

Evaluación bioenergética de *Geobacter sulfurreducens* y *Bacillus megaterium* en humedales de celdas de combustible microbianas

Oscar Guadarrama Pérez^{1*}, Cassandra Grisel Gaona Terrones¹, Alexa Carolina Guevara Pérez¹, Víctor Hugo Guadarrama Pérez¹ y Victoria Bustos Terrones¹

¹Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Dirección de Ingeniería en Tecnología Ambiental y Biotecnología, Boulevard Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, C.P. 62550, México, *oguadarrama@upemor.edu.mx

Resumen

En la actualidad, la generación de energía eléctrica se basa principalmente en la quema de combustibles fósiles, lo que resulta en una gran emisión de gases contaminantes a la atmósfera. Debido a ello, este proyecto se centró en investigar y contribuir al desarrollo de humedales de celdas de combustible microbianas (H-CCM), los cuales son una tecnología amigable con el ambiente para la producción de bioelectricidad. Se construyeron tres H-CCM utilizando tezontle como medio de soporte, *Philodendron cordatum* como especie de macrófita, electrodos de fieltro de carbono como hábitat de la biopelícula y una membrana de intercambio protónico como material divisor de cámaras (aerobia y anaerobia). Al primer humedal se le inoculó la bacteria de *Geobacter sulfurreducens* (H-CCM1), al segundo *Bacillus megaterium* (H-CCM2) y el tercero se mantuvo sin bacterias para obtener datos de control. En los H-CCM se midió el pH, conductividad, salinidad, temperatura y voltaje dos veces por semana durante 30 días. A partir de estos datos, se determinó la eficiencia fotosintética y la densidad de potencia. El objetivo de este estudio es comparar el potencial bioenergético y electrocinético entre ambas especies bacterianas. Los valores de pH se mantuvieron cerca de 8, con temperaturas entre 29 y 31°C, con salinidades alrededor de 500 mg/L y conductividades de 1381-1572 µS/cm. El H-CCM1 se destacó por producir hasta 116.64 mW/m² y alcanzar eficiencias fotosintéticas de 0.052%, mientras que el H-CCM2 solo produjo 38.44 mW/m² y mostró una eficiencia de 0.017%. Considerando lo anterior, se concluyó que la bacteria *Geobacter sulfurreducens* posee mayor capacidad sobre la especie *Bacillus megaterium* para sintetizar los exudados radiculares como sustrato, lo cual se vio reflejado en la diferencia de rendimiento bioenergético.

Palabras clave— Exudados radiculares, humedales de celdas de combustible microbianas, inoculación anódica, producción de bioelectricidad.

Bioenergetic evaluation of *Geobacter sulfurreducens* and *Bacillus megaterium* in wetlands-microbial fuel cells

Abstract

Currently, electricity generation is primarily based on the burning of fossil fuels, resulting in significant emissions of polluting gases into the atmosphere. Therefore, this project focused on researching and contributing to the development of wetlands-microbial fuel cells (W-MFC), an environmentally friendly technology for bioelectricity production. Three W-MFC were constructed using tezontle as the support medium, *Philodendron cordatum* as the macrophyte species, carbon felt electrodes as the biofilm habitat, and a proton exchange membrane as the chamber divider (aerobic and anaerobic). The first wetland was inoculated with *Geobacter sulfurreducens* bacteria (W-MFC1), the second with *Bacillus megaterium* (W-MFC2), and the third was kept bacteria-free to obtain biological monitoring data. pH, conductivity, salinity, temperature, and voltage were measured in the W-MFC twice a week for 30 days. From these data, photosynthetic efficiency and power density were determined. The objective of this study is to compare the bioenergetic and electrokinetic potential between both bacterial species. pH values were maintained near 8, with temperatures between 29 and 31°C, with salinities around 500 mg/L and conductivities of 1381-1572 µS/cm. H-CCM1 stood out by producing up to 116.64 mW/m² and reaching photosynthetic efficiencies of 0.052%, while H-CCM2 only produced 38.44 mW/m² and showed an efficiency of 0.017%. Considering the above, it was concluded that the bacterium *Geobacter sulfurreducens* has a greater capacity than the *Bacillus megaterium* species to synthesize root exudates as a substrate, which was reflected in the difference in bioenergy efficiency.

Keywords— Root exudates, wetlands-microbial fuel cells, anodic inoculation, bioelectricity production.

I. INTRODUCCIÓN

Los H-CCM han llamado la atención en los últimos años debido a su carácter innovador y sostenible, ya que combinan dos tecnologías ecológicas de gran relevancia: los humedales construidos artificialmente y las celdas de combustible microbianas [1]. Este sistema integrado permite tratar aguas residuales y generar bioenergía de manera simultánea, aprovechando la actividad metabólica de las bacterias [2]. Su interés radica principalmente en que representan una alternativa de bajo costo, autosostenible y con

mínima demanda energética externa [3]. Además, poseen una gran expectativa en el ámbito científico y ambiental porque promueven la recuperación de recursos energéticos y la economía circular [4]. Estos pueden implementarse en zonas rurales o con acceso limitado a infraestructura eléctrica, donde se reduce la huella del carbono [5], contribuyendo así a los objetivos globales de desarrollo sostenible y gestión ambiental [6].

Los H-CCM han sido diseñados y construidos primordialmente para utilizar los procesos naturales que involucran la vegetación, los suelos y los conjuntos

microbianos asociados para ayudar en el tratamiento de las aguas residuales [7]. Dentro de los H-CCM vive una gran comunidad microbiana conformada por distintas especies de bacterias electroactivas. Dichos microorganismos son capaces de oxidar la materia orgánica a la vez que liberan electrones, protones y metabolitos secundarios [8]. Al añadir los elementos propios de una celda de combustible microbiana (cátodo, ánodo, membrana y sustrato) se pueden aprovechar los electrones transferidos directamente por las bacterias hasta un electrodo para generar una corriente eléctrica [9].

