

Dinámica de la comunidad microbiana y generación de electricidad en CCM inoculadas con lodos POME y cultivo electrogénico puro*

Microbial Community Dynamics and Electricity Generation in MFCs Inoculated with POME Sludges and Pure Electrogenic Culture

CITACIÓN: Albarracín-Arias, J. A., Yu C. P., Toshinari M., Valdivieso-Quintero, W. & Sánchez-Torres, V. (2022). Dinámica de la comunidad microbiana y generación de electricidad en CCM inoculadas con lodos POME y cultivo electrogénico puro (Traductor Arenas C). *Palmas*, 44(1), 29-50.

PALABRAS CLAVE: Celda de combustible microbiana, Efluentes de aceite de palma, *Shewanella*, Lodo, Dinámicas de comunidades microbianas.

KEYWORDS: Microbial fuel cell, Palm oil mill effluent, *Shewanella*, Sludge, Microbial community dynamics.

* Reimpreso del *International Journal of Hydrogen Energy*, volumen 46, numero 74, Albarracín-Arias, J. A., Yu C. P., Toshinari M., Valdivieso-Quintero, W. & Sánchez-Torres, V. Microbial Community Dynamics and Electricity Generation in MFCs Inoculated with POME Sludges and Pure Electrogenic Culture, 14 páginas, Copyright (2022), con permiso de Elsevier.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.218>

ALBARRACÍN ARIAS, JORGE A.
Escuela de Ingeniería Química,
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia.

YU CHANG PING
Instituto de Posgrado de Ingeniería
Ambiental, Universidad Nacional de
Taiwán, Taipei, 106, Taiwán.

TOSHINARI MAEDA
Departamento de Ingeniería de
Funciones Biológicas, Kyushu Institute
of Technology, Kitakyushu, Japón.

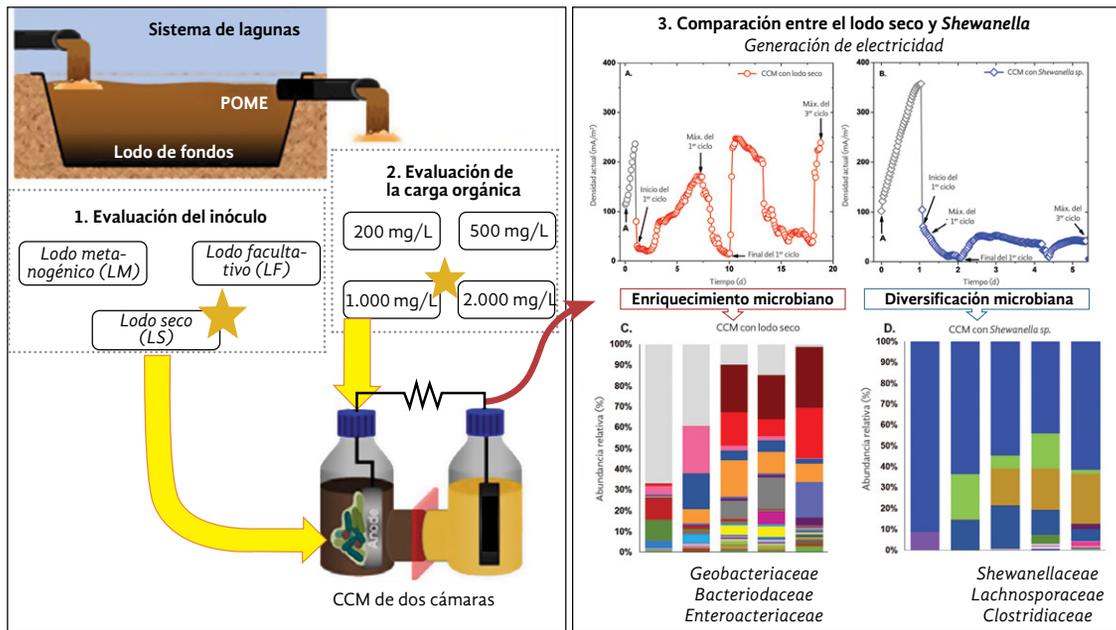
VALDIVIESO QUINTERO, WILFREDO
Universidad de Santander, facultad
de Ciencias Naturales, Bucaramanga,
Colombia.

SÁNCHEZ TORRES, VIVIANA
Escuela de Ingeniería Química,
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia.
Autor para correspondencia
visantor@uis.edu.co

Lo más destacado

- Se evaluó el efecto de 3 tipos de lodo de POME como inóculo en CCM.
- La CCM con lodo seco generó 250 mA/m² y 3,30 W/m³, consumiendo el 71 % de la DQO.
- El género *Geobacteria* de los lodos secos predominó después de 3 ciclos de tratamiento de POME en CCM.
- La biopelícula del ánodo se enriqueció mediante inoculación con LS y se diversificó con *Shewanella*.

Resumen gráfico



Resumen

Los efluentes del proceso de extracción del aceite de palma (POME por sus siglas en inglés) deben ser tratados antes de su disposición debido a su alto contenido de materia orgánica. En este estudio se evaluó el desempeño eléctrico y la eficiencia del tratamiento de aguas residuales mediante el uso de celdas de combustible microbianas (CCM) para el tratamiento de POME no estéril con una demanda química de oxígeno (DQO) de 200 a 10.000 mg/L. Dado que el tipo de inóculo es un factor clave en el desempeño de las CCM, se evaluaron como inóculo 3 tipos de lodo (lodo metanogénico (LM), lodo facultativo (LF) y lodo seco (LS), obtenidos de las lagunas de tratamiento de POME actuales. El lodo seco (LS) desarrolló una potencia máxima de salida de 3,30 W/m³ al oxidar el 71 % de la DQO proporcionada por el POME (1.000 mg/L). Además, la microbiota del POME crudo contribuyó a un enriquecimiento de la comunidad en el inóculo de LS durante la operación, en la que *Geobacter* fue el género predominante, alcanzando una generación de corriente de 247 mA/m² y una densidad de potencia de 2,36 W/m³. Por el contrario, la inoculación con una especie electrogénica pura (*Shewanella* sp.) condujo a un proceso de diversificación, lo que resultó en una generación de corriente más baja de 52 mA/m² y una densidad de potencia de 0,10 W/m³. En consecuencia, la dinámica de la comunidad microbiana reveló que la inoculación de CCM tiende a un equilibrio microbiano en el que se logró la generación de una alta densidad de corriente mediante el enriquecimiento microbiano gradual en lugar de una invasión electrogénica externa.

Abstract

Palm Oil Mill Effluent (POME) requires treatment before disposal due to its high organic matter content. In this study, the electrical performance and wastewater treatment efficiency were evaluated for Microbial Fuel Cells (MFC) treating unsterile POME with chemical oxygen demand (COD) from 200 to 10 000 mg/L. Since the inoculum type is a key factor in MFC performance, three types of sludge (methanogenic sludge (MS), facultative sludge (FS), and dry sludge (DS), obtained from the current POME treatment ponds were evaluated as inoculum. Dry sludge (DS) developed a maximum power output of 3.30 W/m³ by oxidizing 71% out of the COD provided by POME (1.000 mg/L). Also, raw POME microbiota contributed to an enrichment

of the community in DS inoculum along with the operation, in which *Geobacter* was the predominant genus reaching a current generation of 247 mA/m² and a power density of 2.36 W/m³. Conversely, pure electrogenic (*Shewanella* sp.) inoculation led to a diversification process, resulting in a lower current generation of 52 mA/m² and a power density of 0.10 W/m³. Consequently, microbial community dynamics revealed that MFC inoculation tends to a microbial equilibrium wherein generation of high current density was achieved by gradual microbial enrichment rather than external electrogenic invasion.

Introducción

La investigación y el desarrollo de tecnologías ambientales y energía verde son necesarios para enfrentar desafíos globales como la mitigación del cambio climático, la contaminación ambiental y la seguridad energética. Las fuentes de energía verde corresponden a fuentes renovables: por ejemplo, hidrógeno, combustibles de biomasa, energía eólica, geotérmica y celdas fotovoltaicas [1]. Los intereses científicos no solo se centran en la búsqueda de nuevas formas de energía verde, sino también en la mejora de los sistemas de generación de energía para alcanzar los objetivos de eficiencia. Por ejemplo, los microcombustores de hidrógeno se han optimizado en términos de eficiencia mediante análisis numérico, modificación de la arquitectura del reactor o sistemas de inyección del combustible [2,3]. Otro enfoque es la hibridación de las fuentes de energía renovables, como los sistemas fotovoltaicos y eólicos acoplados a unas celdas de combustible alcalinas. Esta configuración conceptual produjo 221,3 g por hora de combustible de hidrógeno y 10,5 kW de electricidad con una eficiencia del 56,9 % [4].

También es posible producir energía verde a partir del tratamiento de residuos orgánicos enlazado a la generación de energía (aprovechamiento energético de residuos, WtE (por sus siglas en inglés)) [5]. Dentro de este concepto se han estudiado tecnologías basadas en la actividad microbiana para tratar residuos como la digestión anaeróbica (DA) y los sistemas bioelectroquímicos para el tratamiento de aguas residuales y biomasa, al mismo tiempo que se aprovecha su energía química. Algunas alternativas que funcionan con microbios convierten la materia orgánica en otro vector de energía, como el biogás o el hidrógeno. Se ha encontrado que la DA de los desechos orgánicos produce tanto biogás que contiene metano con un valor calorífico inferior, que oscila

entre 10,7 y 25,1 MJ/Nm³, como el digestato, que se procesa posteriormente para cumplir con los requisitos de descarga o se utiliza como fertilizante y acondicionador del suelo [6]. El biohidrógeno producido a través de la fermentación se estudia intensamente debido a sus beneficios ambientales y su eficiencia energética. La fermentación oscura y la conversión por fotofermentación han sido los procesos más comunes para producirlo; sin embargo, actualmente la optimización se aborda mediante la aplicación de ambas tecnologías. En este sentido, Ghosh *et al.* [7] revisaron estudios que integraban la fermentación oscura y la fotofermentación, exponiendo la mejora en el rendimiento de hidrógeno mediante el uso de sistemas integrados de un solo paso.

Además, los sistemas bioelectroquímicos como las celdas de combustible microbianas (CCM), celdas de electrólisis microbiana (CEM) o celdas de desalinización microbiana (CDM) son alternativas sostenibles para obtener energía a partir de los desechos. Las CCM son sistemas que transforman directamente la energía química presente en los compuestos orgánicos en energía eléctrica a través del metabolismo biológico de bacterias electrogenéticas [8]. En este sentido, las aguas residuales ricas en materia orgánica son propicias para alimentar las CCM y simultáneamente recolectar energía. Las CCM se han configurado para utilizar y tratar aguas residuales domésticas, residuos de alimentos y aguas residuales del sector lácteo, cervecero y de aceite de palma [9-12].

