

**ANÁLISIS ELECTROQUÍMICOS DE ALGAS ELECTROGÉNICAS Y
MATERIALES PARA CELDAS BIOFOTOVOLTAICAS.**

JORGE LUIS CRUZ CONTRERAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

**ANÁLISIS ELECTROQUÍMICOS DE ALGAS ELECTROGÉNICAS Y
MATERIALES PARA CELDAS BIOFOTOVOLTAICAS.**

JORGE LUIS CRUZ CONTRERAS

**Trabajo de grado presentado para optar por el título de
Ingeniero Químico**

Director:

**Crisóstomo Barajas Ferreira
M.Sc. Ingeniería Química**

Codirector:

**Diana Marcela Ibarra Mojica
M.Sc. Ingeniería Química
Ingeniera Sanitaria y Ambiental**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

DEDICATORIA

A mi mamá por ser luz en mi vida y ser siempre mi guía; por ayudarme a cumplir mis sueños y apoyarme en cada meta que emprendo. Por enseñarme a soñar en grande y recordarme que todo lo que sueña es posible. Toda mi vida seguiré trabajando por ella.

A mi papá por estar siempre que lo necesité.

A mis hermanos por su amor incondicional, por enseñarme a crecer desde su experiencia, por siempre cuidarme y dar lo mejor de ellos por mí.

A mis compañeros de la universidad por acompañarme en este proceso de formación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por formarme como Ingeniero Químico y especialmente por brindarme la oportunidad de hacer un intercambio académico en Europa. Gracias por siempre apoyar a los estudiantes y cumplir sus sueños.

Al profesor Ioanis Katakis director del grupo de investigación Interfibio de la Universidad Rovira I Virgili en España por invitarme a hacer este proyecto de investigación en sus laboratorios. También a los doctores Fungisai Matemadombo, Ángel González y a todos los miembros del grupo Interfibio por guiarme en la realización de este trabajo. Gracias a todos por compartir su conocimiento conmigo.

Al profesor Crisóstomo Barajas Ferreira y a mi codirectora Diana Ibarra por apoyarme en la realización de este trabajo. Por impulsarme en el proceso del intercambio y acompañarme desde el primer momento. Gracias por su tiempo y sus buenas enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	16
1.1 CELDAS BIOFOTOVOLTAICAS	16
1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO	18
1.2.1 Voltametría cíclica (CV).....	19
1.2.2 Voltametría de barrido lineal (LSV).]	20
1.2.3 Voltametría de pulso diferencial (DPV).	20
1.2.4 Soluciones para análisis electroquímico	21
2. OBJETIVO GENERAL.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. METODOLOGÍA.....	23
3.1 FIJACIÓN DE LA MICROALGA EN LOS MATERIALES	24
3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MICROALGAS COMPARANDO UNA SUPERFICIE MODIFICADA Y NO MODIFICADA	25
3.2.1 Preparación de soluciones para el análisis electroquímico	25
3.2.1.1 Solución de ferrocianuro de potasio.	25
3.2.1.2 Solución de PBS.....	25
3.2.1.3 Solución de BG-11.....	26
3.2.1.4 Solución sobrenadante sin microalgas.	26

3.2.1.5	Solución combinada para prueba de electroactividad	27
3.2.2	Análisis electroquímico.....	27
4.	RESULTADOS	29
4.1	FIJACIÓN DE LA MICROALGA EN LOS MATERIALES	29
4.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MICROALGAS COMPARANDO UNA SUPERFICIE MODIFICADA Y NO MODIFICADA	30
4.2.1	Mediciones en celda electroquímica con ferrocianuro de potasio..	30
4.2.2	Mediciones en celda electroquímica con PBS y BG-11.	36
4.2.3	Mediciones de la solución sobrenadante sin microalgas.....	39
4.2.4	Prueba de electroactividad.....	42
5.	CONCLUSIONES.....	43
6.	RECOMENDACIONES	44
	CITAS BIBLIOGRAFICAS.....	45
	BIBLIOGRAFÍA.....	49
	ANEXOS	53