La materia orgánica en un H-CCM es la fuente de energía de las bacterias y proviene de los compuestos orgánicos presentes en aguas residuales [10]. Para alcanzar una mayor densidad de potencia eléctrica y eficiencia de eliminación de contaminantes, la optimización de la configuración estructural [11,12] y las condiciones de trabajo [13,14] son fundamentales. El desempeño se ve influenciado mayormente por el tipo de microorganismos presentes en la rizósfera y por el tipo de macrófita, ya que la composición de los exudados radiculares puede o no satisfacer las necesidades biológicas de las bacterias [15]. Bajo este contexto, el presente proyecto de investigación se llevó a cabo con el propósito de analizar las ventajas derivadas del empleo de distintas especies bacterianas electroactivas. Además de evaluar el rendimiento bioenergético resultante de la exudación de la especie de macrófita empleada, siendo los rizodepósitos la única fuente de carbono disponible para ambas especies bacterianas. Se comprobó la hipótesis planteada, al demostrar que la bacteria *Geobacter sulfurreducens* posee mayor potencial bioenergético sobre la bacteria *Bacillus megaterium*. Esto debido a su capacidad de transferir los electrones directamente, lo cual se observó a partir de la evaluación de la eficiencia fotosintética y electrocinética.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se construyeron tres H-CCM por duplicado, dos contenían distintas especies bacterianas inoculadas, el tercero no fue inoculado con la finalidad de realizar evaluaciones de control. La inoculación se realizó con el ánodo sumergido en una solución de CH_3COONa (1000 mg/L). Se colocaron 10 ml de medio de cultivo NBAF con la cepa bacteriana *Geobacter sulfurreducens* (H-CCM1) con una jeringa estéril. Para la inoculación de la cepa bacteriana *Bacillus megaterium* (H-CCM2), se preparó una solución de caldo de cultivo de 10 ml en un matraz Erlenmeyer y se inoculó desde una colonia bacteriana aislada de una caja Petri. Posteriormente se succionó el medio de cultivo con la bacteria replicada y fue esparcida sobre el ánodo uniformemente con una jeringa. En total se agregaron 1×10^6 UFC/ml de *Geobacter sulfurreducens* y 1×10^8 UFC/ml de *Bacillus megaterium*.

Como electrodos se utilizaron dos piezas de fieltro de carbono (Brunssen Inc. México) de 25 cm^2 de área superficial. Estos fueron sumergidos en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) 1N durante 2 horas de forma consecutiva. Este procedimiento se realizó para eliminar las impurezas de los materiales.

Por otro lado, se colocó una cama de 10 cm de tezontle esterilizado dentro de un reactor cilíndrico de material acrílico

de 12.3 cm de diámetro por 70 cm de altura. Se llenó el reactor con roca de tezontle y se alimentó con la solución Hoagland (mezcla en g/L de KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KI , H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , KH_2SO_4 , EDTA-Na y MnSO_4). Al centro se colocó una membrana de intercambio protónico para separar la cámara aerobia de la anaerobiosis. Finalmente, se colocó la especie de macrófita *Philodendron cordatum* en la parte superficial del prototípico. En la Fig. 1 se muestra la representación esquemática del sistema experimental.

Los registros de voltaje y densidad de potencia obtenidas en los H-CCM se midieron con un sistema de adquisición de datos electrónico. Este consistió en una interconexión de una tarjeta de arduino (Mega 2560TM) y un Protoboard (Sodial 830) a una computadora. Para describir las propiedades fisicoquímicas se midió de pH, temperatura, conductividad eléctrica y salinidad en los H-CCM con un equipo multiparamétrico marca Oakton, modelo WD-35425-10. Adicionalmente se cuantificó el factor bioenergético (1) de la macrófita en ambos H-CCM.

$$E_r = \frac{D_P * A}{R_s * A_h * E_f * R_c * R_o} \quad (1)$$

Donde D_P es la densidad de potencia (mW/m^2), A es el área del ánodo (m^2), R_s es la radiación solar (W/m^2), A_h es el área superficial de las hojas de la macrófita, E_f es la eficiencia fotosintética (%), R_c es la conversión de rizodepósitos a carbohidratos fotosintetizados (%), R_o es la disponibilidad de los rizodepósitos a ser oxidados (%). Posteriormente se calculó la eficiencia fotosintética (2) de forma fraccional [8]. Para evaluar la diferencia bioenergética entre ambos H-CCM, se realizó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

$$E_{fh} = E_f * R_c * R_o * E_r \quad (2)$$

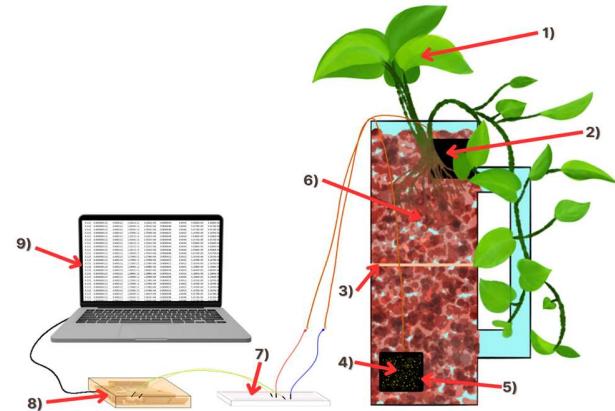


Fig. 1. Configuración de los H-CCM. Macrófita (1), cátodo (2), membrana de intercambio protónico (3), bacterias inoculadas (4), ánodo (5), tezontle (6), protoboard (7), tarjeta de Arduino (8) y sistema de procesamiento de datos (9).