El aceite de palma es una materia prima clave para producir alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y biodiésel. A nivel mundial, en 2019 se produjeron 73,9 millones de toneladas de aceite de palma. En el proceso de extracción del aceite de palma se produce una cantidad considerable de aguas residuales, principalmente en dos etapas: la esterilización de los racimos de fruta fresca y la clarificación

del aceite crudo. El efluente del proceso de extracción de aceite de palma (POME¹) es una suspensión coloidal ácida, de color pardo, con altos valores de demanda química y biológica de oxígeno (DQO y DBO), que superan los 55.000 mg/L y los 25.000 mg/L, respectivamente. Por cada tonelada de aceite de palma crudo se producen aproximadamente 2,5 toneladas de POME [13]. Por lo tanto, el tratamiento adecuado del POME es indispensable para cumplir con los requisitos ambientales. Hoy en día, el tratamiento más utilizado es el sistema de lagunas, en el que el POME fluye a través de lagunas de enfriamiento, anaeróbicas y facultativas en serie antes de descargar el agua tratada a las corrientes de agua superficial o reciclarla como agua de riego. Infortunadamente, este método de tratamiento tiene una baja eficiencia debido a la sedimentación de sólidos en el fondo de las lagunas y a los largos tiempos de retención hidráulica [14]. En consecuencia, las CCM surgen como una tecnología alternativa para complementar el proceso de tratamiento de POME, pues contribuye a la degradación de la materia orgánica y añade valor a las aguas residuales al producir electricidad [15].

Cheng *et al.* demostraron que es posible utilizar el POME como donante de electrones para generar electricidad y lograron una eliminación de la DQO superior a 96,5 % mediante el uso de un sistema integrado de 2 CCM y 1 filtro biológico aireado inmovilizado [16]. Posteriormente, se evaluaron las CCM de doble cámara con diferentes concentraciones de POME en el compartimiento del ánodo [17]. A pesar de los resultados prometedores obtenidos en términos de tratamiento de aguas residuales (es decir, eliminación del 70 % de la DQO), se reportó una baja densidad de potencia (0,149 W/m³) utilizando lodo anaeróbico (LA) como inóculo.

La mayoría de los estudios sobre CCM para tratar POME han utilizado LA como la fuente de bacterias para degradar el POME [16-19]. Aunque el LA logra una alta eliminación de materia orgánica, dicho consorcio natural contiene una diversidad bacteriana que podría afectar al rendimiento eléctrico debido a los metabolismos fermentativos o metanogénicos que compiten por los donantes de electrones [20,21]. En consecuencia, se han evaluado los cultivos ais-

lados como biocatalizadores en CCM para tratar POME. En el POME hay una variedad de sustancias orgánicas complejas que no son fácilmente digeribles por la mayoría de las bacterias. Por ejemplo, Md Nor *et al.* estudiaron el rendimiento de las CCM de doble cámara que tratan la descarga final de POME esterilizado, comparando las CCM inoculadas con LA de las lagunas de tratamiento de POME con las CCM inoculadas con la *Pseudomonas aeruginosa* ZH1 que fue aislada del POME [22]. Esta comparación reveló que las CCM inoculadas con un cultivo puro de la cepa ZH1 generaban 5 veces más energía (2,91 x 10⁻³ W/m³)² que las CCM inoculadas con LA de POME (0,55 x 10⁻³ W/m³). Sin embargo, el mismo estudio mostró una menor eliminación de DQO por ZH1 (3 %) que por LA (13 %), debido a la limitación en el consumo de POME por ZH1. Baranitharan *et al.* [23] reportaron resultados similares y evaluaron un inóculo controlado (IC) constituido por 4 microorganismos aislados de LA. La generación de potencia fue 2 veces mayor en las CCM inoculadas con un IC (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azospira oryzae*, *Acetobacter peroxydans* y *Solimonas variicoloris*) que la obtenida en las CCM inoculadas con LA. Además, la eficiencia coulombimétrica fue de 74 % para las CCM de IC y de 24 % para las CCM de LA, lo que demostró la capacidad de convertir la energía química en corriente eléctrica. Sin embargo, la eliminación de la DQO fue significativamente menor en las CCM de IC (34 %) que en las CCM de LA (70 %), lo que indica la falta de microorganismos que degradan el POME en el IC [23]. Otros estudios han utilizado CCM con POME estéril inoculado con cultivos puros de *Klebsella variicola*, *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*, obteniendo potencias de 4,5 W/m³, 4,1 W/m³ y 3,9 W/m³, respectivamente. Además, se alcanzó una mejora en la eliminación de DQO que oscila entre 54 % y 74 %, a pesar de ser CCM inoculadas con cultivos puros [24,25]. Sin embargo, no está claro qué tipo de inóculo conduce a una alta degradación de la materia orgánica y a la recuperación de energía. Además, en una aplicación real el uso de POME esterilizado para alimentar a las CCM implica altos costos operativos. En este sentido, se hace necesario evaluar el efecto de diferentes tipos de inóculos sobre las comunidades microbianas para dilucidar el rendimiento eléctrico en las CCM. A través del análisis de electroforesis

1 Abreviaturas POME: Efluente del proceso de extracción de aceite de palma, LM: Lodo metanogénico, LS: Lodo seco, LF: Lodo facultativo, LA: Lodo anaeróbico, SHE: *Shewanella* sp., IC: Inóculo controlado, EC: Eficiencia coulombica.

2 Datos originales en mW/m². La densidad de energía en W/m³ se calculó con los datos que se muestran en el artículo citado.

en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE por su sigla en inglés), Baranitharan *et al.* [19] observaron que la microbiota en el ánodo cambió del día 3 al día 14 de operación a una comunidad menos diversa, lo que reflejó una producción de corriente estable. Sin embargo, no se identificaron las especies responsables de este rendimiento eléctrico para asociar el desarrollo de biopelículas con la producción de corriente eléctrica.

Por lo tanto, en este estudio se proponen tres tipos de lodo de una planta de beneficio de aceite de palma como una fuente adecuada de microorganismos para el tratamiento de POME no estéril en CCM de doble cámara. El hecho de que la microbiota presente en los lodos del sistema de lagunas se utilice para degradar el POME a baja concentración de oxígeno sugiere que sería posible encontrar bacterias capaces de generar corriente eléctrica mientras se consume materia orgánica del POME.

La comunidad bacteriana se analizó en la biopelícula del ánodo en diferentes etapas de la operación para las CCM que trataban el POME no esterilizado inoculado con un consorcio natural (lodo) frente a las CCM inoculadas con una cepa bacteriana electrogénica (*Shewanella* sp.). El análisis de abundancia relativa y los índices de diversidad en diferentes momentos a lo largo de tres ciclos de operación de CCM indica la importancia de tener una comunidad diversa con bacterias hidrolíticas y bacterias electrogénicas adaptadas al sustrato. En consecuencia, se expone el uso potencial de POME y sus lodos como combustible y biocatalizador, respectivamente, para la generación de electricidad sostenible en las CCM.

Materiales y métodos

Efluente del aceite de palma e inóculos

El POME y el lodo se obtuvieron de una planta de beneficio de extracción de aceite de palma en Santander, Colombia. El POME fresco se tomó después del proceso de extracción del aceite, justo antes de ingresar a la laguna de enfriamiento. Se recogieron tres tipos de lodos para utilizarlos como inóculo: i) lodos del fondo de la laguna metanogénica (LM); ii) lodos del fondo de la laguna facultativa (LF), y iii) lodos secos acumulados en una pila tras ser retirados de las lagunas de tratamiento de POME durante su mantenimiento (LS). Las muestras se almacenaron

en recipientes de plástico esterilizados a 4 °C para evitar la degradación hasta su uso.

Efecto de la carga orgánica

Se establecieron CCM con diferentes DQO iniciales en la cámara del ánodo para determinar la concentración de DQO adecuada para tratar POME. En primer lugar, se ensayaron las CCM con una DQO inicial de 1.000 y 10.000 mg/L para los tres tipos de lodo como inóculo. Se llevó a cabo una evaluación adicional basada en el mejor lodo con una carga de DQO inicial de 200, 500, 1.000 a 2.000 mg/L.

Construcción y funcionamiento de las CCM

Las CCM de doble cámara se ensamblaron a partir de botellas de vidrio modificadas con tapa rosca y capacidad de 150 mL. Las cámaras del ánodo y cátodo se separaron mediante una membrana de intercambio catiónico de polietileno estireno-divinilbenceno (Grion 0011 V, Hangzhou Grion Environmental Technology Co., China). La membrana se trató previamente mediante remojo 24 h en H₂SO₄ al 3 % seguido de 2 lavados consecutivos con agua destilada estéril justo antes del ensamblaje. Los filtros de carbono (4 cm x 1,5 cm x 0,9 cm) fueron tratados térmicamente a 450 °C [26] y utilizados como electrodos en ambos compartimentos. Alambre de titanio pulido se conectó a los electrodos y a una resistencia externa de 1.000 Ω. El compartimiento del ánodo se llenó con 125 mL (volumen de trabajo) de POME no esterilizado diluido a una DQO que varió de 200 a 10.000 mg/L en un buffer de fosfato 0,1 M y se usaron 125 mL de ferricianuro de potasio (III) 0,05 M con un buffer de fosfato 0,1 M como aceptor de electrones en la cámara del cátodo. El pH se ajustó a 7,0 en ambas cámaras. La configuración del reactor se muestra en la Figura 1.

La inoculación se llevó a cabo después de que se ensamblaron las CCM. Se agregó 1 mL (0,8 % v/v) de LM (47,8 g VSS/L), LF (15 g VSS/L) o LS (98 g VSS/L) a la cámara del ánodo. Además, se instaló una CCM con POME diluido (CCM-P) (sin adición de lodos) y otra CCM con POME diluido esterilizado como control, a la misma concentración que las CCM inoculadas para comparar el efecto de la adición de lodos. Se inyectó gas nitrógeno durante 3 minutos para eli-

minar el oxígeno del espacio de cabeza de la cámara anódica. Antes de la recolección de corriente eléctrica, las CCM se aclimataron durante 24 horas en condiciones anaeróbicas en circuito abierto (electrodos desconectados) para promover el enriquecimiento de bacterias capaces de degradar el POME.

