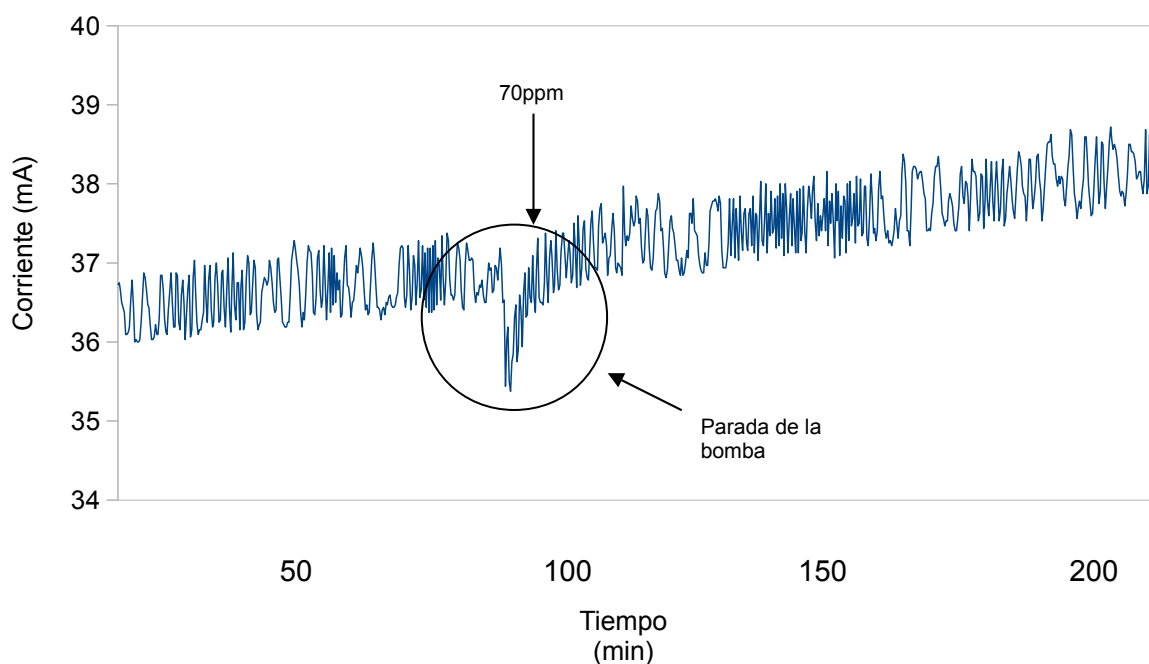


Figura 16. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 70ppm de sulfato.

3.3)Ensayo del efecto Fe (III):

El hierro se añadió al sistema en su forma soluble de sal de Fe(III)-citrato a una concentración de 100mM. Tras su adición la corriente permaneció con la tendencia ascendente que ya presentaba previamente a la alteración con Fe(III):