Finalmente, para la evaluación de la reducción de oxígeno en los H-CCM, se utilizó un electrodo de disco rotatorio (EDR) (BASI®), donde se colocó una pieza de 3 mm de diámetro del ánodo en el electrodo de trabajo, compuesto de un disco de carbono vítreo de 0.196 cm^2 con soporte de teflón. Además, se

utilizó como contraelectrodo un alambre de platino (Pt) y un electrodo de referencia de cloruro de plata (Ag/AgCl) (sumergido en una solución de KCl 3M y pH 7). Se trabajó a 0, 10, 31, 62, 94, 125 y 157 rad/s, utilizando como medio electrolítico la solución de Hoagland. Para determinar los parámetros electrocinéticos de los H-CCM se utilizó el modelo de Levich (3). Donde n es la cantidad de electrones transferidos por cada molécula de oxígeno durante la reducción del oxígeno (e^-). F es la constante de Faraday (96485 C/mol). A es el área superficial del EDR (cm^2). D es el coeficiente de difusión (cm^2/s). v es la viscosidad cinemática (cm^2/s). ω es la velocidad de rotación del EDR (rad/s) y C° es la solubilidad del oxígeno (mol/cm^3).

$$i_{lim} = 0.62nFAD^{\frac{2}{3}}v^{-\frac{1}{6}}\omega^{\frac{1}{2}}C^\circ \quad (3)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones fisicoquímicas en el interior de los H-CCM se mantuvieron estables y constantes a lo largo de la operación.

En la Fig. 2a se muestran los resultados obtenidos del pH. Se observó que los todos H-CCM se mantuvieron en un intervalo de 7.5-7.8. De acuerdo con investigaciones realizadas por Corbella et al. [16] y Sydow et al. [17], se conoce que tanto *Geobacter sulfurreducens* como *Bacillus megaterium* muestran una clara preferencia por habitar en entornos de un rango de pH en específico. Particularmente, se ha determinado que la primera crece óptimamente en valores de pH comprendidos entre 6.2 y 7.6, mientras que *Bacillus megaterium* tiende a prosperar en ambientes con pH neutro.

Así mismo, la temperatura es un factor crucial para el

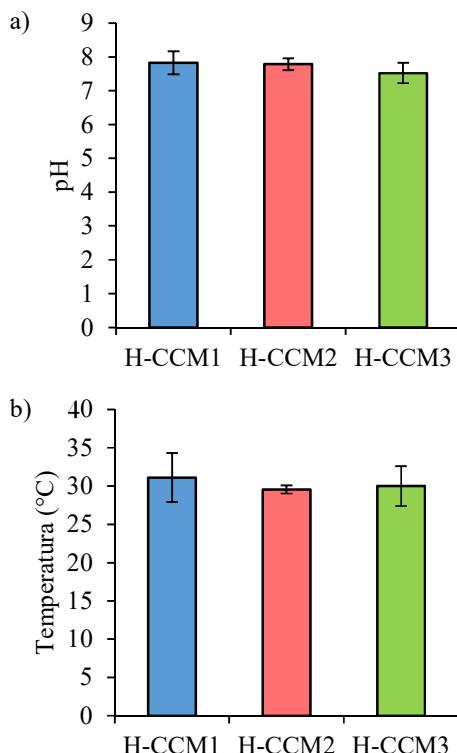


Fig. 2. Mediciones de pH y temperatura en los H-CCM.

adecuado desarrollo de estas bacterias. Patel et al. [18] describe que *Geobacter sulfurreducens* puede sobrevivir en un rango de temperaturas que oscila entre 22-30°C. *Bacillus megaterium* presenta un comportamiento óptimo en un intervalo térmico más amplio, abarcando desde 3-45°C. Resulta relevante señalar que ambos parámetros descritos en estos estudios de referencia cuentan con valores muy aproximados con los medidos en los H-CCM1 y H-CCM2, cuyos resultados se presentan en la Fig. 2b. De acuerdo con la interpretación de los datos, se puede inferir que ambas especies bacterianas se encontraron en sintonía con las condiciones ambientales en las que habitaban en cada humedal de forma individual.

Las concentraciones de sales disueltas medidas en los H-CCM presentan disimilitudes no significativas entre ellas. Prueba de ello se observa en la Fig. 3a, donde la concentración media de sales en el H-CCM3 supera en un 10.6% al H-CCM1 y un 5.2% a H-CCM2. Adicionalmente, se observa que las concentraciones se mantuvieron cercanas dentro de un rango de 490-550 mg/L. Rosenbaum et al. [19] describen que en los ambientes salobres mejora la conductividad eléctrica en comparación con los sistemas de agua dulce, lo que se refleja en mejores rendimientos bioenergéticos [20]. Sin embargo, investigaciones realizadas por Villasenor et al. [21] demuestran que las concentraciones de sales disueltas mayores a 1 g/L son suficientes para reducir hasta un 27% la actividad microbiana, viéndose afectada severamente en concentraciones mayores 20 g/L. Los H-CCM de este estudio llegan únicamente a 0.6 g/L de concentración, por lo tanto se considera que las bacterias llevaron a cabo sus funciones biológicas vitales sin problema.

En la Fig. 3b se muestran los resultados obtenidos de la conductividad eléctrica en los H-CCM.

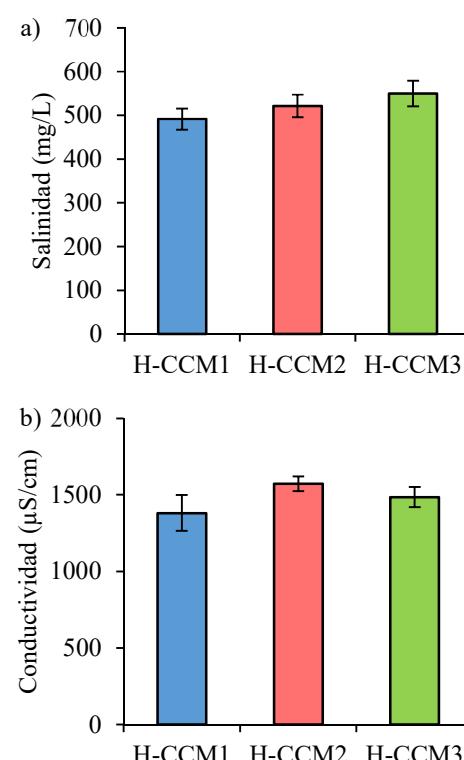


Fig. 3. Mediciones de salinidad y conductividad en los H-CCM.