Análisis de datos

Rendimiento eléctrico

El potencial de las celdas (V) se monitoreó a través de una resistencia de 1 kΩ en intervalos de 10 min. El sistema de adquisición de datos se construyó con base en ARDUINO UNO (Arduino, Italia) y el *software* se codificó utilizando MATLAB 2017B (The MathWorks, Inc., EE. UU.). El convertidor analógico a digital ADS1115 (Texas Instruments, EE. UU.) se conectó a un multiplexor I2C TCA9548A (Texas Instruments, EE. UU.) y un microprocesador ARDUINO UNO (Arduino, Italia). Las curvas de polarización se obtuvieron variando la resistencia externa desde potencial de circuito abierto (OCP), 5.000, 2.530, 1.290, 680, 370, 330, 290, 260, 220, 180, 140, 100, y 60 Ω, con cada resistencia probada durante un máximo de 20 min utilizando el potenciómetro digital 5254 CE (Analog Devices, Inc., EE. UU.). La corriente, *I*, a través de la resistencia externa, *R*, se

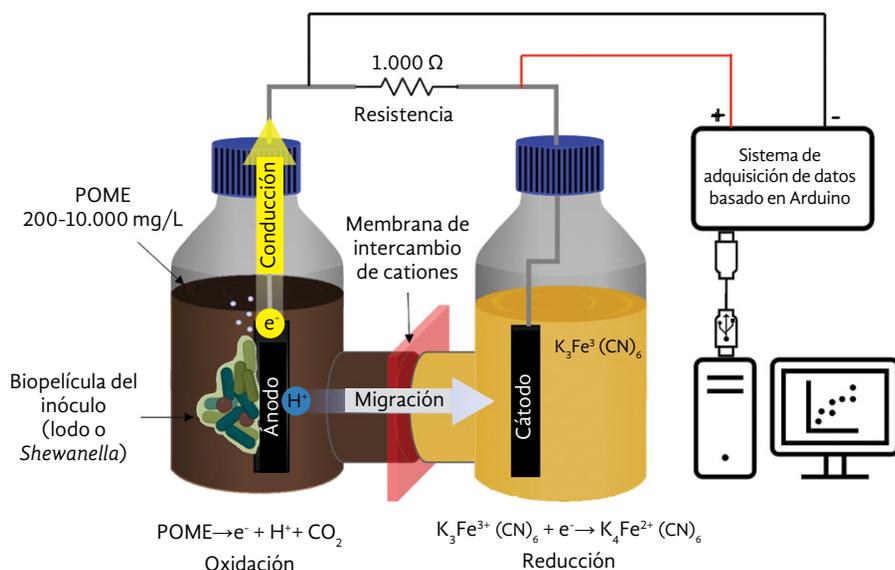
calculó utilizando la ley de Ohm; $V = IR$. La potencia de salida, *P*, se calculó mediante $P = IV$. La densidad de corriente (mA/m²) y la densidad de potencia (mW/m² o W/m³) se calcularon dividiendo la corriente y la potencia obtenidas por el área de superficie proyectada ($2,19 \times 10^{-3} \text{ m}^2$) del ánodo o el volumen de trabajo ($1,25 \times 10^{-4} \text{ m}^3$) de la cámara del ánodo.

Eficiencia en el tratamiento de aguas residuales

Para evaluar el efecto de cada inóculo, se analizaron los parámetros de las aguas residuales antes y después de cada ciclo de alimentación por lotes del desempeño de las CCM. La DQO se midió utilizando el sistema y el *kit* de medición de DQO (Lian-Hua Technology Co., China). El carbono orgánico e inorgánico total se analizaron mediante el analizador TOC-Vcph (Shimadzu, Japón). Los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se midieron gravimétricamente de acuerdo con el método estándar 2540 (APHA, 1998). La salinidad, la conductividad y los sólidos disueltos totales se midieron mediante un equipo multiparámetros (HQ40d, HACH, EE. UU.).

La eficiencia coulombimétrica (EC) es el porcentaje de la carga eléctrica total que se transfiere al ánodo desde el sustrato respecto a la carga máxima

Figura 1. Esquema de operación para celdas de combustible microbianas (CCM) utilizadas en estudios experimentales.



posible que se puede obtener si el microorganismo puede digerir todo el sustrato para producir corriente. Por lo tanto, la EC es el total de culombios calculados debido a la corriente producida a lo largo del tiempo, dividido por los culombios teóricos que se pueden producir a partir del sustrato en términos de DQO (Ecuación 1).

$$EC = \frac{M \int_0^t I dt}{F b V_r \Delta DQO} \times 100 \quad (1)$$

donde M ($g O_2/mol O_2$) es el peso molecular del oxígeno molecular, I (A) es la corriente calculada usando $V = IR$, t (s) es el tiempo de finalización del ciclo, F es la constante Faraday ($96\,500 C/mol e^-$), $b = 4$ ($mol e^-/mol O_2$) indica el número de electrones intercambiados por molécula de oxígeno, V_r (L) es el volumen de trabajo del reactor, y ΔDQO ($g O_2/L$) es el cambio en la demanda química de oxígeno en el tiempo t .

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la biopelícula del ánodo se examinó con un microscopio electrónico de barrido (S-4800, Hitachi Corp., Japón). Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), se cortaron pequeños trozos del ánodo y se retiraron asépticamente. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % durante 4 h, luego se enjuagaron con buffer de fosfato 0,1 M (pH = 7,2-7,4) 2 veces y se deshidrataron con una serie de etanol gradual de 30 a 100 % durante 10 min a 4 °C en cada etapa. Después de la deshidratación, las muestras se secaron en punto crítico y se recubrieron con oro pulverizado al vacío para el examen SEM.

Análisis de la comunidad microbiana

El desempeño de las CCM se comparó utilizando un inóculo mixto natural o un inóculo de cultivo puro de una bacteria electrogénica, en términos de la generación de corriente. Se inocularon 2 conjuntos de CCM con lodo seco (CCM-LS) o *Shewanella* sp. (CCM-SHE). Cada grupo se operó durante 3 ciclos de alimentación por lotes y se registró la corriente. Se propusieron 5 puntos durante la operación para extraer el ADN bacteriano y proceder con la secuenciación: i) el inicio de la aclimatación de 24 h en condiciones anaeróbicas y de circuito abierto (A); ii) puesta

en marcha del primer ciclo; iii) el máximo del primer ciclo; iv) la etapa de agotamiento del sustrato al final del primer ciclo, y v) el máximo del tercer ciclo.

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

En cada fase se extrajo el ADN de las células unidas al material del ánodo en las CCM utilizando el *kit* SPIN para suelos de FastDNA (Qbiogene-MP Biomedicals, Irvine, CA, EE. UU.). La calidad del ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.) y se visualizó utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. Las regiones V3 y V4 de los genes de ARNr 16S se amplificaron usando el *primer* de avance (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAGAGACA-GCCTACGGGNGGCWGCAG) y el *primer* de reversa (5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTA-TAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) [27]. Las etapas de termociclado se establecieron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, 25 ciclos, y una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los amplicones purificados se evaluaron utilizando el *kit* de ensayo Qubit dsDNA HS (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los amplicones se procesaron utilizando el *kit* de preparación de la biblioteca de Nextera XT DNA de acuerdo con Mustapha *et al.* [51]. Los amplicones se secuenciaron usando Illumina MiSeq (cartucho de reactivo V3 MiSeq con 2 extremos emparejados de 300 pb).

Análisis de los datos de secuenciación

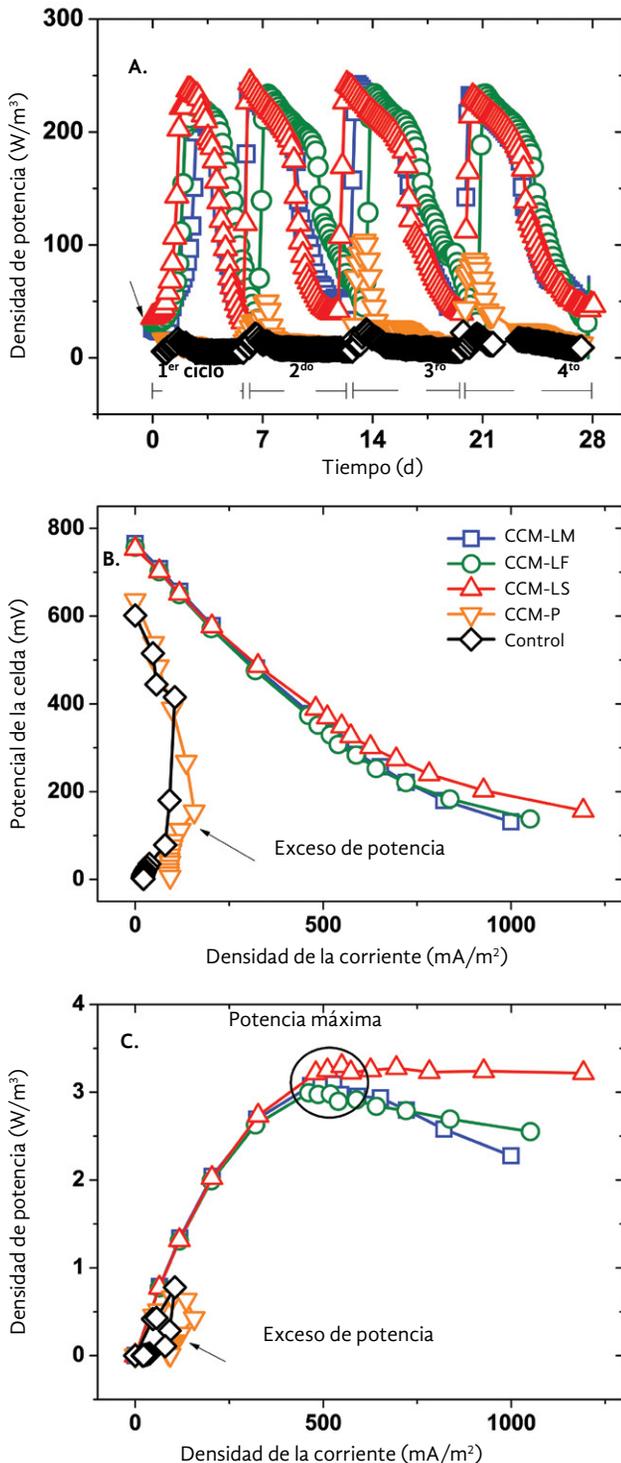
Las lecturas fueron recortadas y filtradas por FASTQX y las lecturas de alta calidad se analizaron utilizando el programa bioinformático *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) versión 1.9.0 [28] y la base de datos GreenGenes (versión 13.5), que permitió agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operativas (OTU).

La diversidad alfa se calculó según el índice de Shannon, que tiene en cuenta tanto la abundancia como la uniformidad de las especies presentes. Los datos crudos de las secuencias se depositaron en la base de datos del NCBI con el número de acceso PRJNA643597.

Resultados y discusión

Comparación de la generación de corriente con tres tipos de lodo de POME como inóculo

Figura 2. Desempeño eléctrico de las CCM inoculadas con 0,8 % v/v de LM, LF o LS, y CCM sin inóculo de lodo (P). El control es POME estéril a 1.000 mg/L. (A) Curvas de densidad de corriente a lo largo de cuatro ciclos de generación, (B) datos de polarización y (C) curvas de potencia.



Las curvas de corriente observadas en la Figura 2-A muestran que las CCM inoculadas con los 3 tipos de lodo tuvieron un comportamiento similar. Las CCM cargadas con 1.000 mg/L revelaron picos de densidad de corriente máxima de alrededor de 233 ± 9 mA/m² para las CCM inoculadas con LM, LF y LS que fueron 2,9 veces más altos que las CCM no inoculadas con lodo (CCM-P) y 10 veces más altos que el control. Una carga orgánica inicial de 1.000 mg/L conduce a un ciclo de tratamiento de 7 días aproximadamente. Los ciclos de alimentación discontinua tuvieron una fase de retraso en el primer ciclo y un rápido aumento de la corriente hasta obtener un máximo al final del día 2. Después de este punto, la corriente disminuyó bruscamente, lo que indica el agotamiento del sustrato en la cámara del ánodo; en consecuencia, tanto las soluciones del ánodo como del cátodo se reemplazaron por soluciones (medios) nuevas para permitir un nuevo ciclo de generación. Dado que no se aplicó ninguna inoculación adicional después del reemplazo del medio, estos resultados indican que se desarrolló una biopelícula en la superficie del ánodo y fue capaz de reproducir la densidad de corriente como en el primer ciclo.

