



TECNOLOGIAS ELECTROQUIMICAS MICROBIANAS EN LA UTILIZACION DE REACTORES DE LECHO FLUIDIZADO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

MICROBIAL ELECTROCHEMICAL TECHNOLOGIES IN THE USE OF FLUIDIZED BED REACTORS FOR WASTEWATER TREATMENT

MÁSTER UNIVERSITARIO EN HIDROLOGÍA Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS

Presentado por:

Shawny Carolina Ríos Lara

Dirigido por:

Dr. Pedro Letón

Alcalá de Henares, a 8 de Julio de 2020

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo, primero quiero agradecerle a Dios, por siempre guiarme por el camino correcto. A mi familia que ha sido un pilar fundamental en mi vida, sobre todo a mi Padre que con sus palabras de amor y la motivación diaria, han hecho que logre alcanzar esta meta.

Agradezco a mi tutor de proyecto Dr. Pedro Letón, quien fue mi guía en el desarrollo de la investigación, con su experiencia y conocimiento fueron una pieza fundamental.

Y por último agradezco a todas aquellas personas que fueron mi soporte, compañeros de laboratorio, amigos de la universidad, que con ellos creamos lazos de amistad fuertes.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TECNOLOGIAS ELECTROQUIMICAS (METs).....	3
1.1.1. Bioelectrogénesis	3
1.1.2. Microorganismos Electrogénicos	5
1.1.3. Celdas de Combustible Microbiano (CCMs).....	7
1.2 BACTERIAS FOTOTROFICAS PURPURAS (PPBs)	10
1.2.1 Temperatura	12
1.2.2 Luz	12
1.2.3 pH.....	12
1.2.3 Eliminación del Carbono	13
1.3 APLICACIONES AMBIENTALES.....	14
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	16
3.1. REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO ELECTROQUÍMICO MICROBIANO	16
3.1.1 Optimización	16
3.2. ENRIQUECIMIENTO MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN.....	17
3.2.1 Enriquecimiento a partir de agua sintética.....	17
3.3. METODOS ANALITICOS	19
3.3.1. Selección del colector.....	19
3.3.2. Toma de muestras, modo de operación y análisis	20
3.3.3. Composición del Gas Producido.....	21
3.3.4. Análisis Electroquímico	22
4. RESULTADOS	22
4.1 OPTIMIZACION ELECTROQUIMICA EN EL REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO.....	22
4.1.1 Optimización del colector	22
4.1.2 Selección de colectores	23

4.2	ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS FOTOTROFICAS PURPURAS.....	25
4.2.1	Degradación de Acetato.....	28
4.2.2	Composición gas de cabeza.....	31
5.	DISCUSIÓN.....	31
6.	CONCLUSIONES.....	32
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema principal de los mecanismos de transferencia de electrones extracelulares en el ejemplo de procesos anódicos: una transferencia de electrones extracelular directa (DEET) basada en el contacto físico de las moléculas redox de la superficie célula.....	5
Figura 2: A. Pila de combustible microbiana, B. Imagen de SEM de bacteria <i>Geobacter Sulfurreducens</i> sobre el electrodo de grafito polarizado a 6.0 V	6
Figura 3: Celda de Combustible Microbiana.....	8
Figura 4: Elementos de la configuración del sistema, las líneas discontinuas indican las conexiones eléctricas (Tejedor, 2016).	10
Figura 5: Microscopia de Bacterias Fototróficas Purpuras	11
Figura 6: Modelo electrogénico de <i>Geobacter</i> . El acetato es oxidado a través del ciclo de krebs y una extensa red de citocromos C, que conecta el citoplasma con la membrana externa. (Esteve-Núñez A., 2014).	13
Figura 7: Esquema de los reactores de Lecho Fluidizado, la Figura A. Reactor Control sin exposición a luz infrarroja, Figura B. Reactor con Infrarrojo.	17
Figura 8: Inoculo de Bacterias Fototróficas Purpuras.....	19
Figura 9: Gradiente de temperatura empleado en la separacion de CH ₄ y CO ₂	21
Figura 10: Comparación de Voltametrías cíclicas correspondientes a la caracterización abiótica de los colectores. Isostática grafito JP495 (A y B) y grafito isostático (C y D).....	24
Figura 11: Voltametrías Cíclicas del colector en contacto con el lecho fijo y fluidizado.....	25
Figura 12 Comparación de cultivo de PPBs en diferentes condiciones de luz e igual fuente de carbono.	27
Figura 13: Relación entre el aumento de la densidad óptica a 590 nm y la concentración de acetato como fuente de carbono añadida al medio de cultivo en los pases 1 y 4 en los reactores IR y Control.	29
Figura 14: Comparación de Reactores Control con IR en diferentes condiciones de luz, evolución de los días en cada Pase de estudio.	30

INDICE DE FIGURAS

Tabla 1: Composición de sales del medio	18
Tabla 2: Solución de Minerales	18
Tabla 3: Solución de Vitaminas:	18
Tabla 4 Composición del patrón suministrado por PRAXAIR.	22

TABLA DE ABREVIATURAS:

ATE: Adenosina Trifosfato.

BES: Sistemas Bioelectroquímicos.

CCMs: Celdas de Combustible Microbiano.

CV: Voltametrías Cíclicas.

DEET: Transferencia Directa de Electrones Extracelulares.

DIET: Transferencia Directa de Electrones entre especies.

ETT: Transferencia de Electrones Extracelular.

FWM: Fresh Water Medium.

ME-FBR: Reactor de Lecho Fluidizado Electroquímico Microbiano.

METs: Tecnologías Electroquímicas Microbiológicas.

MFC: Celdas de Combustible Microbiano.

PPBs: Bacterias Fototróficas Purpuras.

RC: Reactor Control.

RIR: Reactor Infrarrojo

TEA: Aceptor Terminal de Electrones.

RESUMEN

La capacidad para intercambiar electrones que poseen los microorganismos electroactivos con materiales conductores de electricidad como parte de su metabolismo es uno de los mecanismos más novedoso en el campo actual de la microbiología. Este fenómeno ocurre en la membrana celular de una biopelícula electroactiva, que contribuyen a convertir el metabolismo de degradación en corriente eléctrica. Dentro de las aplicaciones ambientales están la producción de biocombustibles y la generación de energía eléctrica. Aún estas tecnologías están en sus inicios, se sigue investigando ya que podrían tener un gran potencial debido a los bajos costos de implementación. Por otro lado, las PPBs son gram-negativas, viven en ambientes acuáticos anóxicos extremos en diferentes tipos de aguas residuales. Este amplio rango de ecosistemas es el resultado de la diversidad metabólica en las bacterias púrpura, siendo uno de los grupos más extendidos en la tierra. Realizan la fotosíntesis anoxigenada y la fijación de CO_2 . La utilización de PPBs en METs, nos permite aprovechar sus capacidades adaptativas para la mejora en biorreactores. Se realizó el enriquecimiento de PPBs de un consorcio microbiano puro del grupo de BioE. El objetivo de este trabajo buscó probar la capacidad de las PPBs para la transferencia de electrones en un colector eléctrico dentro de un reactor de lecho fluidizado para la eliminación de materia orgánica en agua residual en diferentes condiciones de luz. Se inocularon dos reactores con PPBs, un reactor irradiado con luz infrarroja RIR, reactor RC en obscuridad, utilizando acetato como fuente de energía en iguales condiciones ambientales. Se comparó rendimientos, en términos de biodegradabilidad y recuperación de nutrientes. Las mediciones se realizaron en espectrofotometría para caracterizar el crecimiento microbiano. El consumo de sustrato (acetato) se midió por cromatografía líquida de alto rendimiento. El gas producido se analizó con un cromatógrafo de gases. La radiación infrarroja es una ventaja competitiva para las PPBs, en cuanto a la degradabilidad de materia orgánica como la producción de energía en los sistemas. Las PPBs se adaptan a condiciones de obscuridad utilizando metabolismos de anaerobiosis, al estar expuestas a irradiación infrarroja utilizan diferentes tipos de rutas metabólicas para la oxidación de la materia orgánica. Es necesario realizar más estudios en cuanto a la generación de electricidad para la mejora en los diseños de los biorreactores.

ABSTRACT

The skills to exchange electrons that electroactive microorganisms possess with electrically conductive materials as part of their metabolism is one of the newest mechanisms in the current field of microbiology. This fantastic phenomenon electroactive generally occurs in a biofilm where all the bacterial layers contribute to converting the oxidative metabolism into an electric current. Among the environmental applications are the production of biogas and the generation of electrical energy. Although their although these technology recently started, research is ongoing as they could have great potential due to low implementation costs. On the other hand also, purple phototrophic bacteria have great adaptive capacities, inhabiting anoxic terrestrial and aquatic environments, different types of wastewater and extreme habitats, such as industrial wastewater. Thanks to the great variety of natural ecosystems, diversity of metabolic routes can be found in purple bacteria, being one of the most extended microorganisms on earth. These microorganisms photosynthesize in the absence of sunlight and CO₂. The use of purple phototrophic bacteria in METs allows us to take advantage of their adaptive capacities for improvement in bioreactors. In this investigation, enrichment of purple phototrophic bacteria from a pure microbial consortium of the BioE group was performed. The objective of this project was to test the capacity of the purple phototrophic bacteria for the transfer of electrons in a fluidized bed collector for the removal of organic matter in wastewater under different light conditions. Two reactors were inoculated with PPBs, one reactor irradiated with RIR infrared light, the second reactor RC in the dark, using acetate as an energy source under the same environmental conditions. Yields were compared in terms of biodegradability and nutrient recovery. Measurements were made with spectrophotometry to characterize microbial growth. The consumption of the substratum (acetate) was measured by high performance liquid chromatography. The produced gas was analyzed with a gas chromatograph. Infrared radiation is a competitive advantage for PPBs, in terms of the degradability of organic matter such as energy production in systems. The purple phototrophic bacteria adapts to dark conditions using metabolic pathways typical of anaerobiosis. Being exposed to infrared irradiation, they use different types of metabolic pathways for the oxidation of organic matter. More studies are needed in terms of electricity generation for improvement at bioreactor designs.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población mundial y el cambio climático, han hecho que investigadores estudien nuevas alternativas para la depuración del agua, tratando de solucionar los problemas relacionados con la gestión final de los efluentes líquidos de las aguas de abastecimiento. Estas contienen compuestos orgánicos y nutrientes pudiéndolos recuperar en lugar de ser disipados por tecnologías alternativas eficientes, el alto contenido de estos puede ser un valioso recurso en la recuperación de energía y productos.

Los objetivos que se han alcanzado los últimos años en la depuración de aguas residuales, se han basado en la eliminación de la materia orgánica disuelta y biodegradable. Esto a su vez se ha logrado con la aplicación de tecnologías en tratamientos primarios y secundarios, respectivamente. Los tratamientos que se realizan en una depuradora (EDAR) convencional, consiste en acelerar o intensificar su proceso de autodepuración en un tiempo y espacio mínimo. En la actualidad, se piensa que la mayor parte de las instalaciones se emplean tecnologías derivadas de los fangos activos. Estos sistemas son efectivos y conocidos técnicamente, teniendo un coste de inversión, gasto energético y generación de fangos activos elevado, lo que supone un problema para su tratabilidad. El aprovechamiento energético a través de la digestión anaeróbica de los fangos activos con nuevas tecnologías emergentes sugiere un desafío para el desarrollo.

La gestión del ciclo integral del agua, apuesta por implementar nuevos conceptos de economía circular en una gestión inteligente, eficiente y sostenible. Los beneficios son concretos: generación cero de residuos, autoeficiencia energética de las instalaciones, cero impacto ambiental. El tratamiento de aguas residuales ha de estar bien integrados en el medio ambiente, ayudar a proteger las masas de agua, optimizando al mismo tiempo los recursos financieros y de explotación. El desarrollar nuevas tecnologías adaptadas a los núcleos poblacionales o a su vez dentro de la industria, con técnicas de funcionamiento simple, costes de explotación y mantenimiento realmente asumibles, es una tarea imprescindible.