Se registraron valores superiores en H-CCM2 ($1572 \pm 47.33 \mu\text{S}/\text{cm}$), seguido por el H-CCM3 ($1485 \pm 65.50 \mu\text{S}/\text{cm}$) y el H-CCM1 ($1381 \pm 116.68 \mu\text{S}/\text{cm}$). La conductividad eléctrica presentó poca variación, dichas conductividades se encuentran dentro del rango de valores ideales para el correcto desempeño de la macrófita *Philodendron cordatum* [22,23]. An et al. [24] describe que las especies del género *Philodendron* comúnmente utilizadas como plantas de jardines interiores se desarrollan en ambientes óptimos cuando se encuentran bajo conductividades de $1000\text{-}2000 \mu\text{S}/\text{cm}$.

La comparación de la densidad de potencia, principalmente en los dos H-CCM que contenían bacterias inoculadas, revela notables diferencias entre sí (Fig. 4). Se hicieron mediciones de la bioelectricidad con ausencia de bacterias en el H-CCM3 para fundamentar la realización de este proyecto, tomando en cuenta las mismas condiciones ambientales y modo de operación. Se destaca que el H-CCM1 mostró un rendimiento evidentemente mayor en términos de densidad de potencia, alcanzando un valor máximo de $116.64 \pm 14.54 \text{ mW}/\text{m}^2$. Un estudio llevado a cabo por Nevin et al. [25] respalda la eficacia de la especie *Geobacter sulfurreducens* al registrar densidades de potencia de hasta $1.88 \text{ W}/\text{m}^2$. Este rendimiento incluso ha superado a comunidades mixtas bacterianas en cuanto a producción de bioelectricidad. Si se excluye el área del ánodo, se revela el voltaje máximo registrado en H-CCM1, el cual fue de $540 \pm 9.12 \text{ mV}$. Esta lectura supera en casi un 26% el voltaje obtenido por Ebrahimi et al. [26], que fue de 400 mV . De esta manera, se resalta la eficiencia energética superior de este H-CCM en comparación con investigaciones previas. En cuanto a la bacteria *Bacillus megaterium* (H-CCM2), registró una producción máxima de voltaje de $310 \pm 17.52 \text{ mV}$. En comparación con otros estudios, Borah et al. [27] reportaron un voltaje de 698 mV en un H-CCM con plantaciones de té. Inicialmente aislaron y estudiaron 25 cepas bacterianas. Después de realizar una serie de estudios microbiológicos, concluyeron que la especie *Bacillus megaterium* posee mayor potencial bioenergético sobre las otras especies. Esto fue atribuido a que la bacteria cuenta con mayor afinidad con el sustrato orgánico. En otro estudio, Kim et al. [28], inocularon la misma especie bacteriana sobre un H-CCM con un ánodo de hidrogel. Reportaron un voltaje de 250 mV durante su operación. Cuando aplicaron una solución de 0.5% de glucosa, 1% de goma guar, 10% de borato de sodio y 88.5% de medio de cultivo, observaron un aumento de 150 mV , lo que corresponde a una mejora del 40% de rendimiento. Kovalenko et al. [29] emplearon la cepa *Bacillus megaterium* MK64-1 para producir bioelectricidad, alcanzando un rendimiento de $14.1 \text{ mW}/\text{m}^2$. El objetivo fue evaluar el rendimiento bioenergético en dos medios electrolíticos (agua sintética y medio Ashby). Observaron que la diferencia en la composición de los medios de cultivo no tuvo un efecto significativo en la dinámica de los parámetros electroquímicos de estudio. Concluyeron que esta cepa es resistente a los cambios en el medio en el que se desarrolla. Yoganathan y Ganesh [30] evaluaron las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* durante la generación de bioenergía, registrando 691 y 651 mV respectivamente. Concluyeron que el aumento de la concentración de sustrato

beneficia la producción de bioelectricidad, recomendando aplicar estas cepas para el tratamiento de aguas residuales, ya que poseen un alto potencial bioenergético.

Nimje et al. [31] informaron que al utilizar *Bacillus subtilis* en una CCM durante un período de operación de 3 meses, se generó un voltaje promedio de 370 mV . Esto indica un rendimiento comparable a la capacidad de *Bacillus megaterium* en el H-CCM2. En otro estudio relevante, Treesubsuntorn et al. [32] emplearon *Bacillus thuringiensis* y obtuvieron valores máximos de densidad de potencia dentro de un rango de $20\text{-}35 \text{ mW}/\text{m}^2$. Al analizar esta información, se observa que dichas cifras son cercanas a la densidad de potencia obtenida por *Bacillus megaterium* ($38 \text{ mW}/\text{m}^2$) de este estudio.

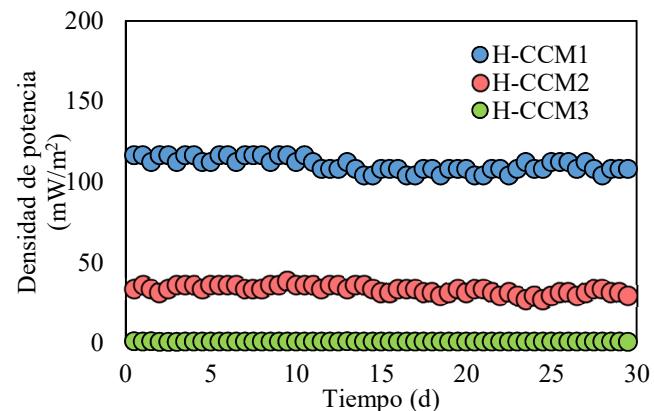


Fig. 4. Densidad de potencia obtenida en los H-CCM.