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Número de pruebas realizadas	28
Tabla 2. Comparación de separación entre picos de potencial para los 3 electrodos.	34
Tabla 3. Estimación de área superficial efectiva y número de células adsorbidas.	35
Tabla 4. Comparación de potencial entre picos de superficie modificada con solución sobrenadante.	41
Tabla 5. Estimación de área superficial efectiva de la modificación con solución sobrenadante.	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema Biofotovoltaico.....	17
Figura 2. Montaje de una celda biofotovoltaica (BPV)	18
Figura 3. Esquema resumen metodología	23
Figura 4. Adsorción de la microalga en los electrodos.....	24
Figura 5. Separación del cultivo en diferentes fases.....	26
Figura 6. Configuración de 3 electrodos.	27
Figura 7. Vista de los 3 electrodos.....	29
Figura 8. Comparación entre la superficie modificada con alga y no modificada en ferrocianuro de potasio a una velocidad de escaneo de 100 mV/s.....	31
Figura 9. Comparación entre la superficie modificada con alga y no modificada en ferrocianuro de potasio.	33
Figura 10. Comparación entre la superficie modificada con alga y la no modificada en solución PBS a una velocidad de escaneo de 100 m V /s.	37
Figura 11. Comparación entre la superficie modificada con alga y la no modificada en solución del medio BG-11 a una velocidad de escaneo de 100 m V/s.	38
Figura 12. Superficie modificada con solución sobrenadante.....	40
Figura 13. CV- Comparación entre la superficie del electrodo de Platino modificada con algas y no modificada en ferrocianuro de potasio diluido en solución de medio BG-11 al 2%. Velocidad de escaneo 10 mV.s ⁻¹	42

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Materiales utilizados en celdas BPV.....	53
Anexo B. Resultados de técnicas de voltametría CV, LSV y DPV en ferrocianuro de potasio	54
Anexo C. Picos de corriente para los 3 materiales y cálculo del área de superficie efectiva	57
Anexo D. Resultados de técnicas de voltametría CV, LSV y DPV en PBS y medio BG-11	62

RESUMEN

TÍTULO: ANÁLISIS ELECTROQUÍMICOS DE ALGAS ELECTROGÉNICAS Y MATERIALES PARA CELDAS BIOFOTOVOLTAICAS*.

AUTOR: JORGE LUIS CRUZ CONTRERAS**.

PALABRAS CLAVE: celdas biofotovoltaicas, electroquímico, microalgas, biopelículas, adsorción, *Synechocystis sp.* PCC 6803, Oro, Platino, carbono vítreo

DESCRIPCIÓN:

Las celdas biofotovoltaicas (BPV) son dispositivos que usan organismos fotosintéticos como microalgas y especies de cianobacterias capaces de convertir la energía de la luz en energía eléctrica en ausencia de una fuente de materia orgánica. Una mejor comprensión de las interacciones electroquímicas entre los materiales de la celda BPV y los microorganismos hace parte de los esfuerzos necesarios para aumentar su rendimiento y mejorar su configuración, una estrategia es la fijación de biopelículas directamente en la superficie de los materiales. En este trabajo se utilizó la adsorción como método de fijación, se modificaron las superficies de electrodos de Oro, Platino y carbono vítreo con *Synechocystis sp.* PCC 6803. Para establecer si hubo adhesión de células en la superficie de los materiales y una transferencia de electrones que pueda ser usada en celdas BPV, se realizó un análisis electroquímico comparando la superficie modificada con alga y la no modificada. Las pruebas se ejecutaron en una celda electroquímica aplicando técnicas de voltametría cíclica (CV), de barrido lineal (LSV) y de pulso diferencial (DPV). Primero se observaron los cambios en la superficie dados por el color de la microalga, posterior a ello se evaluó una posible transferencia de electrones en las soluciones de ferrocianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y solución de medio BG-11. Los resultados indican que hubo adsorción de células en Oro y Platino, pero no hubo transferencia de electrones sobre ningún material.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. Director M.Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectores M.Sc. Diana Marcela Ibarra Mojica; Dr. Andrés Fernando Barajas.

ABSTRACT

TITLE: ELECTROCHEMICAL ANALYSES OF ELECTROGENIC ALGAE & MATERIALS FOR BIOPHOTVOLTAIC CELLS*

AUTHOR: JORGE LUIS CRUZ CONTRERAS**

KEYWORDS: Biophotovoltaic cells, microalgae, electrochemical, microalgae, biofilms, adsorption, *Synechocystis sp.* PCC 6803, Gold, Platinum, glassy carbon

DESCRIPTION:

Biophotovoltaic cells (BPV) are devices that use photosynthetic organisms such as microalgae and cyanobacterial species capable to turn light energy into electrical energy in the absence of organic feedstock. A better understanding about the electrochemical interactions between the BPV cell materials and microorganisms is part of the necessary efforts to increase their performance and improve its configuration, a strategy is the attachment of biofilms directly on the surface of materials. In this work using adsorption like attachment method, the electrode surfaces of Gold, Platinum and glassy carbon were modified with *Synechocystis sp.* PCC 6803. To establish if there was adhesion of cells on the surface of the materials and an electron transfer that can be used in BPV cells. An electrochemical analysis was carried out comparing the alga-modified surface with the non-modified, the studies were carried out in an electrochemical cell applying three techniques, cyclic voltammetry (CV), linear sweep voltammetry (LSV) and differential pulse voltammetry (DPV). First the changes on the surface given by the color of the microalga were observed, afterwards a possible electron transfer was evaluated in the solutions of potassium ferricyanide solution ($K_3[Fe(CN)_6]$), of PBS (phosphate buffered saline solution) and BG-11 medium solution. The results indicate that there was cells adsorption in Gold and Platinum electrodes, but there was no electron transfer on any material.

* Bachelor thesis

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. Director M.Sc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectores M.Sc. Diana Marcela Ibarra Mojica; Dr. Andrés Fernando Barajas.

INTRODUCCIÓN

La habilidad de ciertos microbios para liberar electrones fuera de la célula (conocida como “actividad exoelectrogénica”) ha llevado al desarrollo de dispositivos que funcionan a partir de organismos vivos y son considerados fuentes de energías limpias, dirigidas a reducir las tasas de contaminación global. Dentro de ellos están los sistemas biofotovoltaicos (BPVs) que se componen de organismos fotosintéticos tales como microalgas y especies de cianobacterias que almacenan la energía y generan corriente a través de la fotólisis del agua para suministrar a un electrodo en ausencia de una fuente de materia orgánica [1].

Los sistemas BPV tienen muchos beneficios pero tienen algunas limitaciones y están relacionadas con presentar potencias de salida generalmente bajas y bajas eficiencias en la conversión de luz [2]. En general, los bajos rendimientos y bajas potencias de salida obtenidas son debidas a la resistencia interna de la propia celda [3], como las pérdidas metabólicas de diferencia de potencial entre el producto microbiano y el aceptor final de electrones (ánodo) [4].

Un material anódico en celdas BPV necesita estabilidad electroquímica, ser biocompatible, conductividad razonablemente alta, permitir la adhesión de células y un bajo costo de fabricación. El ánodo debe aceptar los electrones del microorganismo y establecer una transferencia directa de electrones para no limitar al dispositivo. Los materiales anódicos y catódicos de las celdas BPV son generalmente de carbono (telas, fieltro, papel, grafito), electrodos ITO (óxido de estaño e indio), FTO (óxido de estaño dopado con flúor sobre vidrio) y también se han hecho estudios con electrodos metálicos de Oro, Plata, Platino, Cobre y aceros inoxidable [5].

Para la probable mejora de rendimiento y aumento de potencias de salida de los dispositivos se requiere una mejor comprensión de las interacciones electroquímicas entre los materiales de la celda BPV y los microorganismos. Diversos estudios han encontrado nuevas herramientas para elevar la eficiencia de los dispositivos BPV y una de ellas es el cultivo del microorganismo directamente en la superficie del ánodo como una biopelícula y de esta forma establecer una transferencia directa de electrones. Las biopelículas fotosintéticas ya han demostrado resultados bastante positivos, en una investigación reciente cepas de algas verdes y cianobacterias como *Synechocystis sp.* PCC 6803, fueron cultivadas directamente en un ánodo conductor, el resultado fue un aumento en las potencias de salida de la celda (10 mW/m^2), los dispositivos BPV generaron suficiente energía para ejecutar un reloj digital comercial [4], adicionalmente *Synechocystis sp.* PCC 6803 bajo condiciones especiales ha demostrado que puede producir nanocables microbianos que son conexiones eléctricamente conductoras capaces de una transferencia de electrones y producción de energía más eficiente [6] [7].

Estas investigaciones dieron indicios positivos para una transferencia de electrones del microorganismo, sin embargo, no fue evaluada específicamente la interacción electroquímica entre la microalga y los materiales de la celda que comprueben una transferencia directa de electrones; intervinieron metodologías mucho más avanzadas y los resultados son las potencias de salida medidas de un dispositivo BPV consolidado. En este trabajo se modificaron las superficies de 3 materiales con el fin de verificar si las células se adhieren a la superficie y si hay una transferencia de electrones que pueda usarse en dispositivos BPV. De los materiales disponibles se seleccionaron materiales que permiten una mejor caracterización y de las varias maneras de modificar las superficies se utilizó una de las más simples la adsorción directa.