La depuración de las aguas residuales es un método sencillo, en el que los

microorganismos van a degradar la materia orgánica a compuestos más sencillos que se encuentran en ellas, este fenómeno sucede en el interior de las células, a través de un donador de electrones. La biodegradación se logra a través de los estímulos de los contaminantes al donar moléculas de oxígeno, con el objetivo de generar electrones durante el metabolismo aeróbico microbiano.

El estímulo de la biodegradación (oxidación) de estos contaminantes, sucede por el aporte de oxígeno con el objetivo de aceptar los electrones generados en el metabolismo microbiano aerobio. Las ventajas termodinámicas que posee el oxígeno, gracias a su elevado potencial redox, permite que exista una gran tasa de degradabilidad de la materia orgánica, a su vez, un aumento en los rendimientos en la célula, es así, que se genera elevados volúmenes de fagos activos con grandes cargas contaminantes, que deben ser tratados.

La eliminación del suministro de oxígeno en estos sistemas tradicionales, han sido una de las soluciones que se han venido planteando las nuevas tecnologías de tratamientos del agua, aprovechando el metabolismo de las bacterias a través de sus propios mecanismos reductivos, dependiendo de las rutas metabólicas utilizadas como: la fermentación, metanogénesis. Estas reacciones de digestión anaerobia implementadas en los procesos de depuración de agua, lograrían abaratar costes de energía y reducción de volumen de fangos activos.

Las Tecnologías Electroquímicas Microbianas (METs), es una fusión de 3 especialidades relacionadas entre sí: ingeniería, electroquímica y microbiología. La capacidad de los microorganismos para interactuar con materiales conductores, así generando energía eléctrica limpia a partir de la degradación de compuestos orgánicos, pueden suponer una importante alternativa a los tratamientos convencionales. Sus posibles aplicaciones se han venido incrementando los últimos años, dando lugar a nuevas tecnologías y tratamientos en la recuperación de suelos contaminados, eliminación de compuestos orgánicos en el agua residual, desalación, entre otras.

1.1. TECNOLOGIAS ELECTROQUIMICAS MICROBIANAS (METs)

1.1.1. Bioelectrogénesis

La bioelectrogénesis o bioelectricidad, es la producción de energía de los procesos metabólicos que ocurren en los seres vivos que está presente en la mayoría de ellos, pudiéndose obtener energía eléctrica eficiente. Este tipo de energías es un reto para un futuro cercano, ya que sus costes representativos podrían ser bajos, existe una menor contaminación al ambiente. El objetivo de la bioelectrogénesis se deriva de estudiar los procesos que realizan los microorganismos, uno de ellos la respiración (Tejedor, 2016). Las bacterias necesitan tener un medio ideal para que oxiden la materia orgánica y al mismo tiempo reduzcan iones metálicos; mientras tengan la capacidad de eliminar los electrones en exceso que se generaron en los procesos catabólicos que se llevan a cabo en el interior de la célula. La bioelectrogénesis sucede en la mayoría de los organismos, sin embargo, no todos generan una cantidad considerable de electricidad para que pueda ser aprovechada.

Los mecanismos para reducir metales y electrodos parecen diferir. Por ejemplo, cuando las especies de *Geobacter* se cultivan con óxidos de Fe (III), expresan flagelos que utilizan como elemento de movilidad para la búsqueda de la próxima fuente de Fe (III) (Childers, 2002). En contraste, cuando *Geobacter* se cultiva en un sistema electroquímico, tienden a adherirse permanentemente a los electrodos formando una biopelícula (Bond, 2003). Otro aspecto que cuestiona esas hipótesis es el hecho de que no todos los microorganismos reductores de metales pueden respirar electrodos. Por ejemplo, *Pelobacter carbinolicus*, que reduce los óxidos de Fe (III), no tiene la capacidad de transferir electrones a ánodos (Childers, 2002).

Otro aspecto observado es la llamada teoría de las geobaterías, electroquímica gigante. Son células electroquímicas formadas naturalmente con depósitos de grafito en el subsuelo que puede conectar eléctricamente regiones de diferente potencial redox como en ambientes anóxicos y anaerobios. Este tipo de geobaterías constituiría un aceptador final de electrones a largo plazo o donador de electrones para los microbios circundantes y tienen características similares con los electrodos que actúan como ánodos o cátodos.

Varios estudios han demostrado que existen microorganismos que poseen la capacidad transferir electrones al ánodo en ausencia de catalizadores redox artificiales. (Lovley, 2006). En los dispositivos electroquímicos se reducirían problemas de toxicidad de los contaminantes, limitando a los microorganismos que utilicen la materia orgánica presente en el agua como único combustible orgánico, actuando las como catalizadores biológicos (Benetton, 2010).

Existen dos tipos de bacterias electrogénicas que se han estudiado: aquellas que producen sus propios catalizadores reductivos, que son generados en el medio y reaccionan posteriormente con el electrodo, y aquellas que actúan de manera inmediata con el electrodo sin la presencia de medidores externos.

Se descubrió que la existencia de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* electrogénica produce fenazinas como mediadores redox, las principalmente estudiadas de este grupo son las bacterias reductoras de Fe (III) del género *Shewanella*. Varios tipos de bacterias descubiertas con gran actividad electrogénica son *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum* (Merino, 2019),

Aun no existe información muy profunda de como las bacterias transfieren los electrones en la membrana celular hacia el electrodo. Por otro lado, se han descubierto bacterias que son capaces de transferir electrones directamente al ánodo del género *Geobacter* el modelo más estudiado dada la disponibilidad que se encuentran en los ambientes terrestres, se ha utilizado cultivos puros por su dominancia dentro de las especies microbianas electrogénicas (Childers, 2002).

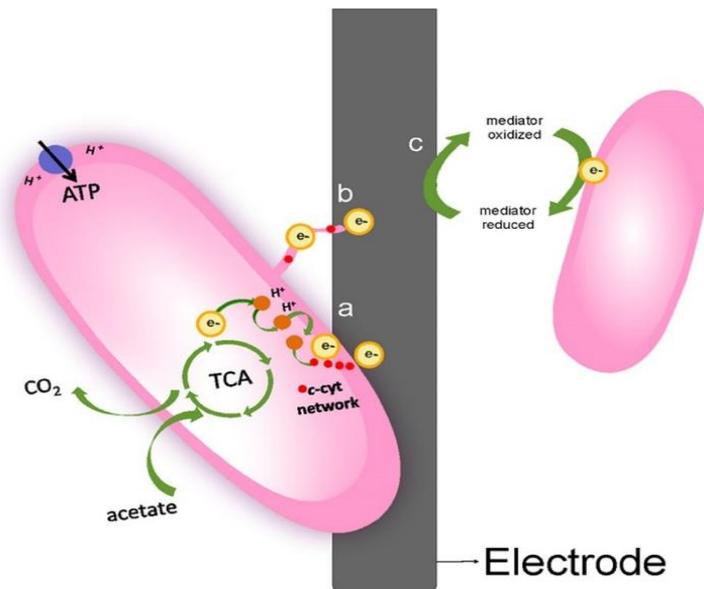


Figura 1: Esquema principal de los mecanismos de transferencia de electrones extracelulares en el ejemplo de procesos anódicos: una transferencia de electrones extracelular directa (DEET) basada en el contacto físico de las moléculas redox de la superficie célula.

1.1.2. Microorganismos Electrogénicos

Las nuevas tecnologías y avances realizados tras décadas de estudio en el ámbito del tratamiento de las aguas residuales conjuntamente con la biotecnología han permitido tener los primeros modelos de estudio de bacterias electrogénicas en función de los donadores de electrones. El modelo de microorganismo electroactivo mejor estudiado es *Geobacter sulfurreducens*. De hecho, fue el primer microorganismo descrito para usar óxido de hierro como aceptor de electrones (Bond, 2003). Es una bacteria gram negativa anaerobia (no obligada), no fermentativa, en forma de barra. Puede utilizar una variedad de donantes de electrones (acetato, hidrógeno, lactato) y de aceptores de electrones (hierro férrico, óxidos de manganeso, fumarato, uranio, azufre elemental, cátodos para la respiración (reacciones disimiladoras), pero menos sustratos (como el acetato) como fuentes de carbono (reacciones de asimilación) (Bond, 2003).

La transferencia de electrones sucede mediante un complejo de citocromos en la membrana celular de la bacteria que contiene un grupo hemo además, de las proteínas transmembrana. De esta forma se consigue una transferencia de los electrones a un aceptor final extracelular, este mecanismo se denomina Transferencia de Electrón Extracelular (EET). Para la especie de *Geobacter* el

donante de electrones preferido es el acetato, y es el intermediario central en la degradación anaerobia de la materia orgánica en ambientes sedimentarios. Además, es el producto final de la fase acetogénica en el proceso de digestión anaeróbica, y su presencia está relacionada con la producción de biogás. Cabe señalar que en *Geobacter* las biopelículas electroactivas pueden oxidar el acetato acoplado a la reducción en un ánodo utilizando más del 96% de los electrones contenidos en este sustrato para la respiración (Bond, 2003).

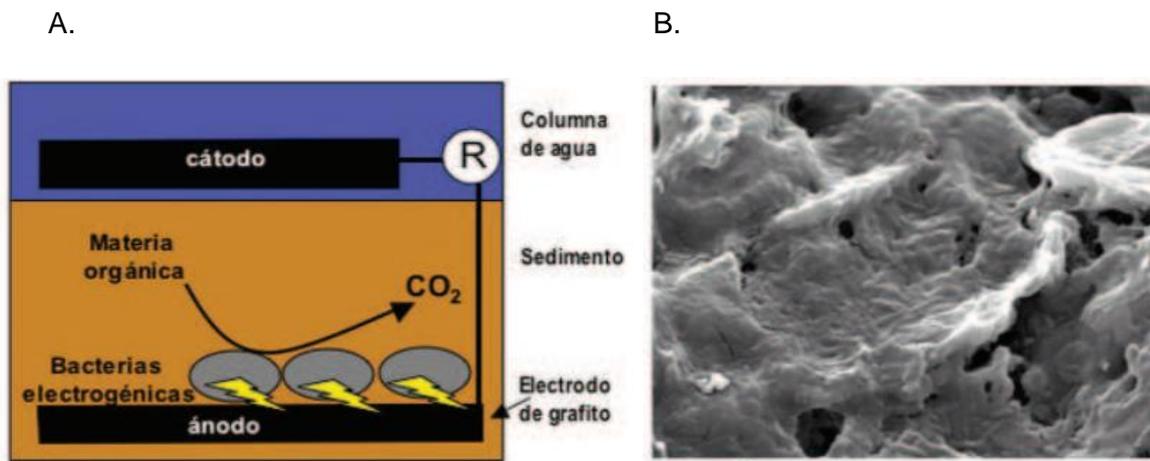


Figura 2: A. Pila de combustible microbiana, B. Imagen de SEM de bacteria *Geobacter Sulfurreducens* sobre el electrodo de grafito polarizado a 6.0 V

Las Celdas de Combustible Microbiano son dispositivos que pueden transformar la energía electroquímica de las bacterias, en energía química (CMMs), donde las fuentes principales generadoras pueden ser a partir de combustible químico externo como el hidrogeno o etanol. Ciertos microorganismos tienen la capacidad de degradar la materia orgánica para utilizarla como combustible en la transferencia de electrones. Los combustibles que pueden alimentar a las CMMs, van desde soluciones de compuestos complejos ricos en materia orgánica, a los más simples como acetato, glucosa, residuos vegetales que están presente en el agua residual.