La producción de bioelectricidad en los H-CCM se lleva a cabo por la interacción simbiótica entre diversos elementos. Uno de esos elementos es la presencia de bacterias electroactivas y las rizodeposiciones excretadas por la macrófita presente en el sistema, ya que constituyen la principal fuente de sustrato [14]. Los exudados están compuestos por diversas sustancias, siendo los carbohidratos los más predominantes [33]. Se conoce que los carbohidratos son la principal fuente de energía para los seres vivos. En el caso específico de los carbohidratos exudados por la macrófita *Philodendron cordatum*, se encuentran azúcares como la glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa [8]. De acuerdo con los estudios de Guadarrama-Pérez et al. [34], la glucosa y la sacarosa presentan un índice de biodegradabilidad superior en comparación con la fructosa y la galactosa, situándose entre el 45% y el 65%. Dado que estas dos sustancias son moléculas sencillas (monosacárido y disacárido), las bacterias pueden oxidarlas fácilmente y satisfacer sus necesidades energéticas de manera acelerada [35]. Es importante que la fotosíntesis, de la cual los exudados radiculares son un subproducto, se lleve a cabo de manera eficiente para lograr una mejor producción de estos compuestos. Para ello, es necesario captar una cantidad óptima de luz solar y carbono, ya que se estima que entre el 40% y el 60% del carbono fijado por las macrófitas durante la fotosíntesis, se libera al medio en forma de exudados radiculares a través de diversos procesos bioquímicos [14,36]. Un paso esencial para comprender la relación entre la macrófita

utilizada dentro de los H-CCM y la cantidad de energía lumínica que potencialmente pudo haber sido transformada por la misma, fue la cuantificación del área superficial de sus hojas. De las 44 hojas que poseía el espécimen de *Philodendron cordatum* empleado en los experimentos, se determinó un área superficial individual promedio de $0.002 \pm 0.001 \text{ m}^2$. Cabe destacar que se consideró una radiación solar promedio de $273 \pm 28 \text{ W/m}^2$ para el cálculo de la eficiencia fotosintética, dato obtenido del Sistema Meteorológico Nacional para la zona geográfica en la que se realizó el experimento. Es importante destacar que esta macrófita en cuestión pertenece al grupo con vía fotosintética C3. De acuerdo con Guadarrama-Pérez et al. [37], esta especie exhibe una eficiencia fotosintética promedio de 3.2%, un índice de conversión de rizodepósitos a carbohidratos fotosintetizados del 20% y una biodisponibilidad de los rizodepósitos para ser oxidados por las bacterias del 30%. Para evaluar la eficiencia fotosintética en los H-CCM (Fig. 5), se seleccionaron los valores máximos de densidad de potencia. Se observó que en el H-CCM1 el valor promedio máximo fue de $0.052 \pm 0.002\%$, en contraste con el H-CCM2, el cual obtuvo un valor de $0.017 \pm 0.001\%$. La comparación entre ambas especies bacterianas demostró que existen diferencias significativas (valor-P <0.0001), tanto en la generación de densidad de potencia como en la eficiencia fotosintética.

Una vez considerado esto, es pertinente referirse al estudio realizado por Guadarrama-Pérez [34]. En dicha investigación, se evaluó la capacidad de *Philodendron cordatum* para la conversión energética en un H-CCM, revelando un rendimiento del 0.0014%. Es notable que este valor representa una gran inferioridad con respecto a las eficiencias obtenidas en los H-CCM1 y H-CCM2, a pesar de que el H-CCM2 no se encuentra distante de este resultado en comparación con el H-CCM1. Este hallazgo sugiere que la macrófita *Philodendron cordatum* puede lograr mayores eficiencias energéticas al emplear bacterias como *Geobacter sulfurreducens* y *Bacillus megaterium*, maximizando el potencial de sus exudados radiculares, siendo la primera especie mencionada mayormente recomendada por su mayor rendimiento bioenergético. Resulta esclarecedor comparar estos resultados con la investigación realizada por Li et al. [38], quienes utilizaron a *Philodendron cordatum* en un H-CCM con un ambiente rizosférico en el que predominaba la bacteria *Geobacter sulfurreducens*. Reportando

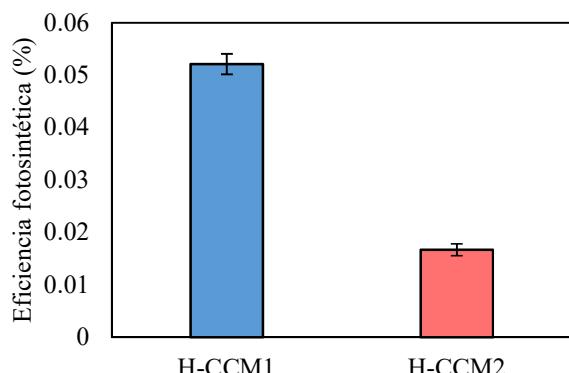


Fig. 5. Eficiencia fotosintética obtenida en los H-CCM.

una producción de bioelectricidad de 66.22% mayor en comparación con un sistema que no cuenta con macrófita.

Las bacterias electroactivas inoculadas en la cámara anódica se caracterizan principalmente por la capacidad de liberar electrones y protones cuando oxidan compuestos orgánicos [14]. En este caso, la materia orgánica proviene directamente de la exudación de *Philodendron cordatum*. La conexión entre el ánodo y el cátodo se establece a través de un circuito externo, por el cual los electrones liberados por las bacterias se desplazan. Al llegar a la cámara catódica, los electrones utilizan al oxígeno como aceptor final, resultando en su reducción. La generación de una diferencia de potencial, que provoca que la cámara catódica adquiera una carga negativa, propicia el paso de protones a través de la membrana de intercambio protónico [9]. Los protones se unen a las moléculas de oxígeno reducidas para formar agua, siendo posible también la formación de dióxido de carbono y otros compuestos como subproductos del proceso [14]. Con la finalidad de conocer el comportamiento de la reacción de reducción de oxígeno (RRO), se evaluó la respuesta de la corriente al aplicar determinado potencial electrocinético con el EDR. Una vez registrada la densidad de corriente resultante ante estas alteraciones, se trazó un voltamperograma (Fig. 6). En esta figura se aprecia de forma visual que en el eje horizontal aparece el voltaje que se va midiendo en el electrodo de trabajo con respecto al electrodo de referencia (Ag/AgCl). El hecho de que se observen valores negativos en ambos ejes indica que estaba ocurriendo un proceso de reducción [24], por lo que únicamente se ilustra el proceso ocurrido en el cátodo.