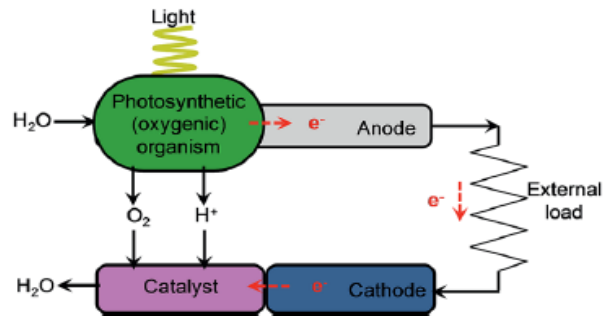
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Las microalgas son la esencia de los sistemas biofotovoltaicos debido a su capacidad de acceder a la energía solar para dividir el agua proporcionando electrones y oxígeno. Gracias a su abundancia, altas tasas de crecimiento [8] y de fijación de CO₂ (hasta 6.24 kg.m³/día) [9] se perfilan como una gran oportunidad para el desarrollo de sistemas de energía renovable. Estas propiedades hacen que la energía de las microalgas sea posible de aprovechar en forma de bioelectricidad utilizando maquinaria fotosintética en un sistema de celda de combustible definido [10].

1.1 CELDAS BIOFOTOVOLTAICAS

Los dispositivos BPV son un híbrido de las MFCs (celdas de combustible microbianas) y organismos fotosintéticos; la luz solar y el agua se usan como “combustible” para generar energía eléctrica o proveer una fuente de equivalentes reductores para una reacción catódica, se diferencian de otros sistemas porque al usar microorganismos fotosintéticos como su componente biológico no requieren la entrada de energía química (es decir sustratos orgánicos) y no producen CO₂ [11]. En la Figura 1 se muestran los componentes que conducen a la transferencia de electrones (e-) al ánodo y liberación de protones (H+) en sistemas celulares biofotovoltaicos (BPVs).

Figura 1. Sistema Biofotovoltaico.