La depuración de las aguas residuales es la que llama la atención a los investigadores. Se ha venido realizando estudios de las CMMs adaptándolas a condiciones específicas para conseguir, que la corriente eléctrica se emplee en generar hidrogeno dentro del propio reactor. El objetivo de estos estudios es tratar

de eliminar la etapa metanogénica clásica que sucede en la depuración de aguas residuales por otra bioelectroquímica mediante la utilización de las bacterias electrogénicas presentes en ellas, de manera que la depuración a su vez genere electricidad necesaria para la producción de hidrógeno, sin impactos ambientales (Hernández, 2012).

La materia orgánica presente en las aguas residuales, representa una fuente potencial de energía, esta fuente energética puede llegar a ser casi 7 veces de la energía invertida para el tratamiento de estas aguas. (Ye, 2016). Las CCM son dispositivos que permiten la estimulación de la degradación de la materia orgánica, actuando como catalizadores potenciales acelerando el metabolismo de las bacterias en presencia de un electrodo alternativo, Esto logrando obtener generación de energía limpia y depurando aguas residuales al mismo tiempo, como aplicaciones principales de esas tecnologías.

1.1.3. Celdas de Combustible Microbiano (CCMs)

Una Celda de Combustible Microbiana (CCMs) es una tecnología alternativa que utiliza bacterias electrogénicas para convertir la energía química presente en un sustrato en energía eléctrica. Este tipo de sistemas se diferencian de los otros de generación de energía eléctrica porque pueden operar eficientemente en condiciones de temperaturas altas o bajas.

Las CMMs están constituidas por dos cámaras: la cámara anódica que ahí ocurren los procesos anaeróbicos, y una catódica aireada. Los microorganismos que se encuentran en la cámara del ánodo, metabolizan los sustratos orgánicos como su fuente principal de energía, aislando los electrones del metabolismo a un colector de membrana con una conducción eléctrica, en la cámara catódica ocurren procesos aeróbicos en los que los microorganismos ocupan el oxígeno como aceptor de electrones. Las dos cámaras están separadas por una membrana de intercambio de electrones que a través de ella crean un flujo de electrones entre ambas cámaras, y el oxígeno utilizado en el cátodo lo transforma en agua. Así, se produce una corriente eléctrica que actúa de forma parecida a una pila de combustible química pero con un catalizador biológico en la superficie del ánodo.

Se puede a su vez, obtener energía eléctrica a partir de energía química. (Bond, 2003).

Dependiendo los estudios que se vayan a realizar, las CMMs van relacionadas de acuerdo a las características de ensamblaje, volumen, sustratos y tipo de bacterias de su medio enriquecido, los potenciales que se obtiene de manera estándar en las CCMs puede oscilar entre 0.3 – 0.5 V. Se utilizando como catalizadores orgánicos simples como la glucosa o el acetato. Las aplicaciones ambientales dentro de estas tecnologías ambientales, tienen como beneficio la depuración de las aguas residuales, la generación de energía eléctrica, biorremediación de suelos y desalinización del agua.

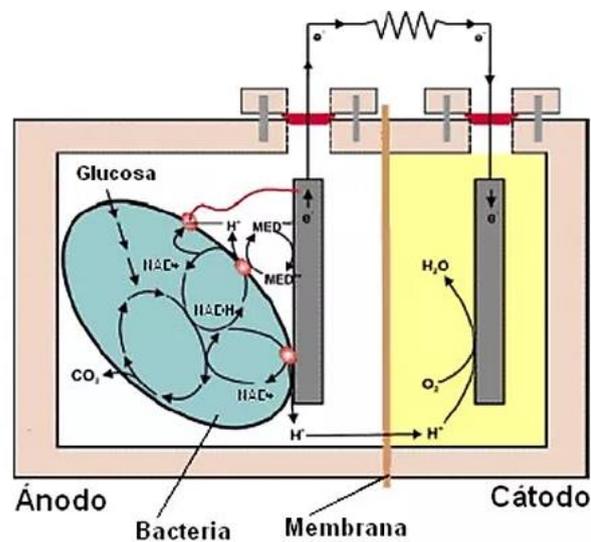


Figura 3: Celda de Combustible Microbiana

Es importante resaltar que, con las CCMs, generalmente se reduce la cantidad de biomasa que la que se genera a sus equivalentes aerobios además, sin la necesidad de una aireación intensiva, se disminuyen los costes energéticos. (Tender, 2008).

1.1.4 Celdas Electroquímicas Microbianas (MECs)

La diferencia de las Celdas Electroquímicas Microbianas con las de combustible microbiano radica principalmente en la fuente de energía externa que se le aplica en el ánodo de la cámara anaeróbica, logrando así una aceleración en el metabolismo celular de las bacterias. Una vez que se fija el potencial se utilizan

tres electrodos: el primero es un electrodo de trabajo o Working Electrode (WE) para en este seleccionara un potenciales especifico y en el cual tendrá lugar la reacción de interés; un electrodo de referencia o Reference Electrode (RE) con potencial fijo y estable, que utiliza para medir el potencial eléctrico en el medio del trabajo, un electrodo auxiliar o Counter Electrode (CE) en el cual tendrá lugar la contrarreacción, las aplicaciones van a variar de acuerdo al potencial que se fije en la CCMs (Bond, 2003). El electrodo se convierte en un sumidero de electrones o como una fuente de almacenamiento de electrones. Esto se aplica generalmente para la depuración de aguas residuales al ser un donador de electrones inagotable para las bacterias, reducción producción de fangos activos.

Diseño del Biorreactor de Lecho Fluidizado

Dentro de las MET no todas son apropiadas para la depuración de cada tipo de aguas residuales. Los sistemas más efectivos serían aquellos diseñados para cada necesidad de calidad de efluentes. Adicionalmente, los MET no pueden realizar por completo el tratamiento de aguas residuales por sí mismos y se hace necesaria su complementación con otras tecnologías. Por ejemplo, un paso de digestión anaeróbica anterior podría reducir la DQO del influente de un MET y así mejorar el rendimiento del reactor bioelectroquímico.

Los MET de compartimento único y sin membrana son los preferidos para la depuración de las aguas residuales. La infraestructura de una EDAR clasica es costosa de construir y generalmente está diseñada para durar unos 50 años. Uno de los desafíos en el diseño del reactor es poder explotar las estructuras construidas existentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Esto sería eliminar una gran parte de los costos iniciales de inversión asociados a implementación de un tratamiento bioelectroquímico de aguas residuales. (Tejedor, 2016).

Los lechos fluidizados pueden ser una alternativa interesante a la hora de llevar a cabo estos tratamientos bioelectroquímicos, al conseguir un electrodo fluidizado. Básicamente consiste en un recipiente que contiene partículas de material conductor, grafito habitualmente, que se mantienen en suspensión como

consecuencia de hacer circular el agua residual. Este caudal hace que las partículas se mantengan en suspensión, obteniendo una buena mezcla y proporcionando una elevada superficie para la formación de biofilm.

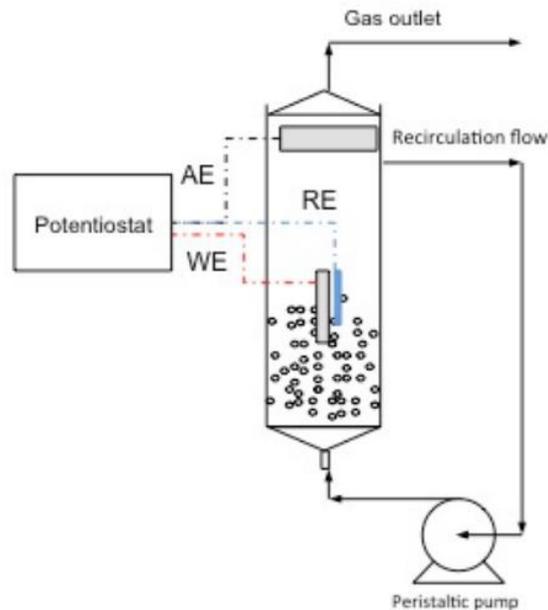


Figura 4: Elementos de la configuración del sistema, las líneas discontinuas indican las conexiones eléctricas (Tejedor, 2016).

El comportamiento de estos sistemas se puede asemejar a dispositivos móviles capacitivos basados en carbono granulado. Estos gránulos están cubiertos por una biopelícula electroactiva que transfiere los electrones resultantes de su metabolismo al material conductor, los gránulos cargados se recirculan a la cámara anódica de un CCM externo y transfiere los electrones a un colector de corriente, para que permanezca oxidado y actuando como un sumidero de electrones de nuevo. Este tipo de configuraciones móviles de electrodos 3D presentan buenas propiedades de transporte de masa, mezcla y distribución de temperatura, además de una gran superficie activa. (Esteve Núñez, 2014).

1.2 BACTERIAS FOTOTROFICAS PURPURAS (PPBs)

Las bacterias fototróficas purpuras (PPBs) tienen características similares al resto de bacterias, sin embargo, poseen vías metabólicas que están presentes en la fotosíntesis de las algas, en ausencia de producción de oxígeno (fotosíntesis anoxigénica). Según varias investigaciones realizadas, estas bacterias por su gran diversidad de especies se las puede encontrar en hábitats acuáticos y terrestres,

un gran número de especies ha tenido la capacidad de adaptarse y sobrevivir a condiciones extremas, pH o de salinidad (extremófilas) (Bullough, 2009), utilizando rutas metabólicas diferentes de acuerdo al estrés celular que sufren.

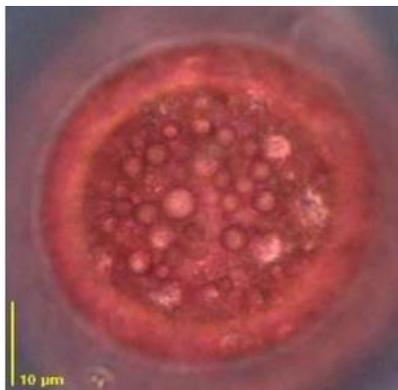


Figura 5: Microscopia de Bacterias Fototróficas Purpuras

Algunas de las especies de bacterias según varios estudios realizados tienen la capacidad de absorber longitudes de onda superiores a las que tienen capacidad de asimilar en pigmentos aislados (Hunter 2009). Las PPBs, se llegan a estimular en presencia de luz infrarroja, tienen crecimientos exponenciales que pueden ser fotoautótrofo o fotoheterótrofo. Al ser fotoautótrofo, las bacterias utilizan el sulfuro, tiosulfato o H_2 como donante de electrones para realizar los procesos de fotosíntesis. Algunas especies tienen la capacidad de emplear el ion Ferroso Fe^{2+} como donante de electrones oxidándolo a ion Ferrico Fe^{3+} , por el contrario un grupo limitado de especies, como por ejemplo alguna cepa de *Thiocapsa* capaz de emplear el NO_2 como donante de electrones, reduciéndolo a NO_3 . Por otro lado, las bacterias tienen la capacidad de fotoasimilar compuestos sencillos si el crecimiento es fotoheterótrofo, en la estructura celular de sus membranas poseen bacterioclorofilas *a* o *b* (BChl *a*, BChl *b*) las cuales tienen una estimulación en el rango del infrarrojo dentro del espectro electromagnético y carotenoides como espiriloxantinas, licopenos y rhodopsina. (Puyol, 2017).

La gran variedad de especies existentes en la naturaleza, que tienen la capacidad de desarrollarse en condiciones extremas de oscuridad a bajas concentraciones de oxígeno y de luz, se ve reflejada en el crecimiento de la población bacteriana ya que se ralentizan sus procesos de reproducción, viéndose obligadas a permanecer limitadamente a la supervivencia.