De acuerdo con Estrada-Arriaga et al. [39], cuando se aplica un potencial a un EDR se muestran comportamientos de tres etapas que toman lugar de forma consecutiva: transferencia electrónica, mixta y de masa. La transferencia de electrones se representa cuando recién se aplica el voltaje al sistema, por lo que se puede considerar como una etapa de estabilización y que no muestra resultados relevantes. La zona mixta es la transición entre las otras dos zonas y junto con la de transferencia de masa solamente tienen lugar en el H-CCM1 y H-CCM2. Es notable que el H-CCM2 se encuentra ligeramente por encima del H-CCM1, pero ambas con inclinación a partir de un rango de -700 a -900 mV. Lo anterior infiere que en H-CCM1 tuvo una superior reducción del oxígeno presente en la solución electrolítica. Por contraparte, en el H-CCM3 no hubo una RRO notable, ya que la gráfica mantuvo un comportamiento constante respecto al eje de la intensidad de corriente, esto debió a que corresponde al H-CCM de control.

La identificación de la vía específica de reducción de oxígeno llevada a cabo en los H-CCM es esencial para la comprensión de otros procesos electroquímicos involucrados. Bajo esta interrogante, se procedió a emplear la ecuación de Levich (3), la cual es una herramienta que contribuye a la determinación del número de electrones involucrados la reducción de oxígeno [19]. Con este modelo se calculó la corriente límite (i), la cual se origina a partir de la concentración de oxígeno en la solución y su correspondiente difusión en el seno de la solución [39]. No obstante, es importante destacar que estos datos no

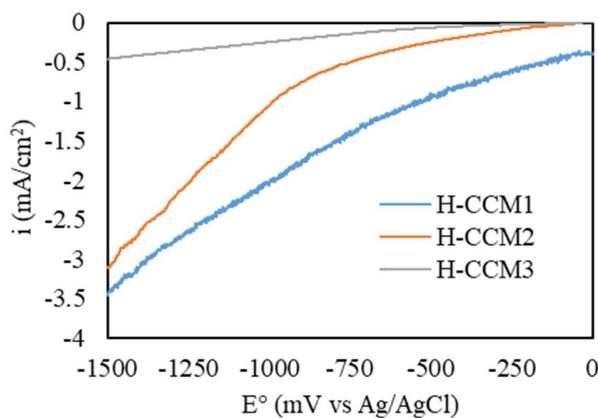


Fig. 6. Respuesta del potencial aplicado con el EDR en los H-CCM.

brindan claridad respecto a la vía específica de reducción que tuvo lugar durante las pruebas, por lo que se utilizaron dos pendientes de referencia para interpretar dicha información, cada una de ellas asociada a las dos posibles vías de reducción: la directa ($4e^-$) y la indirecta (e^-). Para la generación de estas rectas, se utilizaron valores teóricos de la solubilidad del oxígeno, establecidos en 0.0000011 mol/cm³, así como valores de viscosidad cinemática de 0.0107 cm²/s [17]. Es importante señalar que, mientras que las pendientes de referencia utilizaron un valor teórico de coeficiente de difusión de 0.000014 cm²/s, para la pendiente correspondiente al comportamiento de la reducción del oxígeno utilizando el ánodo de carbono, se optó por utilizar datos empíricos obtenidos durante el estudio experimental de este mismo parámetro.

Considerando los hallazgos de Castresana et al. [40], la implementación de electrodos de carbono favorece la reducción de forma directa. En la Fig. 7 se muestran las vías de RRO de los H-CCM. Al graficar los valores de la corriente límite, se exhibe un comportamiento lineal que se asemeja notablemente a la pendiente asociada con la vía de cuatro electrones. Este patrón lineal sugiere que, al emplear un ánodo de material de fielro de carbono condujo a una RRO directa. En otras palabras, la transformación del oxígeno tuvo como producto

final agua, sin pasar previamente por la etapa intermedia de ser convertido a peróxido de hidrógeno. Estos resultados pueden ser respaldados al considerar las investigaciones realizadas por Estrada-Arriaga et al. [39] y Bond [11], quienes de forma independiente emplearon electrodos de fielro y tela de carbono en su experimentación. Ambos equipos de investigación, al evaluar dichos electrodos mediante la determinación de la corriente límite, obtuvieron como resultado que la reducción del oxígeno también tuvo tendencia a ocurrir a través de la vía directa.

IV. CONCLUSIONES

La implementación de *Geobacter sulfurreducens* en los H-CCM evidenció un rendimiento bioenergético superior al 66% en términos de densidad de potencia sobre la bacteria *Bacillus megaterium*, considerando que fueron evaluadas bajo las mismas condiciones de operación. Además, el uso de la macrófita *Philodendron cordatum* tuvo una eficiencia de conversión de la energía que superó expectativas supuestas conforme a la revisión bibliográfica. Pertinentemente, las condiciones fisicoquímicas de pH, temperatura, conductividad eléctrica y salinidad de los H-CCM se mantuvieron dentro de los parámetros de control, donde los resultados describen un ambiente óptimo de desarrollo biológico tanto para las bacterias como para la macrófita.

Por otra parte, se observó que el empleo de electrodos de fielro de carbono permitió una RRO por la vía directa. La presencia de bacterias representó una gran importancia y mejora en el desempeño bioenergético, ya que los H-CCM que las contenían mostraron mayores velocidades de la RRO en comparación con el H-CCM3 que no tenía ninguna bacteria inoculada. Se destaca que *Geobacter sulfurreducens* mostró una reducción del oxígeno superior que *Bacillus megaterium* debido a un superior rendimiento bioenergético.