Posteriormente, los datos de polarización se obtuvieron variando la resistencia externa (10.000-60 Ω). Las curvas de polarización y potencia (Figura 2-B) fueron similares para las CCM inoculadas con los 3 tipos de lodo, con una desviación estándar promedio de 22 mV. Los datos de polarización revelaron una clara ventaja de la inoculación de lodo. Las CCM de LM, LS y LS generaron un potencial de circuito abierto de alrededor de 760 mV que decaía linealmente a 290 mV a medida que la densidad de corriente aumentaba hasta 600 mA/m², mostrando la misma tendencia. Finalmente, se lograron valores desde 999 a 1.192 mA/m² por cada tipo de lodo debido a una ligera divergencia bajo alta demanda de corriente (valores de resistencia bajos). Por el contrario, la CCM-P tuvo una caída de voltaje aguda a una densidad de corriente inferior a 157 mA/m². La curva de polarización indica pérdidas (sobrepotenciales) en la CCM [29]; por lo tanto, solo las pérdidas óhmicas se identificaron como las más importantes en las CCM inoculadas con lodo debido a la tendencia lineal de las curvas en la Figura. 2-B. La configuración utilizada en este

estudio probablemente explica las pérdidas óhmicas. Por ejemplo, el alambre de titanio como circuito externo para el flujo de electrones puede contribuir a este sobrepotencial. Se puede mejorar mediante el uso de materiales con mejor conductividad eléctrica, como cobre, evitando la inmersión del metal en la solución. Otra razón para la pérdida óhmica es que los protones deben pasar a través de la membrana y esta tiene una resistencia inherente a dicho transporte. A pesar de que el pretratamiento de la membrana se realiza con el objetivo de reducir esta resistencia, se trata de una barrera física entre las cámaras que contribuirá a este sobrepotencial. El diseño de la CCM puede resolver esta limitación eliminando la membrana; sin embargo, deben implementarse técnicas de consumo rápido de oxígeno [30]. De acuerdo con la forma expuesta en las curvas, ni las pérdidas de activación ni la limitación de transferencia de masa fueron predominantes.

Además, la densidad de potencia máxima fue similar para las CCM inoculadas con cada tipo de lodo ($3,1 \pm 0,6 \text{ W/m}^3$) (Figura 2-C). El LS se destaca entre los tres lodos porque los valores de densidad de potencia se mantuvieron cerca de su máximo en un rango más grande de densidades de corriente (549 mA/m^2 a 1.192 mA/m^2). La desviación estándar entre duplicados fue similar para las diferentes configuraciones de CCM, con un valor de $0,36 \text{ W/m}^3$. La curva CCM-LS presentada en la Figura 2-C es opuesta al fenómeno conocido como *overshoot*, común en las curvas de potencia de los estudios de CCM [31]. Como Ieropoulos *et al.* [32] explicaron, los microorganismos pueden ajustar su metabolismo a las condiciones dinámicas. Según esto, la diversidad microbiana del LS podría haber consumido la variedad de compuestos presentes en el POME y superar con éxito la alta demanda de electrones al circuito externo a bajas resistencias ($R < 290 \Omega$).

La inoculación de LS representa una ventaja en el desempeño eléctrico debido al objetivo de una celda de combustible, que es maximizar la potencia en un rango de interés de corriente a una caída mínima de voltaje [8]. Por el contrario, el LM y el LF tuvieron una disminución después del punto de potencia máxima debido a una mayor demanda de corriente.

Eficiencia en el tratamiento de aguas residuales

Durante la evaluación de la eliminación de materia orgánica, se determinaron la DQO, los SST, los SSV y

el COT antes y después de los ciclos de la CCM. Además, se calculó la EC de la CCM según la corriente generada y la eliminación de DQO.

Los resultados resumidos en la Tabla 1 indican una eliminación de DQO similar para los tres tipos de lodo: 66,3 % para LM, 70,1 % para LF y 71,2 % para LS. Estas remociones fueron el promedio después de cada ciclo de 7 días de operación y confirman que la generación de electricidad estaba asociada con el consumo de materia orgánica. La eliminación de DQO para CCM-P fue de $59,6 \pm 6,2 \%$, significativamente menor (valor-p = 0,034) que la de las CCM inoculadas con lodo (*Media* = $69,8 \pm 4,4 \%$).

Por otro lado, los sólidos y el carbono orgánico están presentes en el POME, por lo que su eliminación es un indicador de su utilización para producir electricidad por parte de las bacterias en la CCM. La eliminación de sólidos y carbono orgánico estuvo dentro de 31,0-40,5 % para SST, 36,4-63,1 % para SSV y 48,8-55,6 % para COT. La eliminación de sólidos suspendidos también fue mayor cuando las CCM fueron inoculadas en comparación con aquellas no inoculadas (CCM-P y control). Además, se demuestra que la inoculación de CCM con lodo proporcionó el biocatalizador para la conversión de la energía química en electricidad, expresada en eficiencia culombimétrica (EC). Mientras que la EC estaba entre el 16,3 y el 16,9 % para las CCM inoculadas con lodos, la CCM-P alcanzó el 6 %.

Las tasas de remoción sugieren la importancia de la inoculación en las CCM para tratar POME. En las plantas de beneficio de palma de aceite, se requieren diferentes etapas de tratamiento de POME antes de su descarga final. Por lo tanto, las CCM proporcionan una degradación integral de POME en poco tiempo. El funcionamiento de las CCM a 1.000 mg/L de POME podría ser adecuado para degradar la materia orgánica restante del POME tratado después del sistema de lagunas que tiene una DQO de aproximadamente 1.500 mg/L , para degradar los orgánicos restantes [33].

Desempeño de la CCM a diferentes niveles de DQO

Se evaluó una carga inicial de 10.000 mg/L de DQO en las CCM. Bajo esta condición, los picos de corriente no se produjeron a lo largo de 28 días de operación. El rendimiento limitado de las CCM cargadas a 10.000 mg/L puede atribuirse a la falta de recolección de electrones por parte del ánodo. Los aceptores de electrones solubles como el nitrato y el sulfato pre-

senten en el POME sufren una reducción a través del metabolismo metanogénico que conduce al consumo de electrones, reduciendo así la captación de corriente [34]. Además, puede haber ocurrido fermentación de gases (hidrógeno o metano) porque se observó la presurización de la cámara del ánodo después de 2 días de operación. Los estudios han demostrado que la DQO afecta el rendimiento de las CCM [35]. Por ejemplo, los gradientes de concentración de sustrato entre la biopelícula y el volumen de la solución están presentes en una cámara de ánodo no agitada, lo que limita el desarrollo de biopelícula en la superficie del ánodo. Por lo tanto, la DQO inicial debe optimizarse por debajo de 10.000 mg/L para el tratamiento de POME en esta configuración de CCM.

Aunque los 3 lodos evaluados como inóculo presentaron un rendimiento similar en términos de tratamiento de aguas residuales, el LS tuvo una potencia de salida estable a altas densidades de corriente en la prueba de polarización. Por lo tanto, el efecto de la carga orgánica inicial se evaluó utilizando LS como inóculo para las CCM con diluciones de POME de

DQO = 200, 500, 1.000 y 2000 mg/L en la cámara del ánodo. Se analizaron la generación de corriente, las curvas de polarización y la eficiencia del tratamiento de aguas residuales.

Los picos de densidad de corriente máxima se vieron afectados significativamente por la carga inicial de DQO (ANOVA, valor $p=0,003$) y se obtuvieron valores entre 188 y 263 mA/m² para las concentraciones evaluadas (Tabla 2). Los ciclos de corriente duraron 2,9 días para 200, 4,2 días para 500, 5,6 días para 1.000 y 8,2 días para 2.000 mg/L. Como se esperaba, la CCM cargada a baja DQO tiene una degradación más rápida de POME y sus ciclos de generación de corriente fueron angostos.

Esto es explicado por Zhang *et al.* [36], que asociaron la rápida disminución de la generación de corriente con la baja concentración de DQO en la cámara del ánodo (<100 mg/L) durante los ciclos de alimentación discontinua. Esta fuerte caída de la corriente estuvo presente en todos los ciclos para todos los niveles de DQO evaluados en este estudio.

Tabla 1. Eliminación de aguas residuales y eficiencia coulombica para cada CCM inoculado con diferentes tipos de lodo, no inoculado (POME) y control estéril.

Tipo de inóculo ^a	Eficiencia de remoción				EC [%]
	DQO [%rem. ^b]	SST [%rem.]	SSV [%rem.]	COT [%rem.]	
Lodo metanogénico	66 ± 2	31 ± 10	36 ± 11	49 ± 10	16 ± 2
Lodo facultativo	70 ± 6	38,6 ± 0,3	52 ± 5	53 ± 9	16 ± 2
Lodo seco	71 ± 0	41 ± 5	63 ± 15	56 ± 2	17 ± 1
POME	60 ± 6	24 ± 17	21 ± 3	56 ± 0	6 ± 1
Control	-21 ± 9	25 ± 14	26 ± 9	29 ± 1	-5 ± 1

a. CCM inoculada con 1 mL (0,8% v/v) de lodos como inóculo a 125 ml de POME diluido a 1.000 mg/L. b. %rem.: porcentaje de remoción respecto a la concentración inicial.

Tabla 2. Resumen de las eficiencias del tratamiento de POME para CCM inoculadas con lodo seco con diferente DQO anódica inicial.

DQO inicial [mg/L]	Densidad de corriente máx. [mA/m ²]	Corriente por ciclo [mA]	Duración del ciclo [días]	DQO [%rem. ^a]	SST [%rem.]	SSV [%v]	COT [%rem.]	EC [%]
200	188 ± 71	0,188 ± 0,07	2,9 ± 0,9	35 ± 12	41 ± 4	44 ± 18	44 ± 5	62 ± 6
500	260 ± 10	0,268 ± 0,043	4,2 ± 0,6	49 ± 2	9 ± 7	26 ± 0	34 ± 0	44 ± 0
1000	263 ± 9	0,355 ± 0,041	5,6 ± 0,9	64 ± 3	35 ± 11	19 ± 1	47 ± 9	23 ± 3
2000	243 ± 9	0,312 ± 0,020	8 ± 1	61 ± 6	36 ± 5	56 ± 1	64 ± 6	7 ± 2

a % rem: porcentaje de eliminación con respecto a la concentración inicial.

Además, se recopilieron datos de polarización para determinar el potencial eléctrico máximo alcanzable para cada concentración de materia orgánica. Entre las diferentes cargas de DQO, la densidad de potencia máxima fue de $8 \pm 3 \text{ W/m}^3$ para LS-1.000 con una resistencia externa de 110Ω (Figura 3). Por lo tanto, 1.000 mg/L es la concentración más adecuada entre los niveles iniciales de DQO evaluados para la generación de energía.