La gran variedad de rutas metabólicas que poseen las Bacterias Fototróficas Purpuras (PPBs), las investigaciones relacionadas con estos microorganismos y los nuevos estudios biotecnológicos ha aumentado en los últimos años. La biorremediación en ambientes contaminado con metales tóxicos es una de las características que llama la atención a los investigadores, ya que por su capacidad de cambiar sus rutas metabólicas, almacenan en las estructuras celulares los iones de metales pesados, remediando suelos y agua. (Merino, 2019)

1.2.1 Temperatura

Cada una de las especies de PPBs tiene una temperatura ideal de crecimiento. Como se mencionó antes, este tipo de bacterias son extremófilas. Este tipo de características las hace ideales para la depuración de aguas residuales a baja temperatura o industriales a alta temperatura. Se ha comprobado, por ejemplo, que la *Chloroflexus aurantiacus* tiene la capacidad de crecer a 70°C (Hunter, 2009). Las bacterias mesófitas son las que más han sido estudiadas ya que estas se pueden adaptar a condiciones ambientales en rangos de temperatura a 20°C y 40°C. (Hernández, 2012).

1.2.2 Luz

Las PPBs, en sus estructuras celulares no poseen pigmentos idóneos para aprovechar el espectro de la luz visible. Estas bacterias por el contrario aprovechan la región de la luz infrarroja en rangos de (800- 850nm) cercano al infrarrojo. (Hunter, 2009).

1.2.3 pH

Las características de adaptación que tiene las PPBs les han permitido crecer en casi cualquier habitat. Se las pueden encontrar en hábitats con condiciones muy extremas ambientales de temperatura, salinidad o pH, y por ello se las considera como microorganismos extremófilas. En el caso del pH, existen especies que tienen la capacidad de vivir en condiciones de pH extremadamente bajos denominadas (acidófilas) o tan elevados como 11 (alcalófilas). Una de las especies características de estas condiciones ambientales limitantes es la *Rhodospila globiformis* esta

localizada en los manantiales calientes del Parque Nacional Yellowstone, con temperaturas elevadas y pH extremo (Bullough, 2009).

1.2.3 Eliminación del Carbono

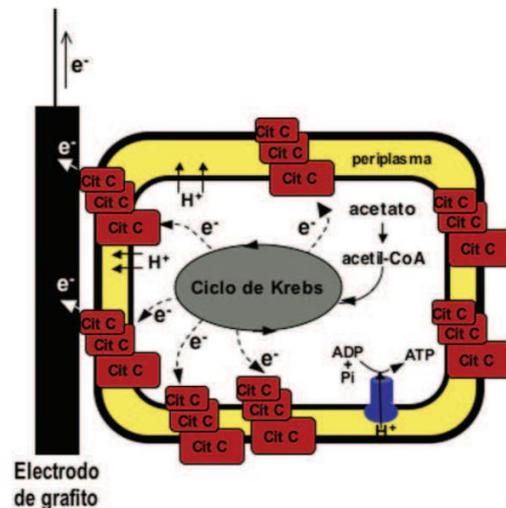


Figura 6: Modelo electrogénico de *Geobacter*. Oxidación del acetato a través del ciclo de Krebs y una extensa red de citocromos C, que conecta el citoplasma con la membrana externa. (Esteve-Núñez A., 2014).

El crecimiento de las bacterias fototróficas purpura (PPBs) es muy diverso, estas pueden crecer en condiciones limitantes de luz y a su vez crecer fototroficamente. La especie de *Rhodobacter capsulatus* puede crecer en condiciones fototróficas con CO_2 o con compuestos orgánicos, en oscuridad mediante respiración, fermentación y también mediante quimiolitotrofia. La mayoría de las bacterias se desarrollan mejor en condiciones de fotoheterotrofia, utilizando compuestos de carbono de cadena corta, aunque existen muchas especies de bacterias que tienen la capacidad de fotoasimilar una gran cantidad de compuesto (ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, compuestos aromáticos, etc.). Otras de sus características que, en condiciones anoxicas y de iluminación limitada son capaces de desarrollarse en condiciones fotoautotróficas con H_2 y en bajas concentraciones de sulfuro como donantes de electrones, aunque algunas especies poseen la capacidad de aprovechar el SO_3 o el Fe^{2+} (Puyol, 2017).

La reproducción bacteriana en estos microorganismos varía cuando las condiciones pasan a ser limitadas por la luz. Pueden ser aprovechados los compuestos fotoasimilables por las bacterias como donantes de electrones y sustrato para la

respiración anaerobia. Además de presentar una respiración anaerobia, diversas familias de bacterias se reproducen en condiciones limitantes de oxígeno y luz, en rutas de fermentación, como la *Rhodobacter capsulatus* que emplea el piruvato para crecer a través de la fermentación. (González, 2018)

La capacidad de crecimiento que poseen estas bacterias en condiciones limitantes de luz es muy versátil, el uso de bacterias fototróficas purpuras (PPBs) es muy común para el tratamiento de aguas residuales, ya que dentro de las alternativas nuevas para la depuración, se podría aprovechar las características de supervivencia en hábitats de oscuridad en procesos industriales, disminuyendo costos operativos (Puyol 2016).

La producción de biohidrógeno en estos microorganismos, sucede a través de las rutas metabólicas en condiciones de oscuridad con bacterias fermentativas. La fotofermentación que se da en el interior de las células es característico de las bacterias fototróficas purpuras, ya que poseen capacidad de oxidar materia orgánica empleando el espectro de luz infrarrojo con la enzima nitrogenasa. La producción de biohidrógeno obtenido tiene porcentajes de riqueza 65% y el 95% (Hunter, 2009).

1.3 APLICACIONES AMBIENTALES

El alto potencial de degradabilidad que tienen las PPBs en ambientes extremos llama la atención de los investigadores. La elevada producción de electrones en estos organismos PPBs puede ser disipada por tres vías, incremento de biomasa; la liberación de H₂ por la fijación del nitrógeno; la producción de compuestos de cadenas cortas y la fijación de CO₂ (Puyol, 2016). Una de las aplicaciones más importantes que se le ha dado a este tipo de bacterias es la capacidad de que tienen para almacenar el hidrógeno produciendo ácidos grasos de cadenas cortas, pudiendo ser utilizados como biocombustible.

Se ha seleccionado este tipo de bacterias por las características de adaptabilidad ambiental, las diversas rutas metabólicas en procesos de oxidación de la materia orgánica y la capacidad para aceptar electrones de un donador externo. Capturar el exceso de CO₂ producido por las PPBs puede ser útil no solo para la disminución

de las emisiones de carbono, sino también para refinar biogás a partir de materia orgánica para su uso como combustible.

El desarrollo de esta investigación busca evaluar los sistemas electroquímicos microbianos, con un diseño de reactores de lecho fluidizado para la depuración de aguas residuales sintéticas a escala de laboratorio, mediante la utilización de Bacterias Fototróficas Purpuras. Estas bacterias serán utilizadas por primera vez en este tipo de sistemas híbridos, ya que por sus características de gran versatilidad metabólica y su capacidad para aceptar electrones de un donador externo. Se busca estudiar el comportamiento de las PPBs, en presencia de un sustrato de carbono reducido, además proporcionándole una fuente externa de electrones mediante un electrodo en un reactor de lecho fluidizado (Huang, 2010).

La materia orgánica presente en el agua residual de cervecería, está caracterizada por tener compuestos producidos en la fermentación en la producción de la cerveza, principalmente una fuente de carbono de cadena corta como el acetato, además de compuestos inorgánicos. Simularemos un tipo de aguas residual sintética con las mismas condiciones, para verificar los rendimientos de bacterias fototróficas purpuras en reactores de lecho fluidizado.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Objetivo general:

- Estudiar el comportamiento de las Bacterias Fototróficas Purpuras (PPB) en la eficiencia del tratamiento de aguas residuales en reactores de lecho fluidizado a escala de laboratorio.

Objetivos específicos:

- Diseño de un biorreactor de lecho fluidizado para la tratabilidad de aguas residuales sintéticas a escala de laboratorio.
- Utilización de bacterias fototróficas purpuras en reactores de lecho fluidizado para la depuración de aguas residuales sintéticas.
- Comparación de rendimientos entre dos reactores de lecho fluidizado uno iluminado con luz infrarroja (RIR) y un reactor no iluminado (RC) en términos de biodegradación y recuperación de nutrientes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO ELECTROQUÍMICO MICROBIANO

3.1.1 Optimización

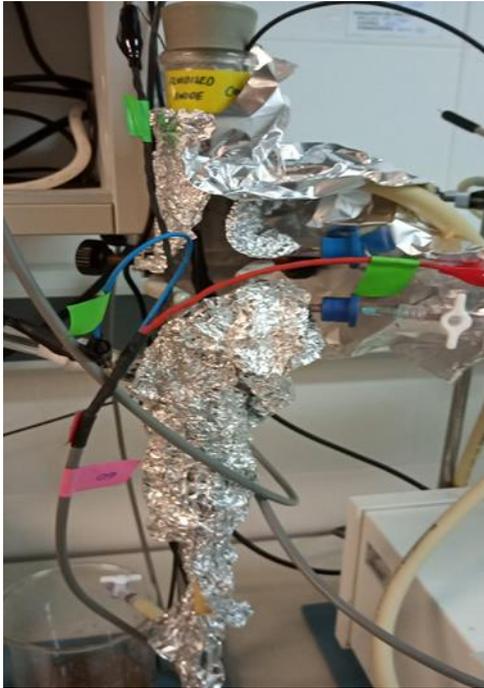
El montaje de los biorreactores se realizó en condiciones de esterilidad y anaerobias. El experimento se llevó a cabo en dos biorreactores de lecho fluidizado. El primer biorreactor se denominó Reactor Control (RC) el cual estuvo durante el periodo de experimentación en condiciones de obscuridad. El segundo biorreactor se denominó Reactor Infrarrojo (RIR) el cual estuvo durante el periodo de experimentación expuesto a irradiación de luz infrarroja. Los monitoreos se llevaron a cabo en 4 periodos denominados Pases, cada pase consta de 5 días de estudio, al finalizar los pases se realiza un cambio de medio de cultivo. Se vacía por completo los biorreactores, y se vuelve a inocular con medio fresco enriquecido.

El Reactor de Lecho Fluidizado estaba formado de una columna de vidrio (4,6 cm de diámetro interno y 30 cm de altura) con un fondo en forma cónica (4,6 cm de diámetro interno y 5,2 cm de altura). Se utilizó un alambre de platino (0,1 mm de espesor, 200 mm de longitud) como colector de corriente en los ensayos para estimular el crecimiento celular. (Tejedor, 2017)

El electrodo de trabajo (ánodo en este caso) consiste en un lecho de partículas de Carbono vítreo con un colector de corriente (20x80 mm) sumergido verticalmente en el lecho fluidizado. El reactor funcionara como un reactor de lecho fluidizado solido-liquido con una recirculación continua, el lecho se fluidizará mediante recirculación de líquidos. Se utilizó una bomba peristáltica para recircular el fluido.

La parte superior del ME-FBR se selló durante todos los experimentos para mantener un ambiente anóxico. Para la fluidización, se extrajo un flujo de recirculación desde la sección superior utilizando una bomba peristáltica (Heidolph, 5006). El medio se alimentó hacia abajo a través de un codo que condujo el flujo hacia el vértice del fondo cónico, lo que resultó un flujo ascendente de fluido a través de la columna. El volumen de trabajo total de cada reactor fue de 250 ml (incluido el tubo de recirculación y el volumen del lecho) con 20 ml de material de carbón vítreo.

A.



B.



Figura 7: Esquema de los reactores de Lecho Fluidizado, la Figura A. Reactor Control sin exposición a luz infrarroja, Figura B. Reactor con Infrarrojo.