La aportación más importante de este estudio radica en demostrar la diferencia de rendimiento bioenergético en distintas especies bacterianas como inóculos aislados. Los resultados obtenidos evidencian la viabilidad técnica del sistema para su implementación a escala piloto, especialmente si se optimizan factores como el material de los electrodos, el control de las condiciones fisicoquímicas y la integración de sistemas modulares. Las futuras investigaciones deberían enfocarse en realizar combinaciones adecuadas de macrófitas y bacterias que favorezcan la producción de exudados radiculares ricos en carbohidratos. Esto, con la finalidad de extender el tiempo de operación y la estabilidad del sistema. También se recomienda aislar nuevas cepas bacterianas a partir de biopelículas mixtas para evitar la competencia por los electrones, lo cual favorecería la producción de bioelectricidad. El uso de otros nanomateriales biocompatibles también podría mejorar la eficiencia electroquímica, donde se podrían implementar sensores automatizados, suministrados energéticamente por el mismo sistema como una aplicación práctica renovable.

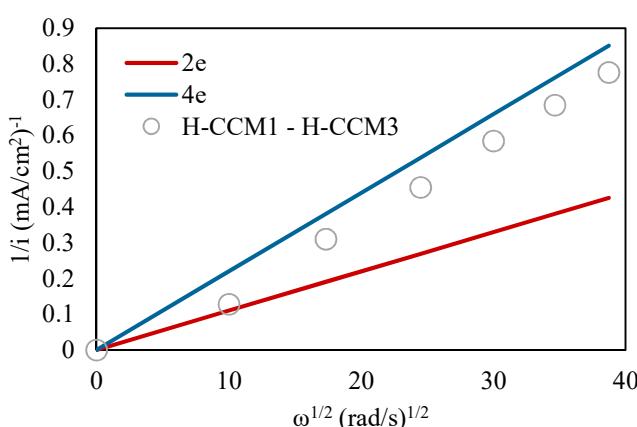


Fig. 7. Gráfica de Levich de los H-CCM.

REFERENCIAS

- [1] Youssef, Y. A., Abuarab, M. E., Mahrous, A., Kurniawan, T. A., Abdellatif, H. R., Mahmoud, M. (2024). A comprehensive overview of constructed wetland-microbial fuel cells for enhancing organic waste treatment and renewable energy production: From fundamentals to applications. *Journal of Water Process Engineering*, 64, 105592.
- [2] Turker, O. C., Vymazal, J., Ture, C. (2014). Constructed wetlands for boron removal: a review. *Ecological Engineering*, 64, 350-359.
- [3] Rafieenia, R., Sulonen, M., Mahmoud, M., El-Gohary, F., Rossa, C. A. (2022). Integration of microbial electrochemical systems and photocatalysis for sustainable treatment of organic recalcitrant wastewaters: Main mechanisms, recent advances, and present prospects. *Science of The Total Environment*, 824, 153923.
- [4] Bazilian, M., Rogner, H., Howells, M., Hermann, S., Arent, D., Gielen, D., Yumkella, K. K. (2011). Considering the energy, water and food nexus: Towards an integrated modelling approach. *Energy policy*, 39(12), 7896-7906.
- [5] Liu, J., Cai, X., Wang, Y., Ren, G., Zhou, L., Mahmoud, M., Yuan, Y. (2023). Moisture-induced electrical power generation with waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 472, 144868.
- [6] Gupta, S., Srivastava, P., Patil, S. A., Yadav, A. K. (2021). A comprehensive review on emerging constructed wetland coupled microbial fuel cell technology: Potential applications and challenges. *Bioresource Technology*, 320, 124376.
- [7] Doherty, L., Zhao, Y., Zhao, X., Hu, Y., Hao, X., Xu, L., Liu, R. (2015). A review of a recently emerged technology: constructed wetland-microbial fuel cells. *Water Research*, 85, 38-45.
- [8] Nitisoravut, R., Regmi, R. (2017). Plant microbial fuel cells: A promising biosystems engineering. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 81-89.
- [9] Thapa, B. S., Kim, T., Pandit, S., Song, Y. E., Afsharian, Y. P., Rahimnejad, M., Oh, S. E. (2022). Overview of electroactive microorganisms and electron transfer mechanisms in microbial electrochemistry. *Bioresource Technology*, 347, 126579.
- [10] O'Brien, J. P., Malvankar, N. S. (2016). A Simple and Low-Cost Procedure for Growing *Geobacter sulfurreducens* Cell Cultures and Biofilms in Bioelectrochemical Systems. *Current Protocols in Microbiology*, 43(1), A-4K.
- [11] Bond, D. R., Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1548-1555.
- [12] Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., Lovley, D. R. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3180-3187.
- [13] Paucar, N. E., Sato, C. (2022). An overview of microbial fuel cells within constructed wetland for simultaneous nutrient removal and power generation. *Energies*, 15(18), 6841.
- [14] Deng, H., Chen, Z., Zhao, F. (2012). Energy from plants and microorganisms: progress in plant-microbial fuel cells. *ChemSusChem*, 5(6), 1006-1011.
- [15] Araneda, I., Tapia, N. F., Lizama Allende, K., Vargas, I. T. (2018). Constructed wetland-microbial fuel cells for sustainable greywater treatment. *Water*, 10(7), 940.
- [16] Corbella Vidal, C., Steidl, R. P., Puigagut Juárez, J., Reguera, G. (2017). Electrochemical characterization of *Geobacter lovleyi* identifies limitations of microbial fuel cell performance in constructed wetlands. *International Microbiology*, 20(2), 55-64.
- [17] Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8481-8495.
- [18] Patel, D., Bapodra, S. L., Madamwar, D., Desai, C. (2021). Electroactive bacterial community augmentation enhances the performance of a pilot scale constructed wetland microbial fuel cell for treatment of textile dye wastewater. *Bioresource Technology*, 332, 125088.
- [19] Rosenbaum, M., He, Z., Angenent, L. T. (2010). Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells. *Current opinion in Biotechnology*, 21(3), 259-264.
- [20] Kuleshova, T., Rao, A., Bhadra, S., Garlapati, V. K., Sharma, S., Kaushik, A., Sevda, S. (2022). Plant microbial fuel cells as an innovative, versatile agro-technology for green energy generation combined with wastewater treatment and food production. *Biomass and Bioenergy*, 167, 106629.
- [21] Villasenor, J., Capilla, P., Rodrigo, M. A., Cañizares, P., Fernández, F. J. (2013). Operation of a horizontal subsurface flow constructed wetland-microbial fuel cell treating wastewater under different organic loading rates. *Water Research*, 47(17), 6731-6738.
- [22] Yang, Y., Zhao, Y., Tang, C., Liu, R., Chen, T. (2021). Dual role of macrophytes in constructed wetland-microbial fuel cells using pyrrhotite as cathode material: a comparative assessment. *Chemosphere*, 263, 128354.
- [23] Zhou, Y., Xu, D., Xiao, E., Xu, D., Xu, P., Zhang, X., Wu, Z. (2018). Relationship between electrogenic performance and physiological change of four wetland plants in constructed wetland-microbial fuel cells during non-growing seasons. *Journal of Environmental Sciences*, 70, 54-62.
- [24] An, R., Guan, J., Li, G., Li, Z., Sheng, L., Bian, H., Lu, N. (2024). The electrode strategy and its coordination mechanism in constructed wetland-microbial fuel cell (CW-MFC): a review. *Carbon Research*, 3(1), 17.
- [25] Nevin, K., Richter, H., Covalla, S., Johnson, J., Woodard, T., Orloff, A., Jia, H., Lovley, D. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental microbiology*, 10(10), 2505-2514.
- [26] Ebrahimi, A., Sivakumar, M., McLauchlan, C. (2021). A taxonomy of design factors in constructed wetland-microbial fuel cell performance: a review. *Journal of Environmental Management*, 291, 112723.
- [27] Borah, D., More, S., Yadav, R. N. S. (2013). Construction of double chambered microbial fuel cell (MFC) using household materials and *Bacillus megaterium* isolate from tea garden soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(1), 84-86.
- [28] Kim, S. (2021). Guar gum hydrogel microbial fuel cell using *B. megaterium*, *European Journal of Materials Science and Engineering*, 6(2), 89-98.
- [29] Kovalenko, S. A., Kupchinsky, A. B., Etingova, A. A., Gavlik, E. I., Cherkasov, D. V., Ogarkov, B. N. (2022). *Bacillus*