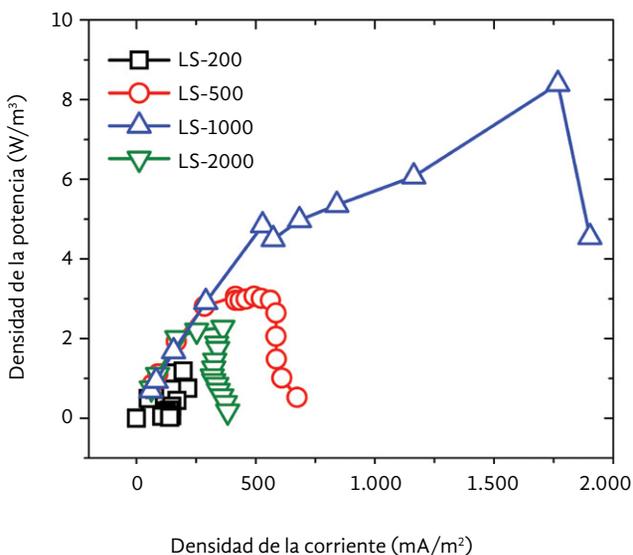
La remoción de DQO fue directamente proporcional a la DQO inicial para cargas de 200, 500 y 1.000 mg/L, logrando 35 %, 48,6 % y 63,8 %, respectivamente (Tabla 2). A pesar de que el POME diluido a 2.000 mg/L puede tener más bacterias nativas, la eliminación de la DQO se vio afectada negativamente por la sedimentación de sólidos, lo que excluyó la disponibilidad de sustrato para la biopelícula adherida al ánodo. Los sólidos suspendidos totales se midieron porque los microorganismos deberían hidrolizar los SST y después metabolizarlos como fuentes de carbono. Sin embargo, la eliminación de SST no mostró una tendencia clara y la CCM con DQO 500 mg/L tuvo una remoción pobre (valor $p = 0,007$) en comparación con el promedio de CCM cargado con otros niveles de DQO ($37 \pm 8 \%$). Con respecto a la EC, la DQO inicial mostró una relación inversa ($EC = -0,1832 \times DQO \text{ inicial} + 0,7972$, $R = 0,997$). Significa que LS-200 obtuvo la mejor EC, recolectando el 62 % de los electrones

para generar corriente, mientras que el 7 % se recolectó cuando la DQO inicial aumentó a 2.000 mg/L. Esto se explica por la limitada disponibilidad del sustrato en la cámara del ánodo, ya que la concentración del inóculo fue la misma para todas las configuraciones. La eliminación de DQO fue mayor a medida que aumentaba la DQO inicial; sin embargo, la EC dio como resultado valores más bajos que pueden deberse a las pérdidas de electrones debido a los aceptores solubles en el POME concentrado, disminuyendo la recolección para generar corriente [17]. Del mismo modo, es probable que la materia orgánica sea consumida por otros microorganismos como los metanógenos fermentativos, en lugar de los electrogénicos.

Como las CCM se configuran para extraer la corriente eléctrica utilizando la mayor cantidad de materia orgánica posible, la carga de 1.000 mg/L dio como resultado una eliminación considerable de DQO, la mejor salida de potencia (Figura 3) y la corriente acumulada por ciclo (valor- $p = 0,001$).

Como se muestra en la Fig. 3, se lograron densidades de potencia más bajas en CCM a cargas de DQO bajas (200 y 500 mg/L). Por el contrario, las CCM con DQO de 1.000 mg/L tuvieron el mejor desempeño ($8,34 \text{ W/m}^3$) entre el rango evaluado (desviación estándar = $0,82 \text{ W/m}^3$). Por último, para las CCM con 2.000 mg/L, la potencia disminuyó, lo que indica que hay un valor óptimo entre 500 y 2.000 mg/L. Por lo tanto, 1.000 mg/L es una carga adecuada para operar CCM para tratar el POME.

Figura 3. Curvas de potencia para CCM inoculadas con lodo seco y cargadas con POME a 200, 500, 1.000 y 2.000 mg/L de DQO.



Biopelícula en la superficie del ánodo

El fieltro de carbono se analizó antes y después de la operación de la CCM inoculada con LS a 1.000 mg/L. En la Figura 4 se observa la diferencia entre el fieltro de carbono virgen (A) y el fieltro de carbono con biopelícula (B). Comúnmente, la biopelícula está constituida por células bacterianas y los exopolisacáridos secretados. Esta matriz sirve como un entorno de comunicación entre microorganismos que permite la transmisión de señales y garantiza el desarrollo metabólico [37].

Se ha informado que especies bacterianas como *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oinedensis* forman biopelículas electroactivas en el ánodo de CCM, con transporte directo de electrones al electrodo por proteínas de membrana como el citocromo de tipo C o por conexiones a través de filamentos conductores, llamados nanocables [38,39]. La formación de

biopelículas favorece la transferencia de electrones por bacterias electroquímicamente activas (BEA); sin embargo, si la matriz se vuelve gruesa, se presenta un efecto de resistencia eléctrica.

En la Figura 4-B se pueden observar diferentes morfologías celulares (oval, bastón y forma de C) dentro de la biopelícula, lo que indica la coexistencia y posible cooperación de diferentes especies en la oxidación de POME y la generación de electricidad en la CCM. Además, se observaron grumos bacterianos en la biopelícula, lo que reportes indican que contienen bacterias fermentativas que potencialmente hidrolizan sustratos complejos en simples que sirven a su vez como sustrato para bacterias electrogénicas [40]. En consecuencia, una biopelícula establecida sobre la superficie del ánodo dio como resultado la uniformidad de la generación de picos de corriente previamente graficada en la Figura 2-A. No se necesitó una re-inoculación después de reponer el medio, por lo tanto, las bacterias unidas a la superficie del ánodo durante el primer ciclo podrían mantener la biopelícula después de que el POME se recargó como medio.

Análisis de la comunidad microbiana

La microbiota del ánodo realiza reacciones de oxidación en la CCM y su composición está fuertemente relacionada con el rendimiento de la CCM a lo largo del tiempo. Los estudios que tratan el POME en las CCM se han centrado en mejorar la oxidación de la materia orgánica y la producción de energía. De esta manera, Baranitharan *et al.* sugirieron que la densidad de corriente se estabilizó en las CCM porque la comunidad microbiana se volvió más constante

con el tiempo en términos de diversidad [19]. Por lo tanto, este estudio analizó la comunidad microbiana anódica en algunas de las etapas cruciales de una operación de CCM utilizando secuenciación genómica de alto rendimiento de ARNr 16s. Se evaluaron 2 tipos de inoculación, LS (inóculo mixto) e inoculación con un cultivo puro de una bacteria electrogénica (*Shewanella* sp.).

El análisis de coordenadas principales (Figura 5) indica 2 distribuciones principales, una por cada tipo de inoculación. La comunidad microbiana anódica inicial (A) en la CCM-LS tuvo un gran cambio por el proceso de aclimatación de circuito abierto de 24 h (de A hasta el arranque) y posteriormente por la generación de corriente bajo circuito cerrado desde el arranque hasta el máximo del 1.º ciclo. La distancia entre las muestras en CCM-LS indica que, durante el proceso de aclimatación en condiciones anaeróbicas, la microbiota evolucionó hacia una comunidad más cercana al subgrupo de la comunidad asociada con la generación de corriente representada por el máximo del 1.º ciclo, el final del 1.º ciclo y el máximo del 3.º ciclo. Las distancias relativas de la comunidad sugieren una fuerte selección que finalmente favoreció el rendimiento de la CCM. Por lo tanto, la comunidad resultante en el pico de los ciclos es aquella capaz de degradar el POME y/o producir electricidad a partir de los compuestos disponibles.

Por otro lado, el grupo azul en la Figura 5 reveló que las comunidades de CCM inoculadas con *Shewanella* estaban más cerca entre sí en las diferentes etapas de la operación, lo que indica que la comunidad simplemente evolucionó ligeramente hasta el final de la operación. Esto se atribuye a la concentración

Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de fieltro de carbono virgen tratado (A) y biopelícula (B) después de 5 ciclos de operación de CCM en tratamiento de POME a 1.000 mg/L. Barra: 5 micrómetros (µm). Potencia: 5,0 kV.

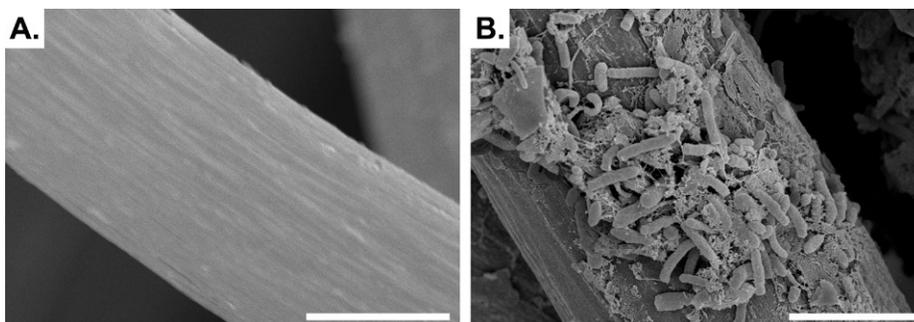
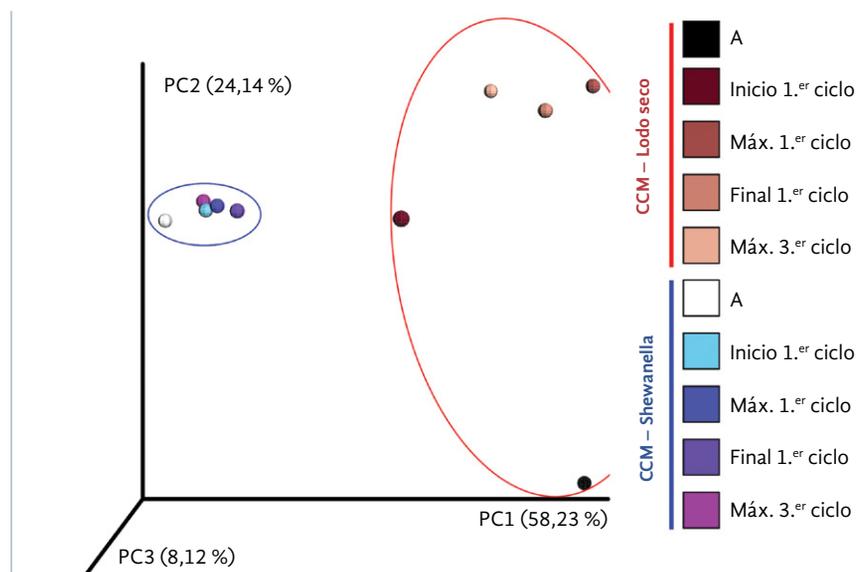


Figura 5. Beta-diversidad en comunidades bacterianas de las dos configuraciones de CCM, estimadas mediante análisis de coordenadas principales (PCoA)



de *Shewanella* sp. al inicio de la operación, que proporcionó la mayor contribución a las secuencias en la muestra. Aunque hubo variaciones en la comunidad microbiana de la biopelícula, *Shewanella* siguió dominando durante toda la operación.