3.2. ENRIQUECIMIENTO MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN

3.2.1 Enriquecimiento a partir de agua sintética

Se tomó una muestra de un consorcio de PPBs aisladas procedentes de investigaciones anteriores de los Laboratorios del Departamento de Ingeniería Química. Las PPBs empleadas fueron cultivadas en condiciones anaerobias. Se tomó 2 ml de PPBs con medio enriquecido Fresh Water, 0.5 ml de Vitaminas, 5 ml de minerales, 1 ml ferrocitrato (Fe^3 -Citrato a una concentración $100 \mu\text{M}$), 0.8 ml acetato como sustrato y donador de electrones, en un volumen de 40 ml, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Previamente a la inoculación, se eliminó el oxígeno gaseando el medio con una mezcla de N_2/CO_2 para lograr condiciones anaerobias, el lote de bacterias se mantuvo en botellas adecuadas en condiciones anaerobias con el uso de septum de butilo selladas con aluminio. El medio Fresh Water Medium (FWM), tiene la siguiente composición (Nevin, 2008):

Tabla 1: Composición de sales del medio

Reactivo	Cantidad (gramos)/L
Na_2HPO_4	89
$Na_2H_2PO_4$	60
NH_4Cl	1
KCl	6
$NaHCO_3$	25

Tabla 2: Solución de Minerales

Reactivo	Cantidad (gramos)
NTA	1,5
$MgSO_4$	3,0
$MnSO_4$	0,5
$NaCl$	1,0
$FeSO_4$	0,1
$CaCl_2$	0,1
$CoCl_2$	0,1
$ZnCl_2$	0,1
$CuSO_4$	0,01
$AlK(SO_4)_2$	0,01
H_3BO_3	0,01
Na_2MoO_4	0,025
$NiCl_2$	0,024
Na_2WO_4	0,025

Tabla 3: Solución de Vitaminas:

Vitamina	Cantidad (migramos)
Biotin	0,002
Folic Acid	0,002
Pyridoxine	0,01
Riboflavina (Vita B2)	0,005
Thiamine	0,005
Nicotinic acid	0,005
Pantothenic acid	0,005
Cyanocobalamin (Vit B12)	0,0001
p- aminobenzonis acid	0,005
Thioctic acid	0,005



Figura 8: Inoculo de Bacterias Fototróficas Purpuras

3.3. METODOS ANALITICOS

3.3.1. Selección del colector

Se utilizaron dos materiales de carbono diferentes como colectores: carbono isostático y carbono JP495 para evaluar el comportamiento electroquímico. Estos estudios fueron realizados en condiciones anaerobias con agua para comparar la mejor eficiencia entre ambos. Cada una de estas pruebas se realizó con el reactor en operación fluidizando y sin fluidizar. Se usaron conexiones de oro para proteger el electrodo de la corrosión.

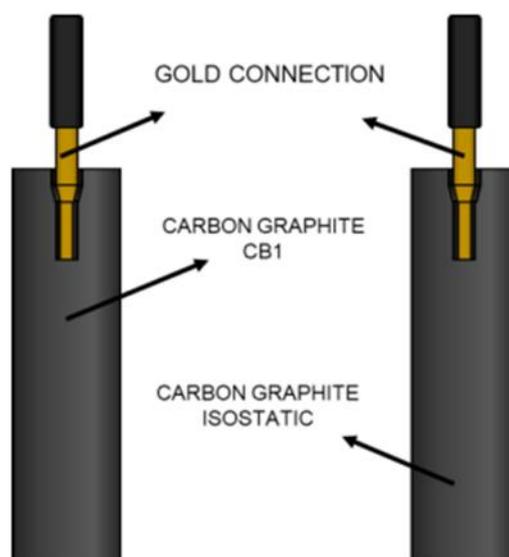


Figura 9: Esquema de los colectores actuales realizados con una varilla de grafito (carbón isostático y JP495) un conector de oro soldado al cable.

3.3.2. Toma de muestras, modo de operación y análisis

Los biorreactores fueron inoculados y puestos en funcionamiento diariamente con medio fresco enriquecido previamente preparado con acetato como fuente de carbono. Se llevaron a cabo cuatro pases, con renovación total del medio al final de cada pase. Cada pase se corresponde con cinco días de funcionamiento. Diariamente se tomaron 3 ml de muestra de los reactores en condiciones anaerobias, reponiendo ese volumen con medio fresco.

1 ml de muestra de volumen tomadas de los RC y RIR se colocan en cubetas aptas para el análisis de absorbancia y relacionar los resultados con la presencia de bacterias rojas. Se utilizó el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800 UV *spectrophometer* 190-1800 nanometers). El barrido espectrofotométrico se lo realizó en el rango de 400 a 1100 nanómetros. Para realizar las curvas de crecimiento de las bacterias, se emplearon los datos analizados con el espectrofotómetro de las muestras tomadas diariamente desde el Pase 1 al Pase 4 del cultivo. La media de la absorbancia se calculó a una longitud de onda 590 nanómetros por ser un rango distintivo de la bacterioclorofila *b*.

Los otros 2 ml del volumen restante se filtran en filtros de 0,22 μm , para la determinación de acetato en HPLC. Las muestras fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, realizando los análisis al finalizar cada pase de monitoreo.

Se utilizó el cromatógrafo líquido (HPLC) para las mediciones del consumo de acetato, utilizando el software *Galaxie*. Los datos analizados se obtuvieron a partir de una longitud de onda de 400 nm dentro del rango ultravioleta (400-1100 nm). El método utilizado para el análisis de acetato fue:

Fase móvil, constituida por ácido fosfórico al 0,1%

Columna de análisis C-610H con pre columna.

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

Tiempo de retención 20.7 min.

3.3.3. Composición del Gas Producido

La determinación de la composición del gas producido se llevó a cabo por medio de cromatografía de gases, utilizando el equipo GC-TCD (Varian, modelo 3350) de inserción de muestra manual, con columna empacada Porapak N80/100 4,5 m/1/8", detector TCD. Como gas portador se utiliza He a una presión de 40 psi.

Las temperaturas que se utilizan para la determinación de gases que son las siguientes: el inyector se ajusta a 150 grados, el detector a 120 grados, y para la separación de los gases, se somete a la columna a gradientes de temperaturas desde 40 grados hasta 150 grados, tal y como se muestra en la Figura 10.

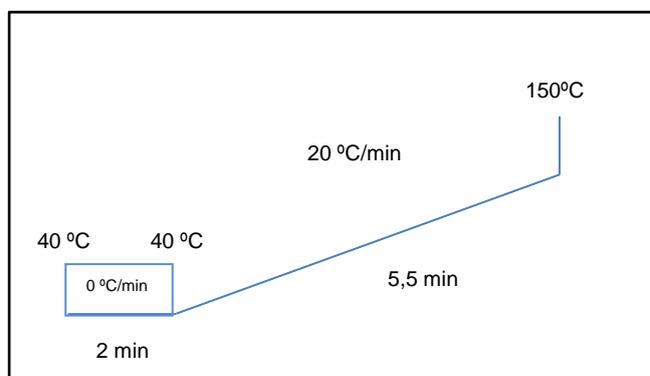


Figura 9: Gradiente de temperatura empleado en la separación de CH_4 y CO_2 .

Este método permite determinar los porcentajes de metano y dióxido de carbono del gas producido por el reactor.

- **Calibración del GC-TCD**

Para el calibrado del GC-TCD se utiliza como patrón una mezcla de gases suministrada por PRAXAIR, cuya composición es la siguiente:

Tabla 4 Composición del patrón suministrado por PRAXAIR.

Gas	Porcentaje en la mezcla
H₂	1,00
CO₂	23, 99
CH₄	75,01

3.3.4. Análisis Electroquímico

Las Voltametrías cíclicas son un tipo de medición electroquímica potenciodinámica. La utilización de este tipo de técnica se aplica a un exclusivo potencial eléctrico a un electrodo de trabajo sumergido en un medio de cultivo enriquecido con una especie electroactiva, en este caso las PPBs soportadas en un electrodo y se obtienen valores de la intensidad de corriente que circula por este electrodo; la oxidación y reducción de compuestos presentes en el medio o en la superficie del electrodo. El potencióstato utilizado para este estudio fue (Bio-Logic Sp – 150). El rango del potencial en el que el electrodo se comporta como un electrodo idealmente no polarizable y la estabilidad de la conexión en términos de ruido se evaluaron por Voltametrías cíclicas. Se hicieron voltametrías cíclicas a velocidades 50 mV/s, 20 mV/s, y 5 mV/s en el rango potencial entre 0.8 V y -0,8 V (vs Ag/AgCl). Se usó agua tampón de fosfato (100mM) como solución para todas las caracterizaciones electroquímicas. La solución fue burbujeada con gas nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto.

4. RESULTADOS

4.1 OPTIMIZACION ELECTROQUIMICA EN EL REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO

4.1.1 Optimización del colector

La experimentación de los colectores para este propósito, una vez que se identificó el mejor colector, se verificó el contacto entre el lecho y el colector por voltametría cíclica. Las voltametrías cíclicas del colector en contacto con el colector del lecho se compararon (Figura 10). Se comprobó que existe mejor conducción de energía con el reactor fluidizando el medio, por lo que se hizo funcionar como un reactor de lecho fluidizado durante la experimentación.

Durante este período, el acoplamiento redox estaba parcialmente equilibrado para promover crecimiento microbiano. Esto significa que un ME-FBR puede utilizarse como un electrodo de elemento de descarga para microorganismos pero también como un ánodo fluido, apoyando el crecimiento microbiano durante un período prolongado de tiempo. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se utilizan bacterias fototróficas purpuras, con un EET basado en transferencia directa en reactores de lecho fluidizado con ánodo. El proceso requiere el almacenamiento microbiano de electrones en los períodos en que el aceptor de electrones no es físicamente el que está en contacto con bacterias, hasta que finalmente se liberan tan pronto como las células interactúan con las partículas anódicas fluidas.

4.1.2 Selección de colectores

Para que no existan fallos en el momento de operación de los reactores electroquímicos de lecho fluidizado es necesario estudiar las características de sus partes por separado para identificar y evitar posibles fallos de operación en el reactor. Valoramos entre colectores de grafito isostática JP495 y grafito isostático. La Figura 10 nos dio más información sobre la interacción electrodo-bacteria, los voltogramas obtenidos en la producción máxima de densidad de corriente comparada en un medio acuoso FWM.

El reemplazo de medios con medios estériles frescos generó un nuevo voltagrama (línea gris) con una corriente oxidativa más baja pero el mismo potencial. Esto sugiere que el mecanismo para establecer la transferencia de electrones entre las células y el fluido en el ánodo fue el mismo pero la tasa de bioelectrocatalisis fue menor. Atribuimos esto a la reducción de la densidad celular planctónica de bacterias electroactivas.