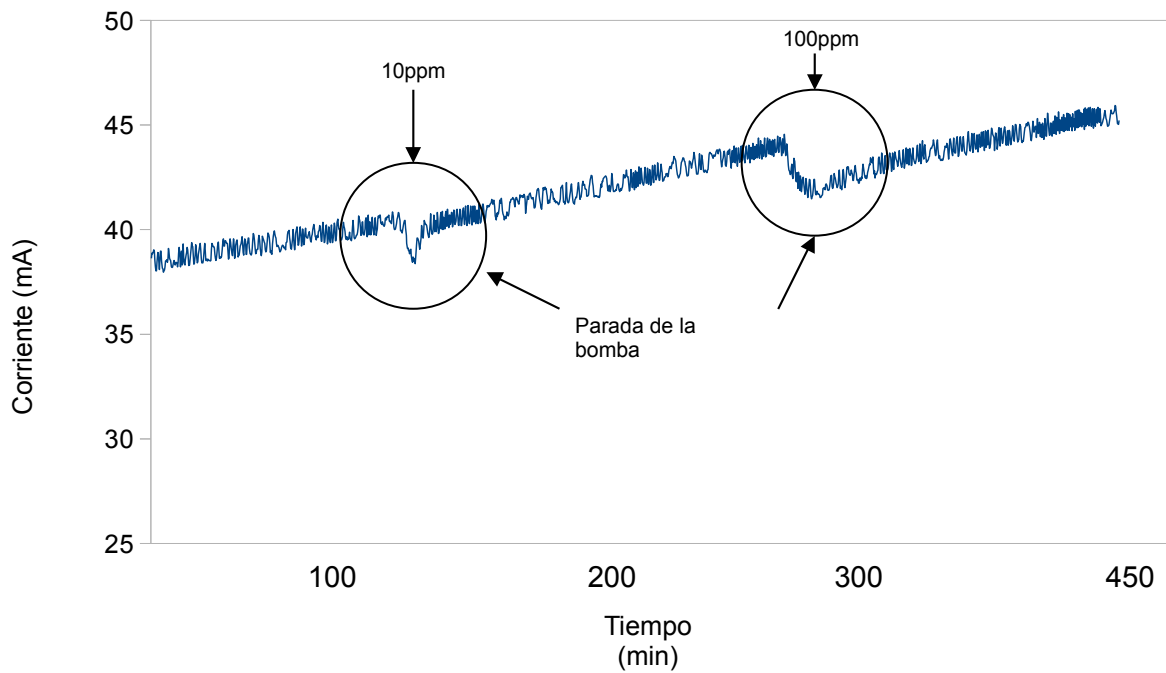


Figura 17. Cronoamperometría obtenida tras la adición de 10ppm y 100ppm de Fe(III).

3.4) Ensayo del efecto de O₂ :

El efecto del O₂ sobre la corriente también se estudió puesto que, aunque el objetivo sea aplicar el sistema para el tratamiento de aguas residuales, es importante contemplar la posibilidad de la existencia de bajas concentraciones de oxígeno. Aunque *Geobacter sulfurreducens* se ha clasificado durante mucho tiempo como un anaerobio estricto, actualmente se sabe que tolera la exposición al oxígeno atmosférico, al menos durante 24h, pudiendo así sobrevivir en sedimentos superficiales oxigenados [27]. Sin embargo, el efecto del O₂ cuando el ATE es un electrodo polarizado aún no se ha comprobado. Por lo tanto, para este ensayo se hizo circular una corriente de aire filtrado en el medio que alimentaba la MFC. A través de un oxímetro se mantuvo la concentración de O₂ en 2ppm.

Los resultados obtenidos se reflejan en la cronoamperometría de la figura 20:

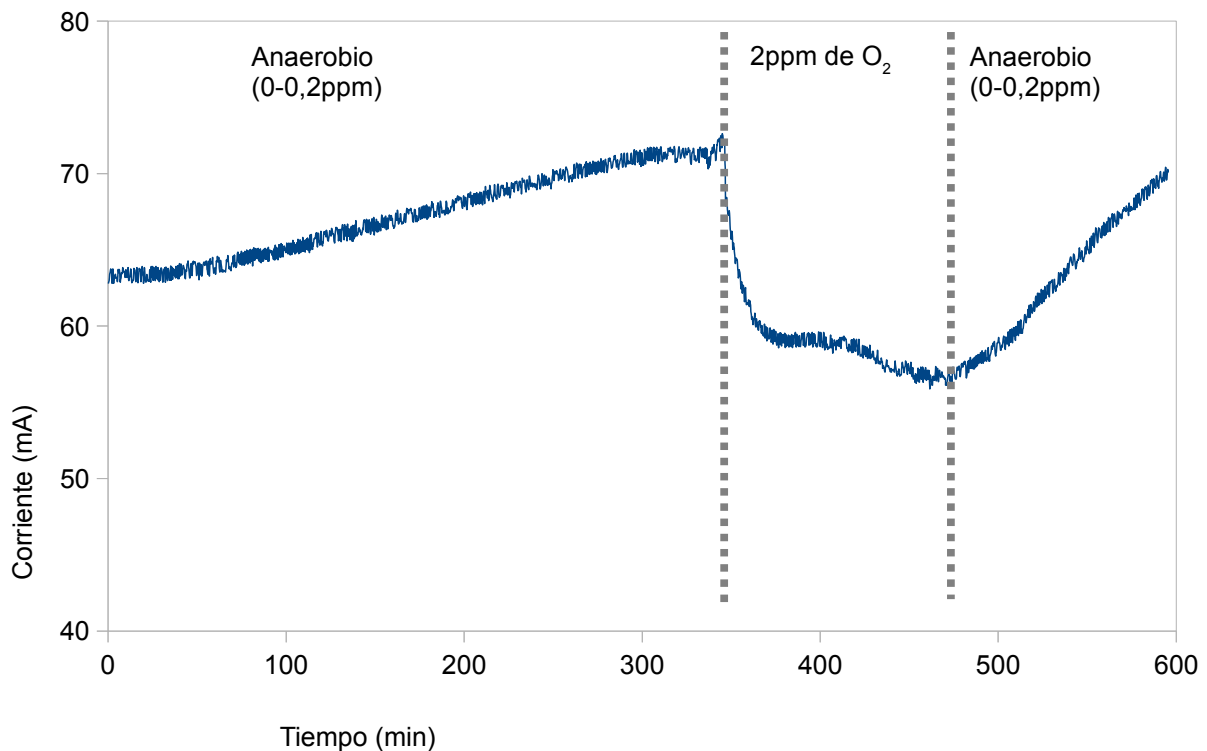


Figura 18. Cronoamperometría durante el burbujeo de hasta 2ppm de O₂ en la que se observa una oxidación parcial de las células y una recuperación de las mismas a las pocas horas.

4) Ensayo con agua residual real:

La etapa final de la experimentación se dedicó al ensayo con un agua residual real. Ésta fue proporcionada por el Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua (CENTA). Procedía de la laguna anaerobia de un proceso de lagunaje y sus principales características se recogen en la siguiente tabla:

pH	Conductividad (mS/cm)	DBO ppm	DQO ppm	N-NO₃ ppm	O₂ ppm	Acetato
7	1,5	280	458	0,5	2	1mM

Tabla 5. Características del agua residual procedente de una laguna anaerobia.

Previamente a su introducción en la celda ECELL, el agua se sometió a filtración a vacío con matraz kitasato y se burbujeó con gas mix para desplazar el oxígeno que pudiera haberse disuelto durante su transporte y filtración. Como se puede observar, la concentración de acetato presente en el agua era 20 veces menor que la utilizada en los ensayos con medio mínimo, con la finalidad de poder obtener una corriente medible y comparar resultados de los distintos ensayos, el agua residual fue suplida con acetato hasta una concentración final de 20mM.

Un problema asociado a las MFC que llevan operando durante un determinado tiempo es la acidificación del biofilm debido a la acumulación de protones en el mismo. En este caso, como la MFC sobre la que se analizó el agua residual llevaba en funcionamiento durante varios días, durante los cuales se estudió el efecto de competidores e inhibidores, la adición de buffer bicarbonato para compensar la caída del pH intrabiofilm se hizo necesaria para mantener el sistema. Se observó que con cada aumento de bicarbonato la corriente aumentaba y permanecía constante durante varias horas hasta la siguiente adición.