- megaterium* MK64-1 as a bioagent in a microbial fuel cell, The bulletin of Irkutsk State University, 40, 66-72.
- [30] Yoganathan, K., Ganesh, P. (2015). Electrogenicity assessment of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* using microbial fuel cell technology. International Journal of Applied Research, 1(13), 435-438.
- [31] Nimje, V. R., Chen, C. Y., Chen, C. C., Jean, J. S., Reddy, A. S., Fan, C. W., Chen, J. L. (2009). Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. Journal of Power Sources, 190(2), 258-263.
- [32] Treesubsuntorn, C., Chaiworn, W., Surareungchai, W., Thiravetyan, P. (2019). Increasing of electricity production from *Echinododus cordifolius*-microbial fuel cell by inoculating *Bacillus thuringiensis*. Science of the Total Environment, 686, 538-545.
- [33] Khudzari, J. M., Kurian, J., Gariépy, Y., Tartakovsky, B., Raghavan, G. S. V. (2018). Effects of salinity, growing media, and photoperiod on bioelectricity production in plant microbial fuel cells with weeping alkaligrass. Biomass and Bioenergy, 109, 1-9.
- [34] Guadarrama-Pérez, O., Bahena-Rabadan, K. Y., Dehesa-Carrasco, U., Guadarrama Perez, V. H., Estrada-Arriaga, E. B. (2022). Bioelectricity production using shade macrophytes in constructed wetlands-microbial fuel cells. Environmental Technology, 43(10), 1532-1543.
- [35] Greenman, J., Gajda, I., You, J., Mendis, B. A., Obata, O., Pasternak, G., Ieropoulos, I. (2021). Microbial fuel cells and their electrified biofilms. Biofilm, 3, 100057.
- [36] Van Limbergen, T., Bonné, R., Hustings, J., Valcke, R., Thijs, S., Vangronsveld, J., Manca, J. V. (2022). Plant microbial fuel cells from the perspective of photovoltaics: Efficiency, power, and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 169, 112953.
- [37] Guadarrama-Pérez, O., Moeller-Chávez, G. E., Bustos-Terrones, V., Guillén-Garcés, R. A., Hernández-Romano, J., Barragán-Trinidad, M., Guadarrama-Pérez, V. H. (2024). Identification of sugars as root exudates of the macrophyte species *Juncus effusus* and *Philodendron cordatum* in constructed wetland-microbial fuel cells during bioelectricity production. Environmental Technology, 45(4), 716-730.
- [38] Li, K., Qi, J., Zhang, F., Miwormunyuie, N., Amaniampong, P. S., Koomson, D. A., Samwini, A. M. N. (2021). The role of wetland plants on wastewater treatment and electricity generation in constructed wetland coupled with microbial fuel cell. Applied Sciences, 11(16), 7454.
- [39] Estrada-Arriaga, E. B., Guadarrama-Pérez, O., Silva-Martínez, S., Cuevas-Arteaga, C., Guadarrama-Pérez, V. H. (2021). Oxygen reduction reaction (ORR) electrocatalysts in constructed wetland-microbial fuel cells: effect of different carbon-based catalyst biocathode during bioelectricity production. Electrochimica Acta, 370, 137745.
- [40] Castresana, P. A., Martinez, S. M., Freeman, E., Eslava, S., Di Lorenzo, M. (2019). Electricity generation from moss with light-driven microbial fuel cells. Electrochimica Acta, 298, 934-942.