Dinámica de la comunidad microbiana a través de la operación de CCM

Los índices de diversidad asociados con las muestras para cada configuración de CCM indican un comportamiento contrastante entre CCM-LS y CCM-SHE, como se muestra en la Tabla 3. Para analizar los datos de la secuencia, se obtuvieron 396.456 lecturas de alta calidad tras el filtrado de calidad de la secuencia. Los índices de diversidad α se calcularon con 26.700 lecturas de remuestreo por muestra con el objetivo de evitar el sesgo debido a los diferentes tamaños de las muestras. Se utilizaron los índices de Shannon para medir la diversidad de la comunidad microbiana en cada etapa de la generación de corriente en las CCM.

Inicialmente, la Tabla 3 muestra que la comunidad microbiana inicial en el ánodo (A) en CCM-LS fue la más diversa (índice de Shannon $H' = 3,97$), la diversidad más baja se observó en el máx. del 3.º ciclo, con un índice de Shannon de 2,15. Esto probablemente se debió al enriquecimiento selectivo de bacterias que respiran en el ánodo, primero durante la aclimatación del inóculo y luego durante todo el funcionamiento de los ciclos de la CCM. En con-

secuencia, la uniformidad (E^H) de 0,70 se presenta al inicio de CCM-LS (A) porque las especies pueden cohabitar en lodo seco y POME crudo en una abundancia relativamente pequeña. Sin embargo, la operación de CCM condujo a un enriquecimiento de bacterias anodofílicas debido al potencial del electrodo, lo que resultó en una menor uniformidad con valores de 0,54 y 0,47 en etapas posteriores (máx. del 1.º y máx. del 3.º ciclo, respectivamente).

Las Figuras 6-C y D indican la abundancia relativa bacteriana a nivel de familia asociada con las 5 etapas durante los ciclos de operación. La CCM-LS puede indicar que el comienzo de la etapa de aclimatación (LS-A) albergaba diversas familias con baja abundancia. La comunidad microbiana cambió después de la aclimatación, al inicio del primer ciclo de generación de corriente, *Pseudomonadaceae* se enriqueció de 4,2 % a 22,5 % y *Clostridiaceae* de 0,6 % a 17,1 % dominando la biopelícula del ánodo. A partir de entonces, la corriente comenzó a fluir y la conocida familia electrogénica *Geobacteraceae* apareció como la más abundante (22,8 %) en el máx. 1.º ciclo. Otras familias, tales como *Porphyromonadaceae* (17,5 %) y *Bacteroidaceae* (15,7 %) permanecieron abundantes hasta el final de la operación de la CCM. En el máx. del 3.º ciclo, *Geobacteraceae* fue la familia más abundante (29,3 %), seguida de *Bacteroidaceae* (24,1 %) y *Enterobacteriaceae* (16,8 %).

Paralelamente, la CCM-SHE se regía por un proceso de diversificación (Tabla 3). El índice de Shannon al principio (A) fue de 0,31 debido al predomi-

nio de *Shewanella* sp. como cultivo puro en el inóculo. Posteriormente, la comunidad cambió debido al crecimiento de la microbiota del POME a una comunidad más diversa con un índice de Shannon de 1,44 en el máx. del 3.º ciclo. Se puede observar que al final del 1.º ciclo, el estimador de riqueza de Chao1 (115) aumentó 2 veces desde el máx. 1.º ciclo (Chao1 = 62). Esto se atribuye a la condición de limitación de sustrato que contribuyó a la recuperación de bacterias activas no electrogénicas que utilizaron compuestos del POME y/o metabolitos producidos por los electrogénicos. Sin embargo, en el máx. del 3.º ciclo, la riqueza de la comunidad bajó a 68, lo que indicó que los aumentos de corriente favorecieron solo a unas pocas familias bacterianas.

Shewanellaceae fue la familia más abundante en cada etapa de la operación de CCM-SHE debido a su modo de inoculación. De esta manera, la uniformidad de Shannon evolucionó de 0,09 al principio a 0,42 al final de la operación de CCM-SHE. Significa que las familias tienden a alcanzar una convivencia relativa dentro de la comunidad. Finalmente, *Shewanellaceae* (51,2 %), *Lachnospiraceae* (19,8 %) y *Enterobacteriaceae* (16,4 %) fueron las familias más abundantes en el máx. del 3.º ciclo.

Estos resultados revelaron datos interesantes sobre el tipo de inoculación (inóculo mixto natural o cultivo puro). El POME no estéril fue una fuente

significativa de microbiota como se evidencia en la diversificación de CCM-SHE. A pesar de que la CCM-SHE se volvió más diversa, los géneros como *Geobacter* o *Bacteroides* que eran dominantes en la CCM-LS no estuvieron presentes; lo que sugiere que estos géneros son necesarios para un mejor rendimiento eléctrico utilizando POME como sustrato.

En resumen, el funcionamiento de las CCM dio como resultado un predominio de diversas BEA en comunidades microbianas. Esto se presenta ya sea mediante el enriquecimiento en el caso de CCM-LS, que va de 5 % a 48 % de BEA (Tabla 3) o proporcionando condiciones para que las BEA de otros géneros pueblen y cohabiten con un inóculo puro de BEA, como en el caso de CCM-SHE.

Desarrollo de la comunidad microbiana junto con la generación de corriente

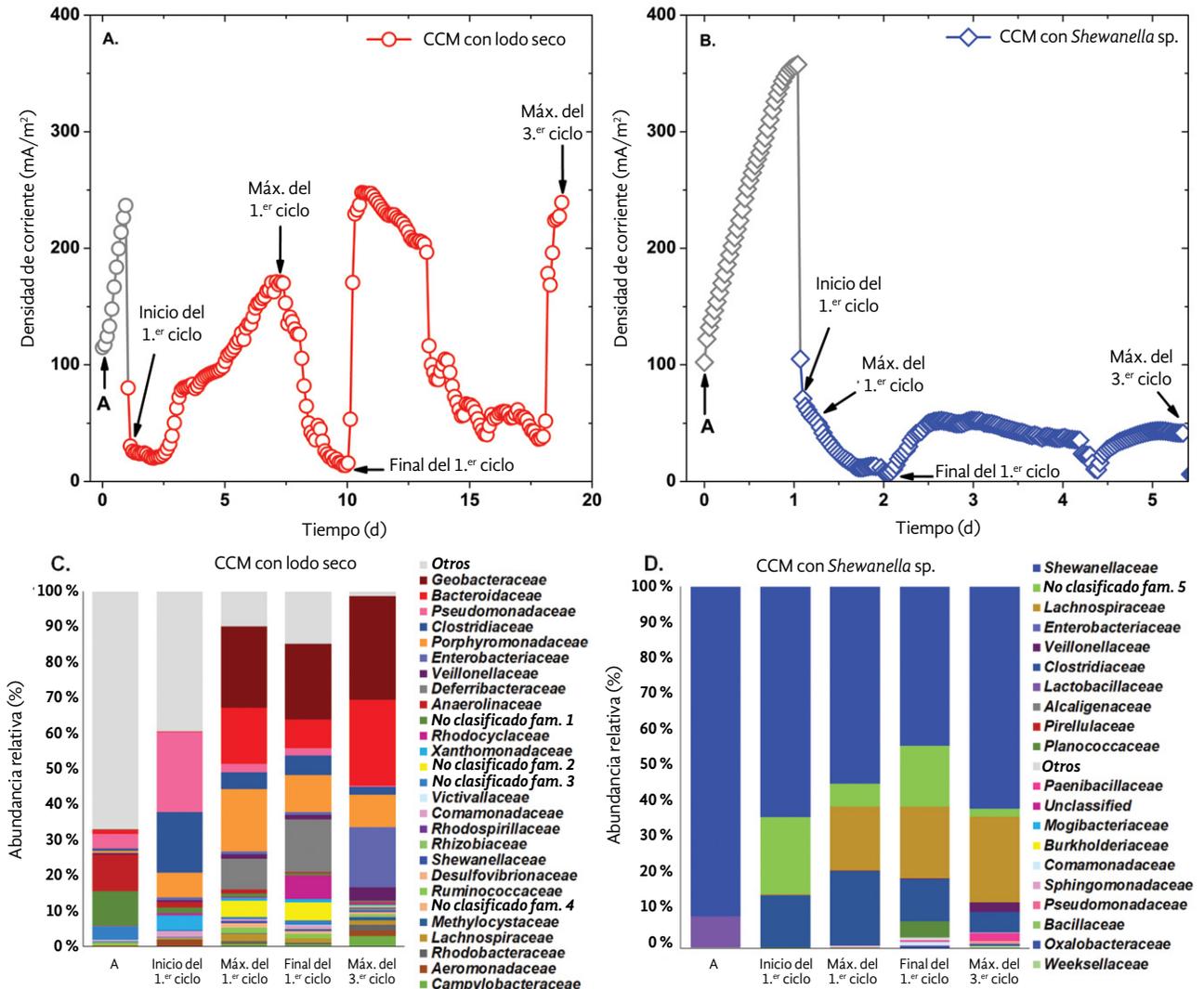
Un análisis más detallado de la funcionalidad permitió comprender la dinámica de la comunidad microbiana en la biopelícula anódica y las fases de la generación de corriente en un ciclo de CCM. Por ejemplo, la densidad de corriente en CCM-LS es mayor que en CCM-SHE, posiblemente debido a la mayor diversidad de la biopelícula. La CCM-LS en la Figura 6-A reportó una densidad de corriente máxima de 247

Tabla 3. Número de lecturas, OTU e índices de diversidad alfa para las CCM que tratan el POME inoculado con inóculo natural mixto (lodo seco) frente a bacterias electrogénicas únicas (*Shewanella* sp.).

Inóculo	Fase	No. de lecturas	Chao1	OTU	Índice Shannon (H')	Uniformidad (E ^{H'})	Géneros electrogénicos
Lodo Seco	A	54 126	1010	917	3.97	0.70	5 %
	Inicio 1.º ciclo	39 498	422	362	2.29	0.46	35 %
	Máx. 1.º ciclo	35 463	435	375	2.71	0.54	29 %
	Final 1.º ciclo	35 560	399	355	2.86	0.58	29 %
	Máx. 3.º ciclo	36 509	263	223	2.15	0.47	48 %
<i>Shewanella</i> sp.	A	32 762	67	36	0.31	0.09	91 % (she =91 %)ª
	Inicio 1.º ciclo	51 691	39	25	0.94	0.28	78 % (she=63 %)
	Máx. 1.º ciclo	26 769	62	49	1.20	0.37	75 % (she=54 %)
	Final 1.º ciclo	37 820	115	101	1.54	0.38	56 % (she=44 %)
	Máx. 3.º ciclo	46 258	68	45	1.44	0.42	72 % (she = 51 %)

a "She=": Porcentaje de *Shewanella* entre los géneros electrogénicos de la muestra

Figura 6. Curvas de corriente y puntos de muestreo para (A) CCM con lodo seco y (B) CCM con *Shewanella* sp. durante 3 ciclos de funcionamiento para el tratamiento de POME no estéril a DQO de 1.000 mg/l. Abundancia relativa de microbiota a nivel de familia para (C) CCM lodo seco y (D) CCM *Shewanella* sp. en cada etapa de la generación de corriente.



mA/m^2 , 4,75 veces mayor que la corriente producida por *Shewanella* sp. (52 mA/m^2).