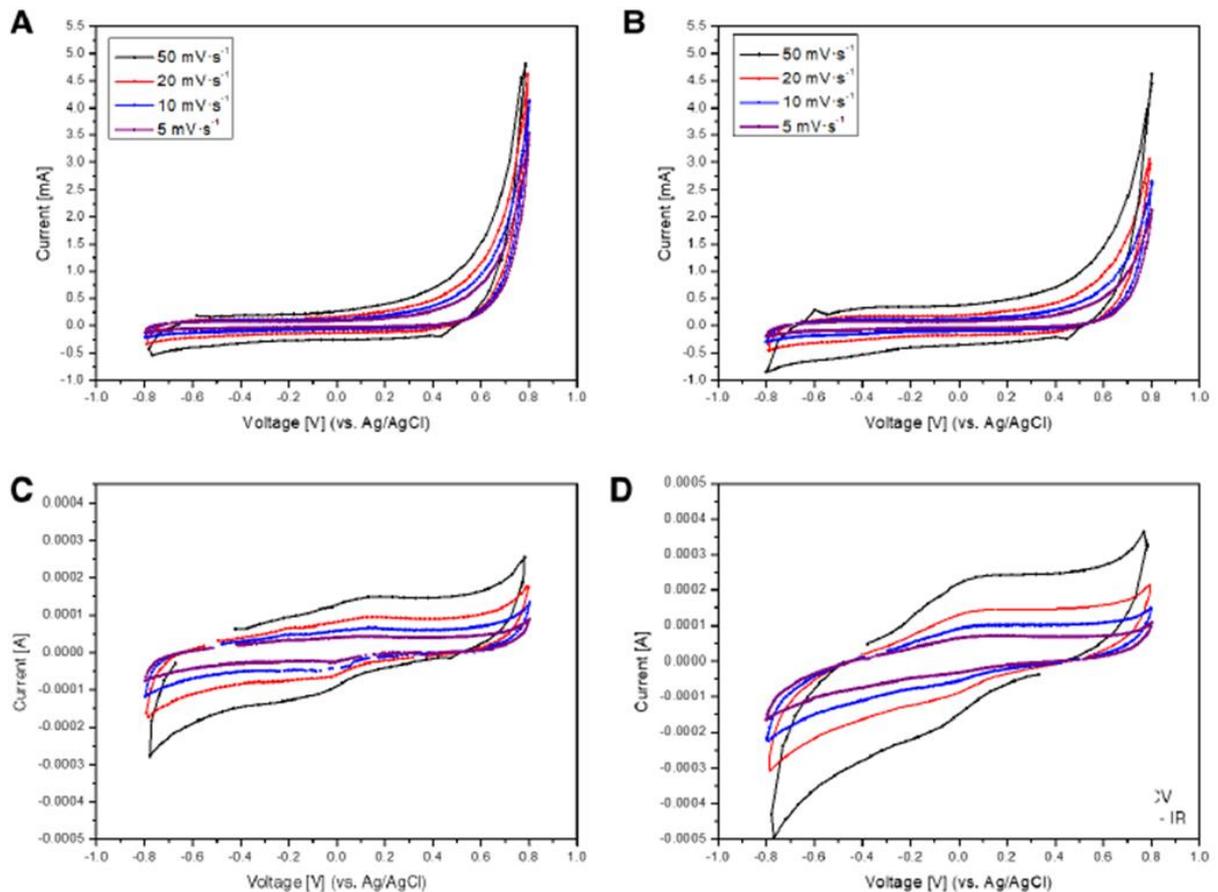


Figura 10: Comparación de Voltametrías cíclicas correspondientes a la caracterización abiótica de los colectores. Isostática grafito JP495 (A y B) y grafito isostático (C y D).

Se lo ve necesario la exploración de las partículas del ánodo del lecho fluidizado de carbón vítreo para ver la relación de la biomasa unida a las partículas en los ensayos. Lo que podría demostrar que la corriente observada se debió a la interacción entre las células planctónicas y el ánodo fluidizado sin formación de biopelículas en el reactor.

En la Figura 11 observa un aumento en la intensidad de corriente en condiciones de fluidización en los reactores, es visible por un aumento en el ancho del voltograma, esto está relacionado con un aumento en la superficie activa del electrodo, es decir, el colector está en contacto eléctrico con el lecho.

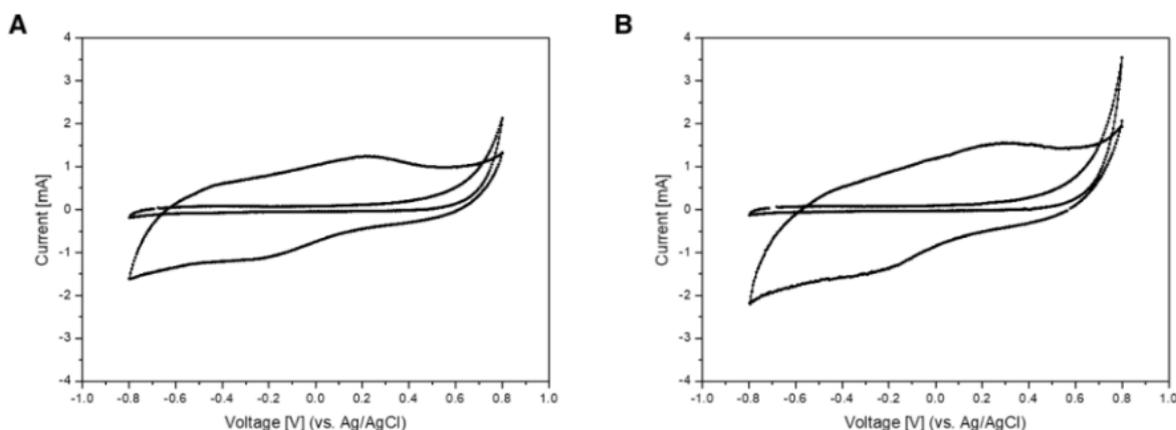


Figura 11: Voltametrías Cíclicas del colector en contacto con el lecho fijo y fluidizado.

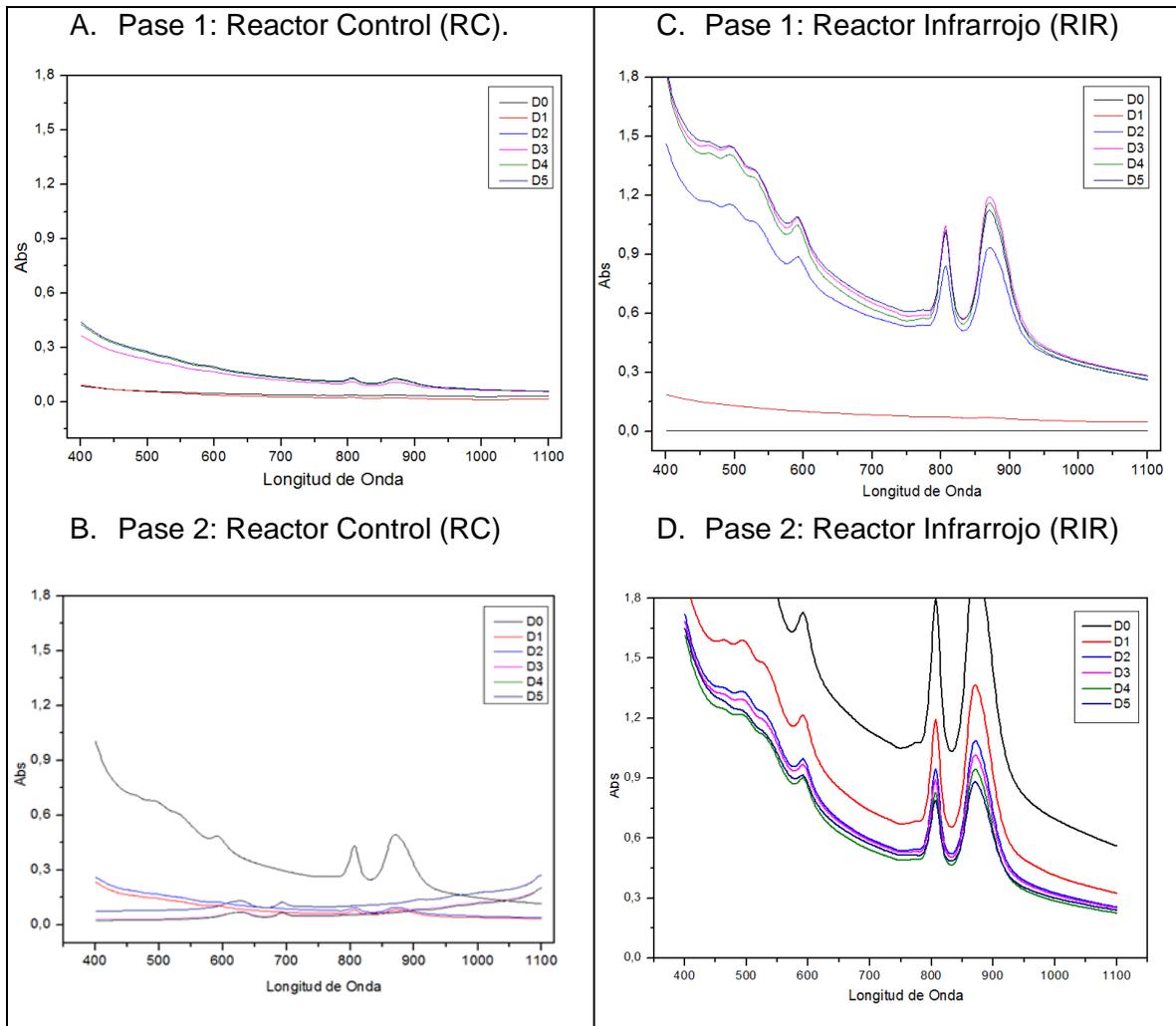
4.2 ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS FOTOTROFICAS PURPURAS

El segundo paso de este proyecto fue utilizar células electroactivas del consorcio microbiano de PPBs para probar la respuesta del sistema en el que el ánodo se asemeja a un fluido compuesto de partículas de carbón vítreo, como parte de un Reactor Microbiano de Lecho Fluidizado Electroquímico (ME-FBR). Cuando se añadió una suspensión de células cultivadas en un quimiostato en condiciones limitantes de aceptación de electrones al ME-FBR, se observó un aumento inmediato en la intensidad de corriente, lo que nos indica una transferencia de electrones extracelular (EET) efectiva con el ánodo.

Bajo diferentes condiciones de luz se comparó en porcentajes de crecimiento microbiano de estas bacterias con el mismo sustrato (acetato). La Figura 12, representa un barrido en el espectrofotómetro UV-V de las muestras obtenidas al inicio y al final de los monitoreos, tanto en el reactor en oscuridad (RC) como con irradiación infrarroja (RIR).

El experimento duró 20 días de monitoreos continuos, se dividió en 4 pases, cada pase correspondía a 5 días. En el caso del RIR se puede apreciar un incremento en los picos de excitación en los que corresponden a las bacterioclorofilas *a* y *b* en longitud de onda de 800 a 860 nanómetros, y a compuestos con carotenoides de 450 a 600 nanómetros; mientras que en los cultivos del RC no aparecen este tipo de picos al inicio. Se puede apreciar como los valores de absorbancia, así como la aparición de los picos, son claramente mayores en el reactor RIR, demostrando la buena adaptación de las bacterias al sistema fluidizado e irradiado con IR, logrando

un primer objetivo como es desarrollo de estas bacterias en un sistema de lecho fluidizado y la importante contribución a ello de la radiación con IR.