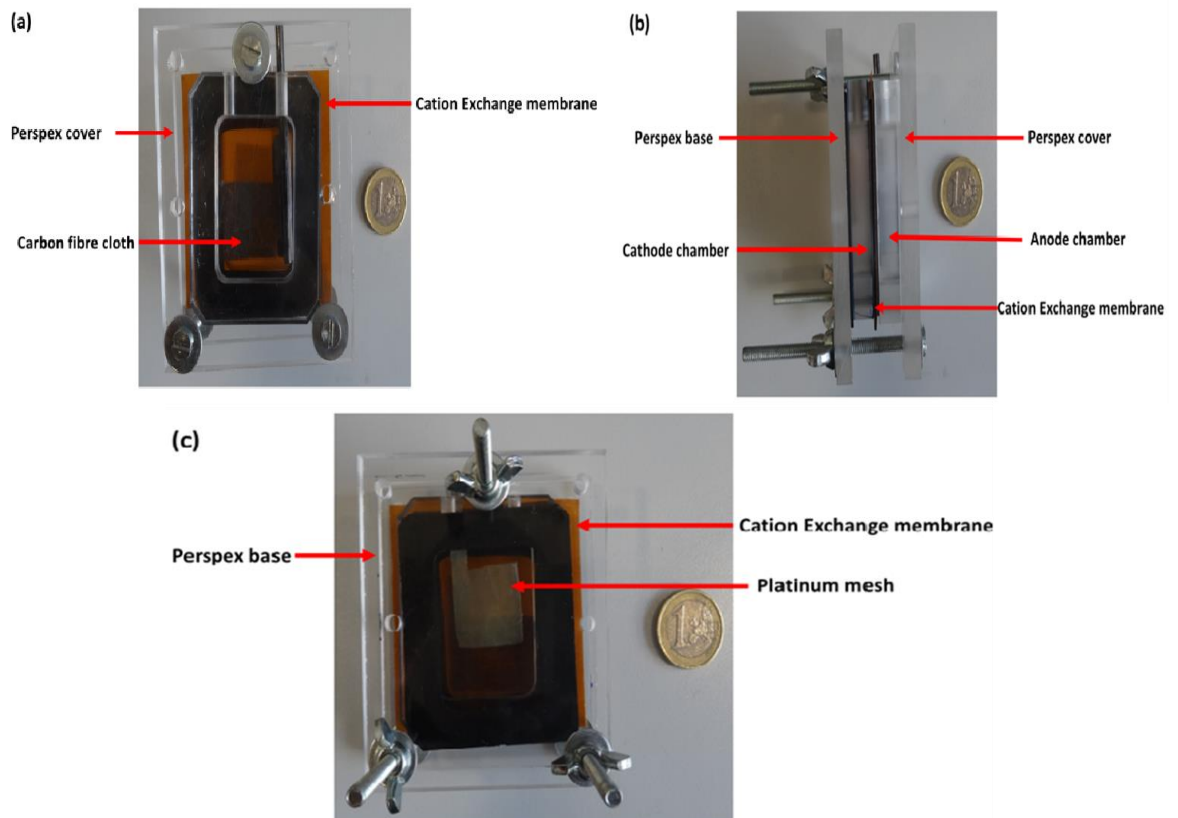


Fuente: MCCORMICK, A. J. et al. Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. 2015 [1].

Los materiales de la celda son críticos para la eficiencia del dispositivo; por lo tanto, el estudio de los materiales utilizados en este tipo de celdas es esencial para las mejoras de los dispositivos. En el Anexo A se presenta un resumen de materiales y potencias de salida obtenidas de celdas BPV.

Una importante ventaja de los BPVs es que pueden generar corriente en periodos diurnos o nocturnos y se componen de microorganismos capaces de auto ensamblarse y auto repararse [1] [11]. Las cianobacterias como la usada en este trabajo *Synechocystis sp.* PCC 6803 se ven favorecidas en BPVs porque tienen una transducción de la luz más eficiente [1] y estudios muestran respuestas positivas para la generación de corriente usando la cepa en el compartimiento del ánodo [12]. A continuación, se presenta el montaje de una celda biofotovoltaica (Figura 2).

Figura 2. Montaje de una celda biofotovoltaica (BPV)



Fuente: Grupo de investigación INTERFIBIO, Universidad Rovira I Virgili, España. Vista frontal (a), perfil (b), y posterior (c).

1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO

En el desarrollo y mejora del rendimiento de las celdas de combustible microbianas (MFC) y biofotovoltaicas (BPV) se han aplicado una amplia gama de técnicas de análisis electroquímico para una mejor comprensión de sus componentes y procesos. Parte de ellas son las técnicas voltametría cíclica, voltametría de barrido lineal y la voltametría de pulso diferencial [13] [14].

1.2.1 Voltametría cíclica (CV). La voltametría cíclica es usualmente utilizada en el estudio de reacciones de óxido-reducción. Esta técnica consiste en explorar linealmente el potencial de un electrodo de trabajo estacionario (en una solución no agitada) utilizando una forma de onda de potencial triangular. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante del potencial aplicado. El gráfico resultante de potencia se denomina voltamograma cíclico; las trayectorias que muestra la figura son, el escaneo positivo que es la oxidación (zona anódica) y el escaneo negativo la reducción (zona catódica). Los picos característicos observables son, de corriente máxima en amperios I_{pa} (zona anódica), I_{pc} (zona catódica); picos de potencial en voltios E_{pa} (zona anódica) y E_{pc} (zona catódica) [15].

El pico de corriente máxima para una pareja reversible (a 25 ° C) está dado por la ecuación de Randles-Sevcik [15] (Ecuación 1).

$$I_p = (2.69 \exp 5) * n^{\frac{3}{2}} * A * D^{\frac{1}{2}} * C * V^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde n es el número de electrones, A el área del electrodo (cm^2), C la concentración (mol/cm^3), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s) y V la velocidad de escaneo de potencial (V/s). La ecuación se interpreta de la siguiente manera, la corriente (I_p) es directamente proporcional a la concentración (C) y aumenta con la raíz cuadrada de la velocidad de escaneo ($V^{1/2}$).

La voltametría cíclica ha permitido dar resultados precisos en estudios de modificación de las superficies de electrodos para definir la fijación del microorganismo [16] [17]. Un ejemplo de ello es un estudio realizado por (Busalmen *et al* [16]) de la interacción electroquímica entre células bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) con electrodos de Oro donde se

presentaron valores de corriente más altos en presencia de las células bacterianas adsorbidas.