Las curvas de corriente mostraron una gran diferencia entre los dos métodos de inoculación. Los ciclos de CCM-LS fueron de 7 a 10 días; mientras tanto, los ciclos de CCM-SHE duraron menos de 3 días una vez que se reemplazó el POME fresco en la cámara del ánodo. Por lo tanto, la inoculación con el inóculo mixto natural (LS) fue mejor en términos

de generación de corriente que la inoculación con un cultivo puro de BEA (*Shewanella*).

La microbiota CCM-LS inicial en el ánodo antes de la fase de aclimatación (A) tuvo una baja abundancia de géneros individuales, con predominancia de *Metanosaeta* acetoclástica (8,3%) y *Pseudomonas* (4,0 %). Las especies de *Pseudomonas* se encuentran comúnmente en los lodos de aguas residuales [23], en los que la materia orgánica se degrada hasta que

Methanosaeta produce metano [41]. Después de la aclimatación, una *Exiguobacteriaceae* no clasificada (30,0 %) y *Pseudomonas* (22,4 %) poblaron la biopelícula anódica, lo que indica que esas bacterias fueron beneficiadas por la exposición al POME en condiciones anaeróbicas en circuito abierto. Por lo tanto, esta fue la población inicial para el primer ciclo de generación. A partir de entonces, la comunidad microbiana tuvo un cambio crucial para promover la actividad electrogénica. El máx. del 1.º ciclo mostró un predominio de *Geobacter* (22,9 %) seguido de una *Porphyromonadaceae* no clasificada 1 (16,1 %) y *Bacteroides* (15,2 %). Una biopelícula cooperativa se unió al ánodo durante el primer ciclo de generación. *Porphyromonadaceae* y *Bacteroides* son bacterias fermentativas que sirvieron como facilitadoras al degradar compuestos complejos y producir acetato disponible para los electrogenos. Esto indica que el tratamiento óptimo de las aguas residuales en las

CCM depende del desarrollo de múltiples especies, no solo electrogénicas en la biopelícula como se sugirió anteriormente [42]. Además, la disminución electrogénica se detecta al final del primer ciclo de CCM-LS atribuido a un periodo de limitación en el que se consume el sustrato disponible para los electrogenos, lo que conduce a la proliferación de bacterias con otros tipos de metabolismos. Sin embargo, después de 3 ciclos de operación *Geobacter* y *Bacteroides* permanecieron dominantes (29,3 % y 24,1 %, respectivamente), lo que indica que la generación de corriente de 247 mA/m² estaba directamente relacionada con su presencia. Las familias dominantes en el máx. del 3.º ciclo en CCM-LS explican cómo el POME se puede convertir en electricidad. Los géneros *Porphyromonadaceae* generalmente participan en la degradación anaeróbica de complejos como carbohidratos, proteínas y péptidos para producir ácidos grasos volátiles [43]. Mientras tanto, *Bacteroides* es

Tabla 4. Abundancia relativa (porcentaje) de los géneros más relevantes en las etapas de operación de las CCM

CCM-LS					
Género	A	Inicio 1.º ciclo	Máx. 1.º ciclo	Final 1.º ciclo	Máx. 3.º ciclo
<i>Geobacter</i>	0,1	0,0	22,9	21,4	29,3
<i>Bacteroides</i>	0,3	0,0	15,2	7,2	24,0
<i>Escherichia</i>	0,0	0,5	0,5	0,3	14,8
<i>Porphyromonadaceae</i> no clasificado	0,5	7,0	16,1	8,9	9,0
<i>Clostridium</i>	0,5	9,1	1,3	3,4	1,6
<i>Pseudomonas</i>	4,0	22,4	1,7	1,5	0,2
<i>Deferribacteraceae</i> no clasificado	0,0	0,0	8,3	13,3	0,2
<i>Methanosaeta</i>	8,3	0,2	0,4	0,1	0,0
<i>Exiguobacteraceae</i> no clasificado	0,0	30,0	2,8	5,9	0,0
CCM-SHE					
Género	A	Inicio 1.º ciclo	Máx. 1.º ciclo	Final 1.º ciclo	Máx. 3.º ciclo
<i>Shewanella</i>	91,1	63,8	54,5	44,0	51,3
<i>Lachnospiraceae</i> no clasificado	0,0	0,4	17,5	18,2	19,8
<i>Trabulsiella</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	16,3
<i>Clostridium</i>	0,0	14,4	20,6	11,7	4,7
<i>Clostridiales</i> no clasificado	0,0	21,1	6,4	16,8	1,9
<i>Lactobacillus</i>	8,7	0,0	0,1	0,0	0,1

un productor de acetato a través de la fermentación de polisacáridos [44] e incluso es capaz de transferir electrones que reducen el Fe(III) [45]. Por lo tanto, el conocido género electrogénico *Geobacter* aprovecha los productos de otros metabolismos y oxida el acetato como donante de electrones y reduce el electrodo como aceptor de electrones [46]. Además, *Escherichia* (14,8 %) es conocida por su capacidad para fermentar muchas fuentes de carbono y algunas de sus especies se han utilizado como inóculo en estudios previos de CCM que muestran la actividad de transferencia de electrones [47]. Otro aspecto importante es el gradiente de diversidad entre el anolito (POME diluido) y el inóculo. Según Mallon *et al.* [48], la diversidad es un actor clave para establecer una invasión microbiana en un entorno de huésped. El LS proporcionó varios géneros a la cámara del ánodo por inoculación; por lo tanto, una comunidad uniforme y diversa comenzó a interactuar. Las condiciones de operación de CCM condujeron a una disimilitud funcional en la comunidad que se reflejó en la curva de densidad de corriente (Figura 6-A) por la posible capacidad de usar diferentes tipos de moléculas presentes en el POME. Finalmente, el reemplazo del anolito en cada ciclo sirvió como un impulso promotor para la nueva estructura de la comunidad al proporcionar recursos nuevos y suficientes para seguir funcionando.

Por otro lado, la CCM-SHE exhibió una generación de corriente más baja. Aunque *Shewanella* se ha considerado la bacteria de respiración más versátil hasta la fecha [49], parecía que la complejidad del POME limitaba su rendimiento. Inicialmente, *Shewanella* comprendía la mayor parte de la microbiota inicial (91 %) antes de la aclimatación (A), debido al método de inoculación (Tabla 4). Luego, la biopelícula de arranque del primer ciclo mostró una población considerable de *Clostridiales no clasificados* (21,2 %) y *Clostridium* (14,4 %) junto con una abundancia relativa reducida de *Shewanella* (63,8 %). Indica que la microbiota nativa presente en el POME fue enriquecida en condiciones anaeróbicas en circuito abierto. Una vez que la corriente comenzó a transferirse entre los electrodos, *Shewanella* todavía estaba sufriendo un despliegue en abundancia relativa hasta el máx. del 1.º ciclo (54,1 %). En este punto del proceso, otros géneros aparecieron como importantes contribuyentes al rendimiento de la CCM.

Por ejemplo, *Lachnospiraceae Unclassified* y *Clostridium* aumentaron en el pico de corriente máxima en el 1.º ciclo (17,5 % y 20,6 %, respectivamente).

Las familias *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae* están relacionadas con la degradación lignocelulósica de los racimos de fruta vacíos de palma de aceite para producir biogás [50]; los resultados de este estudio indican que estos géneros también son capaces de degradar el POME. Finalmente, *Shewanella* mantuvo una población estable (51,3 %) y fue acompañada por *Lachnospiraceae* no clasificada (19,8 %) y *Trabulsiella* (16,3 %), al final del 3.º ciclo. Los ciclos de generación de corriente fueron similares en forma y duración, lo que significa que se estableció una biopelícula fuerte en la superficie del ánodo. Aunque la generación de corriente está asociada con los géneros electrogénicos, no se puede ignorar la contribución de las bacterias fermentativas. Posiblemente, los metabolismos de *Trabulsiella*, *Lachnospiraceae* no clasificado y *Clostridium* proporcionaron compuestos accesibles a *Shewanella*, lo que le permitió llevar a cabo su trabajo. Se puede decir que la generación de electricidad en CCM cargada con un sustrato tan complejo es un proceso complementario que requiere la interacción de varios géneros para lograr la degradación.

La inoculación externa puede explicarse por los fundamentos de las invasiones microbianas descritos por Mallon *et al.* [48]. Se añadieron intencionalmente inóculos de LS o SHE a la comunidad nativa en el POME y se sometieron a un proceso de invasión microbiana; introducción, establecimiento, crecimiento y propagación, e impacto final [48]. Por ejemplo, LS y *Shewanella* eludieron la resistencia abiótica (pH, temperatura, salinidad adecuada para crecer) a través de una introducción de población viable y condiciones de la CCM. Sin embargo, la resistencia biótica entró en juego a través de la competencia del sustrato o el antagonismo. Esto fue crucial en el caso de *Shewanella* ya que la microbiota residente con recursos limitados redujo la abundancia de la población de *Shewanella* a 51,3 % a pesar de tener una abundancia inicial de 91,1 %. Al mismo tiempo, algunos otros géneros aumentaron su abundancia posiblemente debido a nuevas interacciones que finalmente afectan el rendimiento de la CCM que se reflejó en la curva de corriente en la Figura 6-B.

Conclusiones

Los LM, LF y LS influyeron positivamente en el rendimiento de CCM en términos de remoción de DQO ($69,2 \pm 2,1$ %) y EC ($16,3 \pm 0,6$ %), en comparación con los no inoculados (remoción de DQO $59,6 \pm 6,2$ % y EC de $6,0 \pm 1,2$ %). Esto indica la importancia

de un inóculo externo para optimizar el tratamiento de POME y la recolección de energía.

La potencia de salida del LS se mantuvo estable en su máximo ($3,3 \pm 0,4 \text{ W/m}^3$) a una alta demanda de corriente. Esto se asocia con el diverso microbioma suministrado por el LS que contribuye a la degradación de POME y la generación de electricidad.

La carga inicial de la DQO afectó el proceso electroquímico y de tratamiento de aguas residuales en las CCM. Sin embargo, solo la EC presentó una correlación clara entre las cargas evaluadas ($EC = -0,1832 \text{ DQO inicial} + 0,7972$).

Las CCM condujeron a un equilibrio en términos de diversidad, donde la colaboración entre bacterias fermentativas y electrogénicas permitió la degradación de POME y la generación de electricidad al mismo tiempo. La comunidad microbiana se enriqueció cuando se inoculó la CCM con LS (consorcio natural), mientras que una diversificación se presentó por inoculación con *Shewanella* (cultivo puro). *Shewanella* se mantuvo como el género más dominante para las CCM inoculadas con cultivo puro, pero se obtuvieron densidades de corriente ~5 veces menores en comparación con las CCM inoculadas con el consorcio natural de LS.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses financieros contrapuestos conocidos ni relaciones perso-

nales que pudieran haber influido en el trabajo que se presenta en este documento.