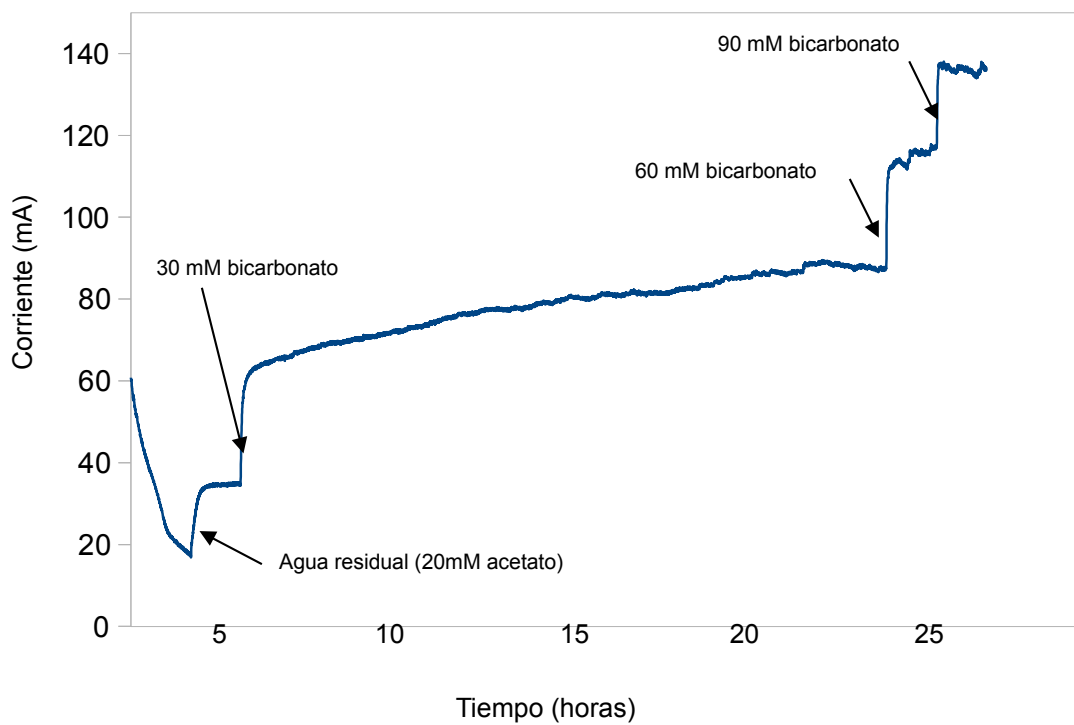


Figura 19. Cronoamperometría con agua residual. Cada una de las adiciones corresponden con adiciones de buffer bicarbonato 30mM.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el tipo de inóculo, en función a la fisiología de *G.sulfurreducens*, tiene una clara influencia sobre el funcionamiento de la MFC. Se concluye que, con la inoculación de células crecidas en limitación de ATE y por tanto más ávidas para la respiración extracelular [ref], se logra reducir la fase de adaptación del microorganismo alcanzándose la corriente máxima en un menor período de tiempo, concretamente en 3 veces menos tiempo que con células cultivadas en ausencia de limitación. Este hecho se ve complementado con los resultados obtenidos en la oxidación de acetato, siendo ésta del orden de 6 veces superior para el inóculo en limitación.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto del competidores potenciales como nitrato, sulfato y Fe(III), han permitido concluir que la posible presencia de éstos en aguas residuales no altera la producción de corriente en el sistema MFC. En el caso del O₂, la corriente se ve ligeramente afectada (en un 18% aproximadamente) con una concentración de 2ppm. Esto se debe a que *G.sulfurreducens* es un microorganismo microaerobio [27], es decir, que puede tolerar pequeñas concentraciones de O₂. Gracias a este hecho, también es importante destacar que, aunque se de una oxidación parcial del biofilm a concentraciones de 2ppm de O₂, éste tiene la capacidad de recuperarse y volver a alcanzar la corriente en “steady-state” una vez se vuelva a condiciones anaerobias estrictas. Tal vez si la presencia de O₂ es prolongada en el tiempo, el biofilm se acabe oxidando en su totalidad (no solo en las capas más alejadas del electrodo) y que, por ende, esto sí afecte en la corriente.

A partir del ensayo con agua residual se demostró que el sistema MFC no se ve afectado por la misma y que, en condiciones paralelas a las del medio mínimo (20mM acetato, 90mM bicarbonato), se obtienen corrientes en “steady-state” similares. El aumento de la corriente de forma proporcional tras cada adición de 30mM de buffer bicarbonato, demuestran que la limitación es la acidificación del biofilm. Este problema se puede solventar, o bien mediante la adición de buffer como se realizó en el ensayo, o mediante el aumento del caudal de recirculación que impida tal acumulación de protones. Además hay que señalar que, estos protones provienen de la oxidación del acetato, en condiciones reales en las que la concentración del mismo oscile en 1mM, el problema de la acidificación se verá disminuido.