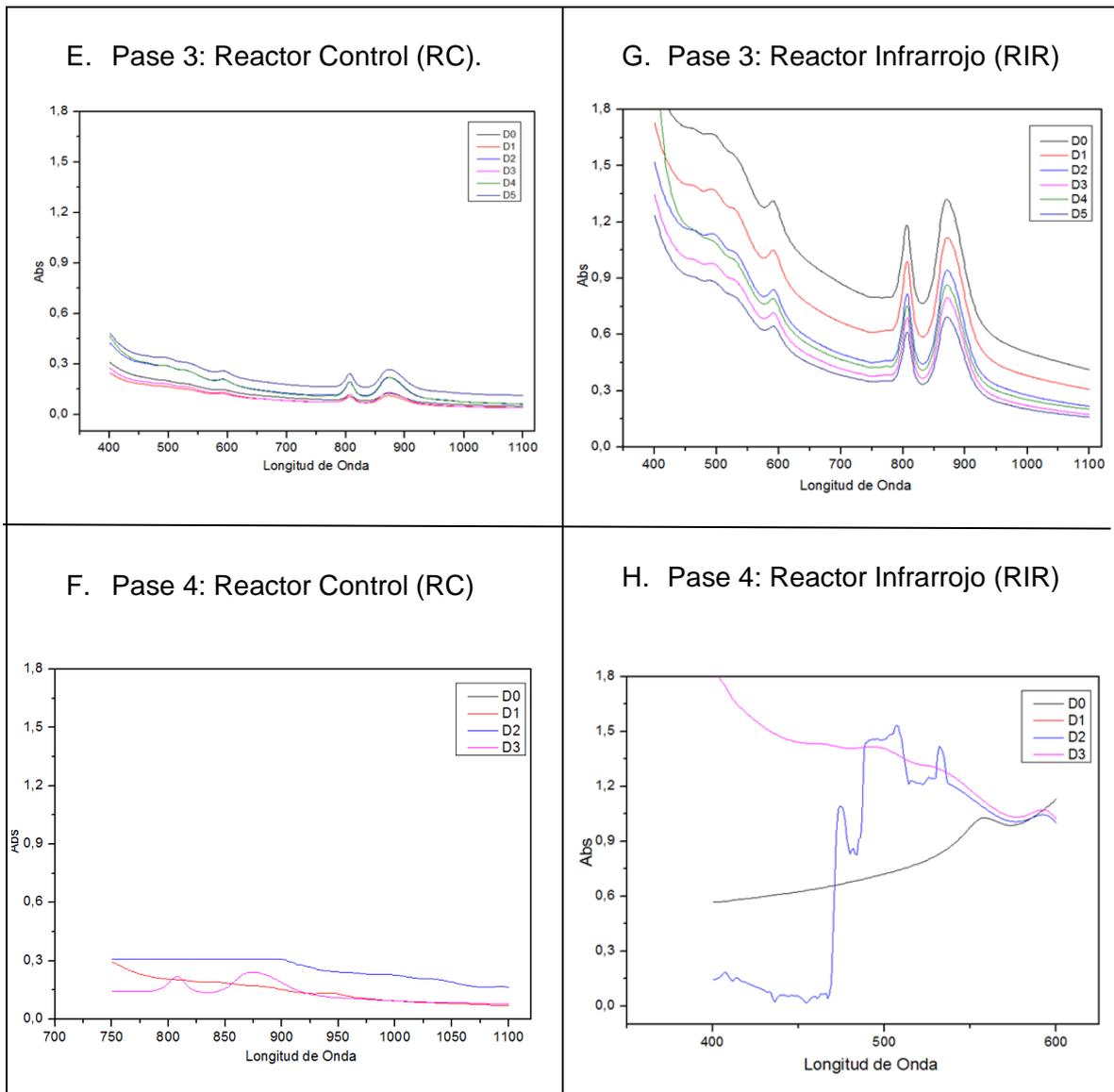
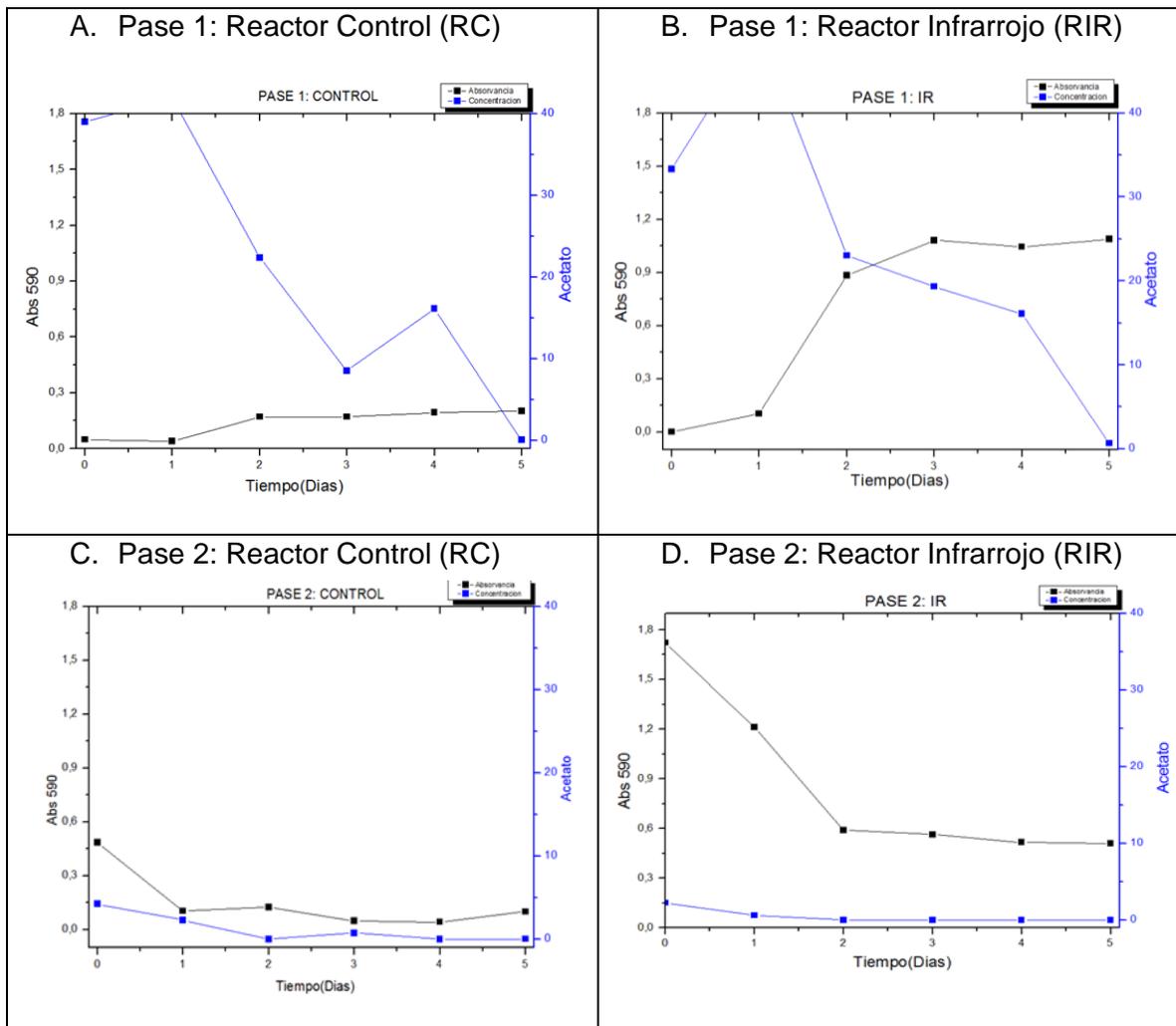


Figura 12 Comparación de cultivo de PPBs en diferentes condiciones de luz e igual fuente de carbono.

En la Figura 12 se puede apreciar los picos que corresponden a las absorbancias de la bacterioclorofila *a* (590, 800-900) nanómetros, observando el pico de absorción de la bacterioclorofila *b* (840) nanómetros. Este tipo de moléculas son propias de las bacterias fototróficas purpuras. En los rangos de las absorbancias individuales entre 450 y 550 nanómetros no se aprecia picos de absorción individual que serían los picos de distintivos carotenoides. Esto es debido a que se encuentran ocultos ya que se trabajó con un cultivo mixto de PPBs, los carotenoides presentes en la membrana celular son muy variados.

4.2.1 Degradación de Acetato

El estudio se dividió en 4 fases de experimentación donde se midió la efectividad del proceso respecto al consumo de acetato con mediciones en HPLC. De igual manera se determinó la absorbancia a 590 nm para relacionarlo con la biomasa (densidad óptica). El Pase 1 fue un periodo de estabilización en los dos reactores, existe un decaimiento en el RC de absorbancia lo que demuestra que las bacterias fototróficas se encuentran en un estado de adaptabilidad y de consumo de acetato para poder reproducirse. Teniendo desde un inicio mejores resultados en el RIR.



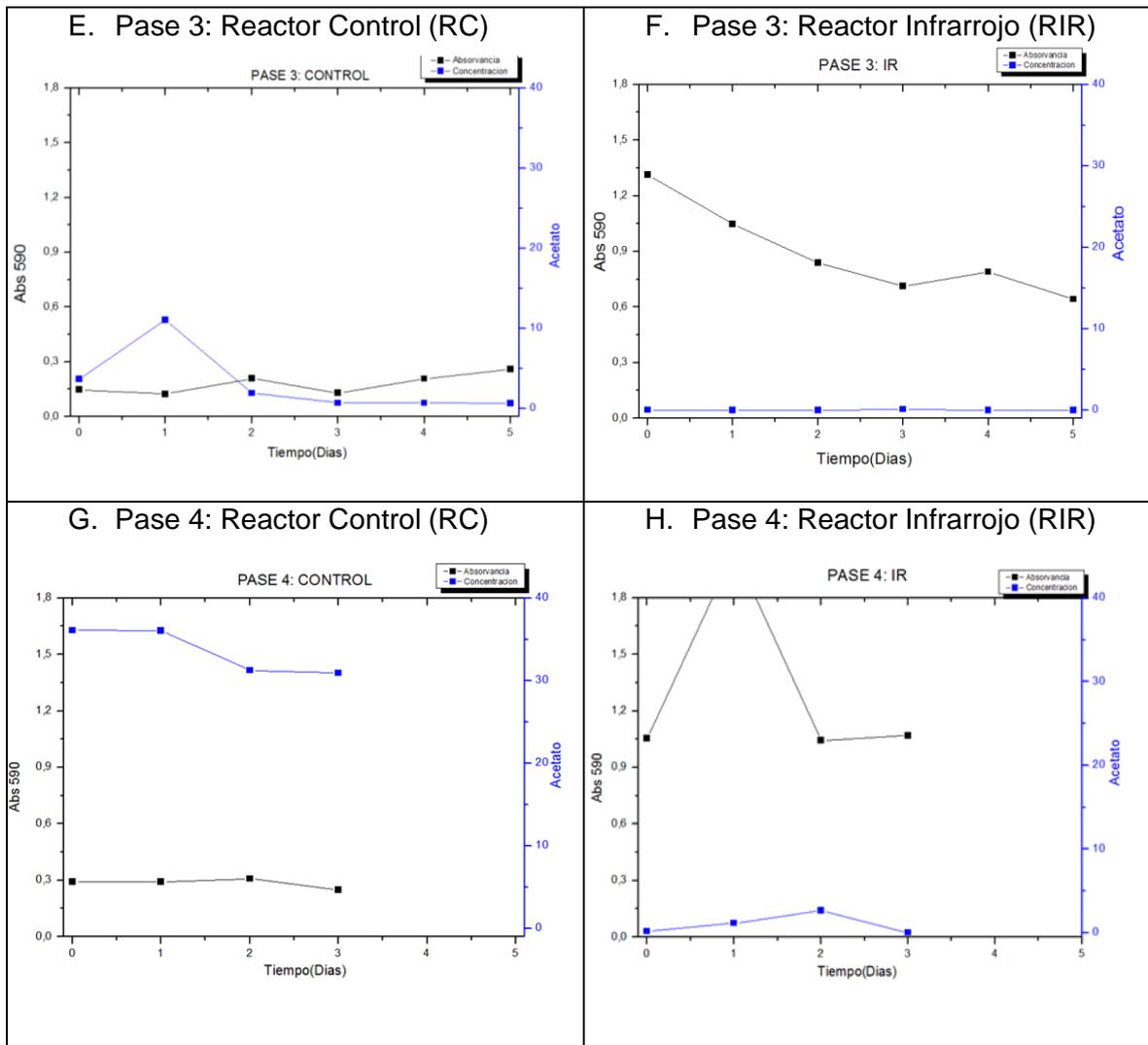


Figura 13: Relación entre el aumento de la densidad óptica a 590 nm y la concentración de acetato como fuente de carbono añadida al medio de cultivo en los pases 1 y 4 en los reactores IR y Control.