Reconocimientos

Esta investigación fue apoyada por la Universidad Industrial de Santander-UIS [Proyecto VIE 5487]. J.A. Albarracín-Arias agradece a COLCIENCIAS por la beca bajo el programa “Maestría Nacional” N° 771. Los autores agradecen al Dr. Nurul Asyifah Mustapha por su asistencia técnica con el análisis de secuenciación de ADN.

Apéndice A. Datos complementarios

Los datos complementarios a este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.218>

Fuente de figuras

Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Fuente: Reimpreso de International Journal of Hydrogen Energy, Volumen 46, número 74, Albarracín-Arias, J. A., Yu C. P., Y., Toshinari, M., Valdivieso-Quintero, W. & Sánchez-Torres, V. Microbial Community Dynamics and Electricity Generation in MFCs Inoculated with POME Sludges and Pure Electrogenic Culture, 14 páginas, Copyright (2022), con permiso de Elsevier.

Referencias

1. Tan H, Li J, He M, Li J, Zhi D, Qin F, *et al.* Global evolution of research on green energy and environmental technologies: A bibliometric study. *J Environ Manag* 2021;297:301e4797. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113382>.
2. Li Q, Zuo W, Zhang Y, Li J, He Z. Effects of rectangular rib on exergy efficiency of a hydrogen-fueled micro combustor. *Int J Hydrogen Energy* 2020;45:10155e63. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.221>
3. Zuo W, Li Q, He Z, Li Y. Numerical investigations on thermal performance enhancement of hydrogen-fueled micro planar combustors with injectors for micro-thermophotovoltaic applications. *Energy* 2020;194:116904. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.116904>

4. Wang Z, Zhang X, Rezazadeh A. Hydrogen fuel and electricity generation from a new hybrid energy system based on wind and solar energies and alkaline fuel cell. *Energy Rep* 2021;7:2594e604. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.04.060>
5. Rasheed T, Anwar MT, Ahmad N, Sher F, Khan SUD, Ahmad A, *et al.* Valorisation and emerging perspective of biomass based waste-to-energy technologies and their socioenvironmental impact: a review. *J Environ Manag* 2021;287:112257. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112257>.
6. Liebetrau J, Strauber H, Kretschmar J, Denysenko V, Nelles M. Anaerobic digestion. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2017;166:281e99. https://doi.org/10.1007/10_2016_67
7. Ghosh S, Chowdhury R, Bhattacharya P. A review on single stage integrated dark-photo fermentative biohydrogen production: insight into salient strategies and scopes. *Int J Hydrogen Energy* 2018;43:2091e107. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.018>.
8. Logan BE. *Microbial fuel cells*. 2008. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. Hoboken.
9. ElMekawy A, Srikanth S, Bajracharya S, Hegab HM, Nigam PS, Singh A, *et al.* Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): the synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Res Int* 2015;73:213e25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.045>
10. Asefi Bahareh, Li S-L, Moreno HA, Sánchez-Torres V, Hu A, Li J, *et al.* Characterization of electricity production and microbial community of food waste-fed microbial fuel cells. *Process Saf Environ Protect* 2019;125:83e91.
11. Wilberforce T, Sayed ET, Abdelkareem MA, Elsaid K, Olabi AG. Value added products from wastewater using bioelectrochemical systems: current trends and perspectives. *J Water Process Eng* 2021;39:101737. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101737>
12. Munoz-Cupa C, Hu Y, Xu C, Bassi A. An overview of microbial fuel cell usage in wastewater treatment, resource recovery and energy production. *Sci Total Environ* 2021;754:142429. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142429>
13. Hosseini SE, Bagheri G, Abdul Wahid M, Saat A. Clean fuel, clean energy conversion technology: experimental and numerical investigation of palm oil mill effluent biogas flameless combustion. *BioResources* 2015;10:6597e609. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.6597-6609>
14. Liew WL, Kassim MA, Muda K, Loh SK, Affam AC. Conventional methods and emerging wastewater polishing technologies for palm oil mill effluent treatment: a review. *J Environ Manag* 2014;149:222e35. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.016>
15. Cheng YW, Chong CC, Lam MK, Ayoub M, Cheng CK, Lim JW, *et al.* Holistic process evaluation of non-conventional palm oil mill effluent (POME) treatment technologies: a conceptual and comparative review. *J Hazard Mater* 2021;409:124964. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124964>

16. Cheng J, Zhu X, Ni J, Borthwick A. Palm oil mill effluent treatment using a two-stage microbial fuel cells system integrated with immobilized biological aerated filters. *Bioresour Technol* 2010;101:2729e34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.017>
17. Baranitharan E, Khan MR, Prasad DMR, Salihon J Bin. Bioelectricity generation from palm oil mill effluent in microbial fuel cell using polacrylonitrile carbon felt as electrode. *Water, Air, Soil Pollut* 2013;224:1533. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1533-1>
18. Jong BC, Liew PWY, Juri ML, Kim BH, Mohd, Dzomir AZ, Leo KW, *et al.* Performance and microbial diversity of palm oil mill effluent microbial fuel cell. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:660e7. <https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2011.03159.x>.
19. Baranitharan E, Khan MR, Prasad DMR, Teo WFA, Tan GYA, Jose R. Effect of biofilm formation on the performance of microbial fuel cell for the treatment of palm oil mill effluent. *Bioproc Biosyst Eng* 2015;38:15e24. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1239-9>
20. Yu J, Park Y, Cho H, Chun J, Seon J, Cho S, *et al.* Variations of electron flux and microbial community in air-cathode microbial fuel cells fed with different substrates. *Water Sci Technol* 2012;66:748e53. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.240>
21. Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schroder U, Keller J, Freguia S, *et al.* Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* 2006;40:5181e92. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
22. Md Nor MH, MuhammadMubarak MF, Abdirahman Elmi HS, Ibrahim N, Abdul Wahab MF, Ibrahim Z. Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge. *Bioresour Technol* 2015;190:458e65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.103>
23. Baranitharan E, Khan MR, Yousuf A, Teo WFA, Tan GYA, Cheng CK. Enhanced power generation using controlled inoculum from palm oil mill effluent fed microbial fuel cell. *Fuel* 2015;143:72e9. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.11.030>.
24. Islam MA, Woon CW, Ethiraj B, Cheng CK, Yousuf A, Khan MMR. Correlation of power generation with timecourse biofilm architecture using *Klebsiella variicola* in dual chamber microbial fuel cell. *Int J Hydrogen Energy* 2017;42:25933e41. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.193>
25. Islam MA, Woon CW, Ethiraj B, Yousuf A, Ong HR, Khan MMR. Bioelectrochemical behavior of wild type *Bacillus cereus* in dual chamber microbial fuel cell. *IJUM Eng J* 2017;18:79e86
26. Cai H, Wang J, Bu Y, Zhong Q. Treatment of carbon cloth anodes for improving power generation in a dual-chamber microbial fuel cell. *J Chem Technol Biotechnol* 2013;88:623e8. <https://doi.org/10.1002/jctb.3875>
27. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;41:1e11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

28. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335e6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
29. Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schroder U, Keller J, Freguia S, *et al.* Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* 2006;40:5181e92. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
30. Chang CC, Li SL, Hu A, Yu CP. Long-term operation of biocatalyzed cathodes within continuous flow membrane-less microbial fuel cells. *Chemosphere* 2021;266:129059. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129059>
31. Watson VJ, Logan BE. Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells. *Electrochem Commun* 2011;13:54e6. <https://doi.org/10.1016/J.ELECOM.2010.11.011>.
32. Ieropoulos I, Winfield J, Greenman J. Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2010;101:3520e5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.108>
33. Althausen M. Tratamiento de efluentes de la planta de beneficio-convertir un residuo en un recurso. *Palmas* 2016;37:31e7.
34. Lu N, Zhou S gui, Zhuang L, Zhang J tao, Ni J ren. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochem Eng J* 2009;43:246e51. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.005>
35. Lin CW, Wu CH, Huang WT, Tsai SL. Evaluation of different cell-immobilization strategies for simultaneous distillery wastewater treatment and electricity generation in microbial fuel cells. *Fuel* 2015;144:1e8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.009>
36. Zhang X, He W, Ren L, Stager J, Evans PJ, Logan BE. COD removal characteristics in air-cathode microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2015;176:23e31. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.001>
37. Veerubhotla R, Varanasi JL, Das D. Biofilm formation within microbial fuel cells. En: *Prog. Recent trends microb. Fuel cells.* Elsevier B.V.; 2018. p. 231e42. <https://doi.org/10.1016/B978-0444-64017-8.00012-9>
38. Bonanni PS, Massazza D, Busalmen JP. Stepping stones in the electron transport from cells to electrodes in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Phys Chem Chem Phys* 2013;15:10300. <https://doi.org/10.1039/c3cp50411e>
39. Kumar R, Singh L, Zularisam AW. Exoelectrogens: recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;56:1322e36. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>
40. In-Seop C, Hyun-Soo M, Orianna B, Jae-Kyung J, Ho-Il P, Byung-Hong K. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:163e77.

41. Patel GB. *Methanosaeta*. En: Bergey's Manual of systematics of archaea and bacteria. Wiley; 2015. p. 1e8.
42. Wang VB, Yam JKH, Chua SL, Zhang Q, Cao B, Chye JLS, *et al.* Synergistic microbial consortium for bioenergy generation from complex natural energy sources. *Sci World J* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/139653>.
43. Krieg NR. *Porphyromonadaceae* fam. nov. En: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley; 2015. p. 1e2.
44. Shah AL, Liu C, Hwy RH, Finegold SM, Medical VA, F IDS, *et al.* *Bacteroides*. En: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley; 2015.
45. Wang A, Liu L, Sun D, Ren N, Lee D-J. Isolation of Fe(III)reducing fermentative bacterium *Bacteroides* sp. W7 in the anode suspension of a microbial electrolysis cell (MEC). *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:3178e82. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.154>
46. Bond DR, Lovley DR. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1548e55. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548>
47. Rezaei F, Xing D, Wagner R, Regan JM, Richard TL, Logan BE. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3673e8. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-08>
48. Mallon CA, Van Elsas JD, Salles JF. Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends Microbiol* 2015;23:719e29. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.013>
49. Raghavulu SV, Babu PS, Goud RK, Subhash GV, Srikanth S, Mohan SV. Bioaugmentation of an electrochemically active strain to enhance the electron discharge of mixed culture: process evaluation through electro-kinetic analysis. *RSC Adv* 2012;2:677e88. <https://doi.org/10.1039/c1ra00540e>
50. Suksong W, Kongjan P, Prasertsan P, O-Thong S. Thermotolerant cellulolytic *Clostridiaceae* and *Lachnospiraceae* rich consortium enhanced biogas production from oil palm empty fruit bunches by solidstate anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2019;291:121851. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121851>
51. Mustapha Nurul Asyifah, Hu Anyi, Chang-Ping Yu, Sharuddin Siti Suhailah, Ramli Norhayati, Shirai Yoshihito, *et al.* Seeking key microorganisms for enhancing methane production in anaerobic digestion of waste sewage sludge. *Environmental biotechnology* 2018;102:5323e34. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9003-8>.