1.2.2 Voltametría de barrido lineal (LSV). La voltametría de barrido lineal es a menudo una técnica complementaria a los CV y ampliamente utilizada como técnica de análisis electroquímico [18] , también se ha aplicado en estudios de superficies modificadas con biopelículas [19]. En este método de voltametría se mide la corriente del electrodo de trabajo mientras se realiza un barrido lineal en el tiempo entre el potencial del electrodo de trabajo y el potencial del electrodo de referencia; la tensión eléctrica o voltaje se escanea desde un límite inferior hasta un límite superior. Otra de sus diferencias es que la sensibilidad de la técnica LSV es más alta que para un CV, es decir, para el mismo valor de potencial aplicado puede representar un valor de pico de corriente más alto [20].

1.2.3 Voltametría de pulso diferencial (DPV). La voltametría de pulso diferencial es una técnica útil para medir los niveles de trazas de especies orgánicas e inorgánicas, en la que se usan pulsos de magnitud fijos (superpuestos en una rampa de potencial lineal) que se aplican al electrodo de trabajo en el momento justo antes del final de la caída. La corriente se muestrea dos veces, justo antes de la aplicación del pulso y nuevamente al final de la vida del pulso; la primera corriente se resta instrumentalmente de la segunda y esta diferencia de corriente se representa frente al potencial aplicado. El voltamograma de pulso diferencial resultante consiste en picos de corriente cuya altura es directamente proporcional a la concentración de los analitos correspondientes; la selección de la amplitud del pulso y la tasa de exploración potencial generalmente requieren una compensación entre sensibilidad, resolución y velocidad. Por ejemplo, amplitudes de pulso más grandes dan como resultado picos más grandes y más amplios, las mejoras en la sensibilidad y la resolución de la técnica pueden proporcionar información que define o concluye resultados [15].

La técnica DPV se ha sugerido utilizar por otras investigaciones en el análisis de superficies modificadas y para monitorear biopelículas fotosintéticas, otro estudio realizado por (Marsili *et al* [17]) permitió verificar la formación y fijación de una biopelícula; en ese caso de *Geobacter sulfurreducens*.

1.2.4 Soluciones para análisis electroquímico. El Ferrocianuro de Potasio es un mediador que estimula la transferencia de electrones de los microorganismos [4] y ha sido usado en el estudio de dispositivos BPV como el puente entre el ánodo de la celda y el material biológico [21]. Adicionalmente, la solución de ferrocianuro de potasio en un análisis electroquímico presenta picos de óxido-reducción definidos que son útiles para realizar análisis comparativos precisos y por poseer estas propiedades también se ha utilizado en muchos estudios para evaluar las interacciones reductoras de *Synechocystis sp.* PCC 6803 en diversos experimentos [22] [23] [24] .

La solución PBS (solución salina tamponada con fosfato) ha sido usada en experimentos con cianobacterias gracias a que proporciona un medio neutro y constante para identificar algún cambio o presencia de electroactividad [25]. La solución de medio BG-11 es la solución ideal de conservación de las microalgas y el medio de crecimiento óptimo utilizado en la mayoría de estudios con *Synechocystis sp.* PCC 6803 [3] [23]. Estas 2 soluciones no son mediadores pero son útiles para establecer si los microorganismos por sí solos revelan una transferencia directa de electrones; en un estudio realizado por (Ferré [3]) se utilizó el medio BG-11 para la caracterización electrogénica de *Anabaena sp.* y hubo electroactividad en presencia de la cianobacteria.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adsorción del cultivo de algas y su posible transferencia de electrones en la superficie de materiales usados en celdas BPV por medio de un análisis electroquímico comparando una superficie modificada y no modificada.


2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método de fijación para la inmovilización de la microalga en la superficie de los electrodos.
- Analizar el efecto de la modificación de la superficie de los electrodos con microalgas y determinar si hay transferencia de electrones.

3. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del trabajo se llevaron a cabo 2 fases. En la fase 1 se modificó la superficie de los electrodos (Au, Pt y carbono vítreo) con una adsorción directa como método de fijación de las microalgas y en la fase 2 se evaluó la transferencia de electrones comparando los materiales modificados y no modificados. La Figura 3 resume la metodología global de este trabajo.