Se observa en la Figura 13 A, que existe un tiempo de adaptación de las bacterias en el RC, se ha partido de agua residual sintética simulando a una residual de cervecía, el cambio extremo de las condiciones ambiente requiere una adaptación por parte de los microorganismos, mientras que en el reactor iluminado RIR no existe un tiempo de adaptación, posiblemente porque los microorganismos ya están adaptados a las condiciones ambientales, tanto al medio de cultivo enriquecido como a la exposición de iluminación.

Según varios estudios mencionados antes la asimilación del acetato en las bacterias puede darse por distintas rutas metabólicas sin que sea la producción de biomasa necesariamente (Tabita, 2005). La densidad óptica en el primer pase sufrió

un incremento en el reactor IR (Figura 13 B) ocurre una vez terminado el sustrato suministrado, pueden haber sucedido que las bacterias utilizaron una vía metabólica diferente en presencia de otro tipo de sustratos contenidos en el medio enriquecido, es decir, ayudándoles así, poder mantener un aumento de crecimiento. El cultivo bacteriano posiblemente mediante la fijación de CO_2 pueda reponer los intermediarios en el ciclo de Krebs (Petashka, 2019) y de esta forma mantener su crecimiento.

La presencia de microorganismos fototrofos purpura redujo el acetato como se esperó, ya que el acetato al ser un sustrato simple no es una gran fuente de electrones y se deben renovar continuamente esta fuente de carbono para mantener el crecimiento en el medio de cultivo (Kawasaki, 1993). En tiempo de análisis no se llegó a determinar si ocurrió la muerte de microorganismos, para constatarlo se podría realizar un estudio de siembra en placa, mediante conteo en placa.

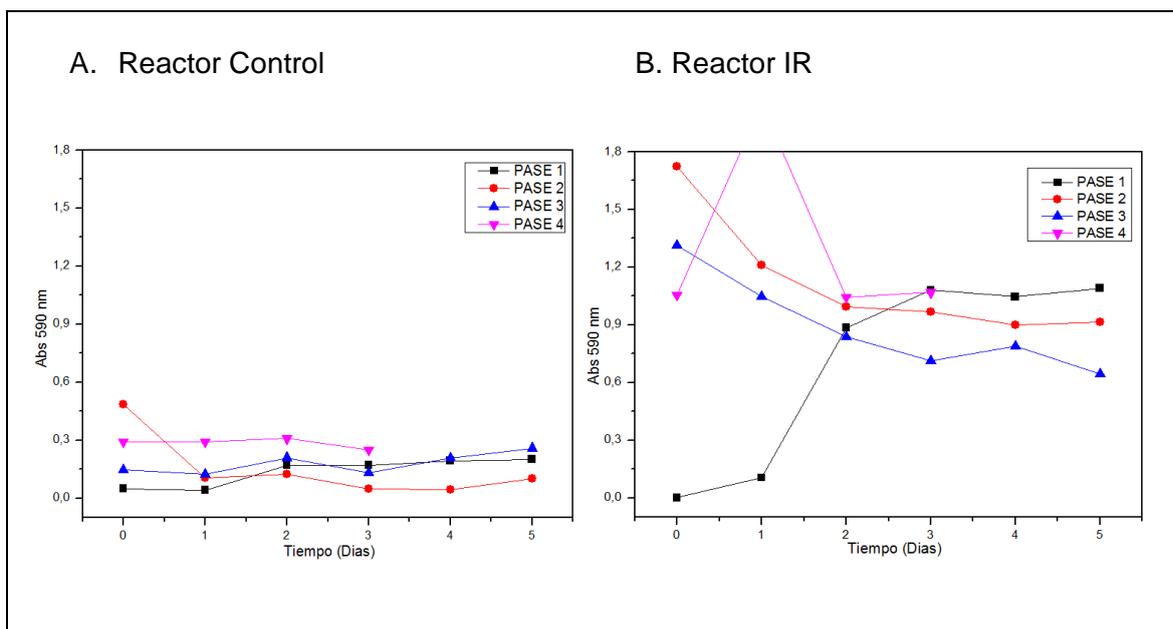


Figura 14: Comparación de Reactores Control con IR en diferentes condiciones de luz, evolución de los días en cada Pase de estudio.

La densidad óptica en el RC alcanzo niveles bastante bajos en comparación con el RIR. Esto puede haber ocurrido por un estrés inicial a que la polarización que es percibida por los microorganismos, las bacterias ante un estrés ambiental disminuyen su crecimiento.

4.2.2 Composición gas de cabeza

Para poder detectar la fijación de CO_2 en los cultivos de estudio a parte de las mediciones en HPLC, la generación de CO_2 acumulado en la parte superior de los reactores, se vio necesario medirla mediante un cromatógrafo de gases al final del estudio. Los datos de la composición de gas en la cabeza de los reactores han sido:

RC: Metano 13.7% CO_2 : 3.4%

RIR: Metano 0.96% CO_2 : 2.94%

5. DISCUSIÓN

En este trabajo de fin de Master se ha estudiado durante 20 días, la capacidad de eliminación de una fuente de carbono reducida y de nutrientes presentes en el agua residual sintética en un cultivo de bacterias fototróficas purpuras en unos biorreactores de lecho fluidizado. Al ser la primera vez que se realiza este tipo de experimentación, nos deja grandes resultados para posibles estudios. Demostrando que el mejor colector para este tipo de reactores en fluidización es el de grafito isostática JP495. Una vez puestos en marcha los reactores inoculados, se demostró que las bacterias fototróficas purpuras puede transferir directamente electrones previamente almacenados en la red de citocromos a una polarización suspendida en un electrodo, esta interacción es capaz de soportar el crecimiento sin la necesidad de formación de una biopelícula. Al promover la interacción entre las células planctónicas electroactivas y un electrodo fluidizado hecho de micropartículas en movimiento. La simulación de las condiciones en el ME-FBR, donde las células planctónicas de las PPBs están conectadas a las partículas anódicas conductoras en movimiento, podrían ser representativas a su vez útiles para estudiar la interacción entre los aceptores de electrones insolubles y la reducción de metales con bacterias. Un análisis más profundo sobre los cambios en la fisiología celular de las PPBs mientras realizan procesos continuos de carga y descarga en el ME-FBR podría proporcionar información más amplia que permitan aumentar las aplicaciones en este campo. Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad de las bacterias fototróficas púrpuras en el tratamiento de depuración de aguas sintéticas en condiciones anaerobias, abriendo la puerta a una nueva línea de investigación.

6. CONCLUSIONES

La utilización de bacterias fototróficas purpuras en la configuración de una ME-FBR ofrece un alto potencial para la eliminación de acetato, la investigación concluye:

- Se ha comprobado una alta degradabilidad de acetato con bacterias fototróficas purpura en reactores de lecho fluidizado, un crecimiento poblacional elevado de estas bacterias en este tipo de biorreactores, a exposición de luz infrarroja la oxidación de acetato es más eficiente. La adaptación de las bacterias del cultivo en el RC tarda al menos 5 días en estabilizarse en comparación con el RIR.
- Se demuestra la viabilidad de este tipo de sistemas en cultivos puros con PPBs con la utilización de agua residuales sintéticas.
- El diseño de este tipo de biorreactores favorece el crecimiento de las PPBs en suspensión, en comparación si el ánodo hubiera sido de membrana.
- Las bacterias fototróficas purpuras al no estar expuestas a una fuente iluminada de radiación infrarroja, sufren un estrés inicial de adaptabilidad frente a las condiciones ambientales extremas, al ser expuestas a una irradiación infrarroja estas no tiene un metabolismo anaerobio clásico, las bacterias purpura utilizan otras rutas metabólicas, mientras que en el RC funciona básicamente como anaerobio convencional.
- Los datos obtenidos de la medición de gases, demuestran que en el RC existe una gran cantidad de producción de gas metano, mientras que en el RIR apenas existe producción de gas, lo que lleva concluir que, las PPB en oscuridad se adaptan a las condiciones físicas del medio utilizando rutas metabólicas típicas de anaerobiosis, en el RIR, las bacterias utilizan diferentes de tipos de rutas metabólicas para la oxidación de la materia orgánica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aklujkar, M., & Beatty, J. T. (2005). The PufX protein of *Rhodobacter capsulatus* affects the properties of bacteriochlorophyll *a* and carotenoid pigments of light-harvesting complex 1. *Archives of biochemistry and biophysics*, 443(1-2), 21-32.

Benetton, X.D., Navarro-Ávila, S.G., Carrera-Figueiras, C. (2010). Electrochemical evaluation of Ti/TiO₂-polyaniline anodes for microbial fuel cells using hypersaline microbial consortia for synthetic-wastewater treatment. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, Vol. 13, No. 1, pp. 1-6.

Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3).

Borjas Hernández, & Esteve Núñez. (2012). *Biodegradación Electrogénica de Acetato en Pilas de Combustible Microbianas*. Biblioteca Digital Universidad de Alcalá. <http://hdl.handle.net/10017/20042>

Brune, D. C. (1995). Sulfur Compounds as Photosynthetic Electron Donors. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 847-870.

Bullough, P. A., Qian, P., & Hunter, C. N. (2009). Reaction center-light-harvesting core complexes of purple bacteria. In *The purple phototrophic bacteria* pp. 155-179.

Childers, S. E., Ciuffo, S., & Lovley, D. R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 416(6882), 767-769.

Erable, B., Duțeanu, N. M., Ghangrekar, M. M., Dumas, C., & Scott, K. (2010). Application of electro-active biofilms. *Biofouling*, 26(1), 57-71.

González Silva, G., Prieto, N., and Mercado, I. (2018). Large Eddy Simulation (LES) Aplicado a un lecho fluidizado gas-sólido. Parte I: Reactor a escala de laboratorio. *Revista UIS Ingenierías*, 13(1), 93-104.

Huang, J. J., Heiniger, E. K., McKinlay, J. B., & Harwood, C. S. (2010). Production of Hydrogen Gas from Light and the Inorganic Electron Donor

Thiosulfate by *Rhodospseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7717-7722.

Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 497-508.

Madigan, M.T. (2003). Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynthesis Research* 76, 157–171.

McCormick, A. J., Bombelli, P., Bradley, R. W., Thorne, R., Wenzel, T., & Howe, C. J. (2015). Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 8(4), 1092-1109.

McEwan, A. G. (1994). Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 151-164.

Merging microbial electrochemical systems with conventional reactor designs for treating wastewater. (2016). IMDEA. <http://eprints.imdea-agua.org:13000/id/eprint/710>.

Merino Muniesa. (2019). *Electrosíntesis Microbiana a partir de cultivos mixtos de bacterias fototróficas rojas*. Departamento de Biotecnología. http://oa.upm.es/57063/1/TFG_FERNANDO_MUNIESA_MERINO.pdf.

Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Orloff, A. L. Lovley, D. R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2505-2514.

Puyol, D., Barry, E. M., Hülsen, T., and Batstone, D. J. (2017). A mechanistic model for anaerobic phototrophs in domestic wastewater applications: Photo-anaerobic model (PANM). *Water Research*, 116, 241-253.

Shukla, A. K., Suresh, P, Berchmans, S., and Rajendran, A. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Curr. Sci*, 87(4), 455-468.

Tender, L. M., Gray, S. A., Groveman, E., Lowy, D. A., Kauffman, P., Melhado, J Dobarro, J. (2008). The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *Journal of Power Sources*, 179(2), 571-575.

Yurkov VV and Beatty JT (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 695–724.

Ye, Y., LaBarge, N., Kashima, H., Kim, K.-Y., Hong, P.-Y., Saikaly, P. E., and Logan, B. E. (2016). An aerated and fluidized bed membrane bioreactor for effective wastewater treatment with low membrane fouling. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2(6), 994-1003.

Yoshida, N., Miyata, Y., Doi, K. (2016). Graphene oxide-dependent growth and self-aggregation into a hydrogel complex of exoelectrogenic bacteria. *Sci Rep* 6, 21867.