La potencia de la MFC inoculadas con células de cultivo discontinuo (sin limitación de

ATE) se estimó en 9W/m^2 . Esta cifra es de un orden de magnitud superior a las potencias obtenidas en sistemas MFC que utilizan consorcios de microorganismos o cultivos puros distintos a *G.sulfurreducens*. [21].

Una medida común de la eficiencia de una MFC es la denominada eficiencia coulombimétrica, una medida del número de coulombios obtenidos como corriente eléctrica comparada con el número máximo de coulombios obtenibles del sustrato que se añada al sistema. La eficiencia coulombimétrica depende por un lado, del microorganismo que esté realizando la oxidación y por otro, de la materia orgánica a oxidar [6]. La ventaja de trabajar con un sistema con *G.sulfurreducens* y con el acetato como sustrato, es que ambos tienen una alta eficiencia coulombimétrica (ambas cercanas al 90%)[16] por lo que, en principio y con un sistema optimizado, se debería poder aproximarse a la obtención de valores teóricos de corriente gracias a la completa oxidación del sustrato orgánico y a una eficiente transferencia de electrones al electrodo.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han elaborado a partir de este proyecto se detallan a continuación:

- Se ha comprobado que la fisiología del inóculo de *Geobacter sulfurreducens* influye en el funcionamiento de las MFC quedando demostrado que, la obtenida en quimiostato con limitación de ATE es la idónea para la obtención de una corriente constante y estable en el menor tiempo posible. Permite una reducción de los tiempos de operación. Además, esta misma fisiología permite una eliminación más eficaz del acetato posibilitando un mayor acercamiento al objetivo de este proyecto.
- Ha quedado demostrado que, en el agua residual ensayada, no hay ningún elemento que afecte a la capacidad electrogénica del microorganismo en la MFC. La presencia de competidores potenciales del electrodo, como el nitrato, así como la posible presencia de otros (sulfato y hierro) no han alterado la preferencia del microorganismos por el electrodo. Tampoco ha resultado ser un inhibidor el oxígeno (2ppm) que había sido considerado como posible agente tóxico para el microorganismo.
- Se demuestra la viabilidad de este tipo de sistemas con cultivos puros de *G.sulfurreducens* utilizando aguas residuales reales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bond, D. R., D. E. Holmes, L. M. Tender and D. R. Lovley (2002). *Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*. Science 295, 483-485. (22)
2. Bond, D.R., Lovley, D.R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548-55 (2003). (4 y 9 y 29)
3. Busalmen, J.P., Esteve-Núñez, A., Berná, A. & Feliu, J.M. C-type Cytochromes Wire Electricity-Producing Bacteria to Electrodes. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 4874-4877 (2008) (5)
4. Esteve-nuñez, A., Cristina Gutiérrez, V.A. Methé, R.Glaven, Derek R. Lovley. System Biology Approach reveals metabolic strategies of *G.sulfurreducens* under acetate- excess conditions with implications in metal bioremediation. Pendiente de publicación. (20)
5. Esteve-Núñez, A., Mary Rothermich, Manju Sharma and Derek Lovley.2004. Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 7(5), 641-648 (2005) (32)
6. Franks Ashley E., Kelly P. Nevin. 2010. Microbial Fuel Cells, a current review. *Appl. Energies.* 3, 899-919. (2010) (6)
7. Holmes, D.E. et al. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* 8, 1805-1815 (2006) (27)
8. Kim, N.; Choi, Y.; Jung, S.; Kim, S. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 70, 109–114. (10)
9. L.M.PRESCOTT/ J.P. HARLEY/ D.A. KLEIN, *Microbiología*, Quinta de., McGrawHill, Madrid, 2004, p.185-192. (1)