Figura 3. Esquema resumen metodología

FASE 1: Fijación de la microalga en los materiales	
Adsorción de las microalgas	
Microalga utilizada: <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 (DO = 0.7)	
3 materiales de electrodo: Oro, Platino y Carbono vítreo	
	
FASE 2: Evaluación del efecto de las microalgas comparando una superficie modificada y no modificada	
Técnicas electroquímicas: CV, LSV y DPV.	
Mediciones en celda electroquímica con Ferrocianuro de Potasio	Solución electroquímica: 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ en 1 M KNO_3 . Superficie modificada con microalga y luego la no modificada.
Mediciones en celda electroquímica con PBS Y BG-11	Soluciones electroquímicas: BG-11 al 2% y PBS pH=7.4. Superficie modificada con microalga y luego la no modificada.
Mediciones de la solución sobrenadante sin microalgas	Soluciones electroquímicas: 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ en 1 M KNO_3 . y PBS pH=7.4. Superficie modificada con sobrenadante.
Prueba de electroactividad	Solución electroquímica: 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ en 1 M de KNO_3 diluida con BG-11 al 2%. Superficie modificada con microalga.

3.1 FIJACIÓN DE LA MICROALGA EN LOS MATERIALES

La modificación de las superficies de los electrodos se realizó mediante adsorción directa. Los electrodos utilizados para el estudio fueron de Oro, Platino y carbono vítreo, que son ampliamente utilizados en análisis electroquímicos de celdas de combustible microbianas [26] [16] [17]. Previo al proceso de adsorción de la microalga, los electrodos fueron sometidos a un proceso de limpieza. Para esto, se usó una técnica combinada de micropulido de la superficie de cada electrodo con polvo de alúmina de 0.3 y 0.05 micras; y aplicación de ultrasonido.

La microalga *Synechocystis sp.* PCC 6803 fue obtenida directamente del stock del grupo de investigación Interfibio en una etapa avanzada de crecimiento. Muestras de 0.4 ml de la solución de microalgas con densidad óptica de 0.7 (680nm) fueron instaladas en la superficie de los electrodos usando tubos de eppendorf de 0.5 ml (Figura 4). El tiempo de adsorción fue 24 horas, definido de acuerdo a experimentos consultados [21].

Figura 4. Adsorción de la microalga en los electrodos

Cultivo de *Synechocystis sp.* PCC 6803.



Adsorción de la microalga



3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MICROALGAS COMPARANDO UNA SUPERFICIE MODIFICADA Y NO MODIFICADA

El análisis de la modificación se inició con ferrocianuro de potasio; reconocido como mediador que favorece la transferencia de electrones y sus picos de óxido-reducción definidos son útiles para cuantificar los cambios en la superficie e identificar transferencia de electrones. Posteriormente, se evaluó la transferencia directa de electrones (sin mediador) usando las soluciones de PBS y de medio BG-11.

3.2.1 Preparación de soluciones para el análisis electroquímico

3.2.1.1 Solución de ferrocianuro de potasio. Para empezar, se prepararon 100 ml de ferrocianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ 1.0 mM en 1 M de nitrato de potasio KNO_3 . Primero, se agregó el KNO_3 (10,11 g) en un matraz volumétrico de 100 ml y 30 ml de agua mili-Q (desionizada) para disolverlo, luego se agregó el $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,0329 g) y se llenó hasta 100 ml con agua mili-Q. Si era necesaria más solución para las pruebas se preparaban 100 ml nuevamente.

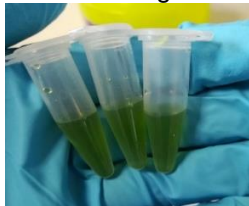
3.2.1.2 Solución de PBS. La solución PBS se preparó de la siguiente manera, para el tampón PBS, se tomó un sobre de PBS pH 7.4 (PBS, P-5368, Sigma-Aldrich, EE. UU) y fue disuelto en un matraz aforado de 1 L, luego se agregó agua desionizada (mili-Q) hasta completar el volumen, este PBS se utilizó para todos los experimentos.

3.2.1.3 Solución de BG-11. Esta solución se preparó en una cabina de flujo laminar (misma usada para manipular las microalgas) con el fin de no contaminar el medio BG-11. Para preparar la solución de agua desionizada suplementada con medio BG-11 al 2% se utilizó un matraz volumétrico de 100 ml y a continuación se agregaron 2 ml de solución de medio BG-11 (solución de cianobacteria de agua dulce BG-11 50x Sigma-Aldrich EE. UU) y 98 ml de agua desionizada. Si se necesitaba más solución para las pruebas se repetía este procedimiento.