10. Logan, B.E. (2009) *Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells*. *Nat Rev Microbiol* 7 (5): 375-81 (23)
11. Logan B.E. Et al. (2006), *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*, *Env. Sci. Tech.* 40, 5181- 5192 (24)
12. Logan B.E. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Science & Technology*, 2005, Vol.52 No 1-2, pp.31-37. (7)
13. Lovley, D.R. (2008),The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr Opin. Biotechnol* 19 (6): 564-71
14. Luo, H.; Liu, G.; Zhang, R.; Jin, S. Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chem. Eng. J.* 2009, 147, 259–264. (13)
15. Morris, J.M.; Jin, S. Feasibility of using microbial fuel cell technology for bioremediation of hydrocarbons in groundwater. *J. Environm. Sci. Health A: Tox./Hazard. Subst. Environm. Eng.* 2008, 43, 18–23. (16)
16. Nevin, K.P.; Richter, H.; Covalla, S.F.; Johnson, J.P.; Woodard, T.L.; Orloff, A.L.; Jia, H.; Zhang, M.; Lovley, D.R. Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ. Microbiol.* 2008, 10, 2505–2514.
17. Mahadevan, R., D. R. Bond , J. E. Butler , A. Esteve-Núñez , M. V. Coppi , B. O. Palsson , C. H. Schilling and D. R. Lovley (2006). Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microbiol* 72, 1558-1568. (26)

18. Methe, B. A., K. E. Nelson, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, W. Nelson, J. F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M. J. Beanan, R. J. Dodson, R. Madupu, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, S. A. Sullivan, D. H. Haft, J. Selengut, T. M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H. A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, T. V. Feldblyum, T. R. Utterback, S. E. Van Aken, D. R. Lovley, and C. M. Fraser (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967-1969. (25)
19. Pant, D.; Van Bogaert, G.; Diels, L.; Vanbroekhoven, K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* **2009**, *101*, 533–1543. (8)
20. Patil, S.A.; Surakasi, V.P.; Koul, S.; Ijmulwar, S.; Vivek, A.; Shouche, Y.S.; Kapadnis, B.P. 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. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 5132–5139. (15)
21. Rabaey, K.; Boon, N.; Hofte, M.; Verstraete, W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3401–3408. (31)
22. Reguera, G.; McCarthy, K.D.; Mehta, T.; Nicoll, J.S.; Tuominen, M.T.; Lovley, D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **2005**, *435*, 1098–1101. (30)
23. Ren, Z.; Steinberg, L.M.; Regan, J.M. Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. *Water Sci. Technol.* **2008**, *58*, 617–622.(11)
24. Schroder, I., E. Johnson, and S. de Vries (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* *27*, 427-447. (21)

25. piecee Richard E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment, *Environ. Sci. Technol.*, **1983**, 17 (9), pp 416A–427A (2)
26. Tender, L.; Gray, S.; Groveman, E.; Lowy, D.; Kauffma, P.; Melhado, R.; Tyce, R.; Flynn, D.; Petrecca, R.; Dobarro, J. The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J. Power Sourc.* **2008**, 179, 571–575 (17)
27. W.C. Lin, M.V. Coppi and D.R. Lovley. *Geobacter sulfurreducnes* can grow with oxygen as a Terminal Electron Acceptor. (2004). *Appl. Environ. Microbiol.* April; 70 (4): 2525-2528
28. Weber, K.A., Achenbach, L.A. & Coates, J.D. (2006), Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 752-64 (18)
29. White, D. (2000). *The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford university press* New York. (19)
30. Zhang, C.; Li, M.; Liu, G.; Luo, H.; Zhang, R. Pyridine degradation in the microbial fuel cells. *J. Hazard. Mat.* **2009**, 172, 465–471. (12)
31. Zhu, X.; Ni, J. Simultaneous processes of electricity generation and p-nitrophenol degradation in a microbial fuel cell. *Electrochem. Comm.* **2009**, 11, 274–277. (14)