3.2.1.4 Solución sobrenadante sin microalgas. Para complementar este análisis se realizó un experimento adicional con el propósito de identificar si los cambios resultantes en las superficies o una posible generación de corriente eran causados exclusivamente por las células de la solución de alga o por compuestos diferentes al microorganismo como el medio sobrenadante que componía la solución de alga. Para esto la solución de microalgas fue sometida a una centrifugación que separó las células de la solución de medio BG-11 que componía el cultivo del alga (solución sobrenadante). La centrifugación se hizo de la siguiente forma, se midió la DO de la solución de microalga en 0.7 (680 nm) y se centrifugaron 600 μ l de solución de alga a 1000 rpm durante 5 minutos usando una centrifuga de eppendorf de 1.5 ml. Luego en un eppendorf de 0.5 ml se pipetearon 0.4 ml de la solución sobrenadante obtenida libre de células; al final se repitió el proceso de adsorción (Figura 5).

Figura 5. Separación del cultivo en diferentes fases

Eppendorf con solución de microalga



Centrifugado de la solución de microalga y solución sobrenadante



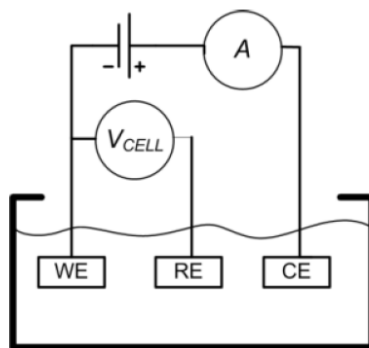
Adsorción del sobrenadante



3.2.1.5 Solución combinada para prueba de electroactividad. Este experimento adicional es una prueba de electroactividad para culminar el análisis y determinar definitivamente si la microalga podía realmente generar una corriente considerable en la superficie de los materiales. Para ello se preparó una nueva solución de 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ en 1 M de KNO_3 y se diluyó usando una solución de medio BG-11 al 2%, una solución similar fue utilizada para el estudio de la actividad electrogénica de *Synechocystis sp.* PCC 6803 [17].

3.2.2 Análisis electroquímico. Para realizar las mediciones se utilizó una celda electroquímica con una configuración de 3 electrodos (Figura 6), de trabajo (WE), contador (CE) y de referencia (RE) esta configuración es reconocida en el estudio de reacciones redox [3] [27]. En este caso, una celda de vidrio de 15 ml fue contenedora de los electrodos de trabajo, Oro, Platino y carbono vítreo (uno a la vez), electrodo de referencia de Ag/AgCl y electrodo contador, un alambre de Platino.

Figura 6. Configuración de 3 electrodos.



Fuente: FERRÉ, J. S. Electrogenic characterization and optimization of the cyanobacterium *Anabaena sp.* and construction of a Photovoltaic Microbial Fuel Cell, 2015 [3].

El equipo para aplicar las 3 técnicas de voltametría fue un potenciostato/galvanostato controlado con el software de sistema electroquímico de

propósito general (GPES). Para dar comienzo a las mediciones la celda fue llenada con la solución de ferrocianuro de potasio, el electrodo de trabajo fue el electrodo de trabajo modificado con alga y al completar las mediciones de éste el mismo electrodo sin modificar. Se aplicaron la voltametría cíclica (CV) y voltametría de barrido lineal (LSV) con velocidades de escaneo de 10 a 200 mV/s y rangos de potencial de 0 V a 0.7 V. La voltametría de pulso diferencial (DPV) con velocidades de escaneo de 10 a 50 mV/s con amplitudes de modulación de 0.025 V, 0.06 V y 0.08 V, los rangos de potencial también fueron de 0 V a 0.7 V. Las técnicas se aplicaron para los 3 materiales y se realizaron 3 pruebas de cada CV, LSV y DPV de cada electrodo, primero modificado y después el no modificado. Esto fue importante para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

El montaje y la configuración de la celda electroquímica fue la misma de la Figura 6 para las mediciones con la solución PBS (pH=7.4) y después con solución de medio BG-11 (2%). Del mismo modo, el electrodo de trabajo fue el electrodo modificado con alga y después no modificado; partiendo de acá sólo se cambió la solución electroquímica de la celda para los demás experimentos. La Tabla 1 contiene el número total de pruebas realizadas.

Tabla 1. Número de pruebas realizadas

Superficie modificada		Superficie no modificada		Superficie con sobrenadante		Prueba de electroactividad	
3 materiales	27 pruebas	3 materiales	27 pruebas	3 materiales	18 pruebas	1 material	1 prueba
3 soluciones		3 soluciones		2 soluciones**		1 solución	
3 técnicas*		3 técnicas		3 técnicas		1 técnica***	

(*) No se utiliza el medio BG-11 porque su composición es similar al medio sobrenadante.

(**) Las 3 técnicas se aplicaron por triplicado.

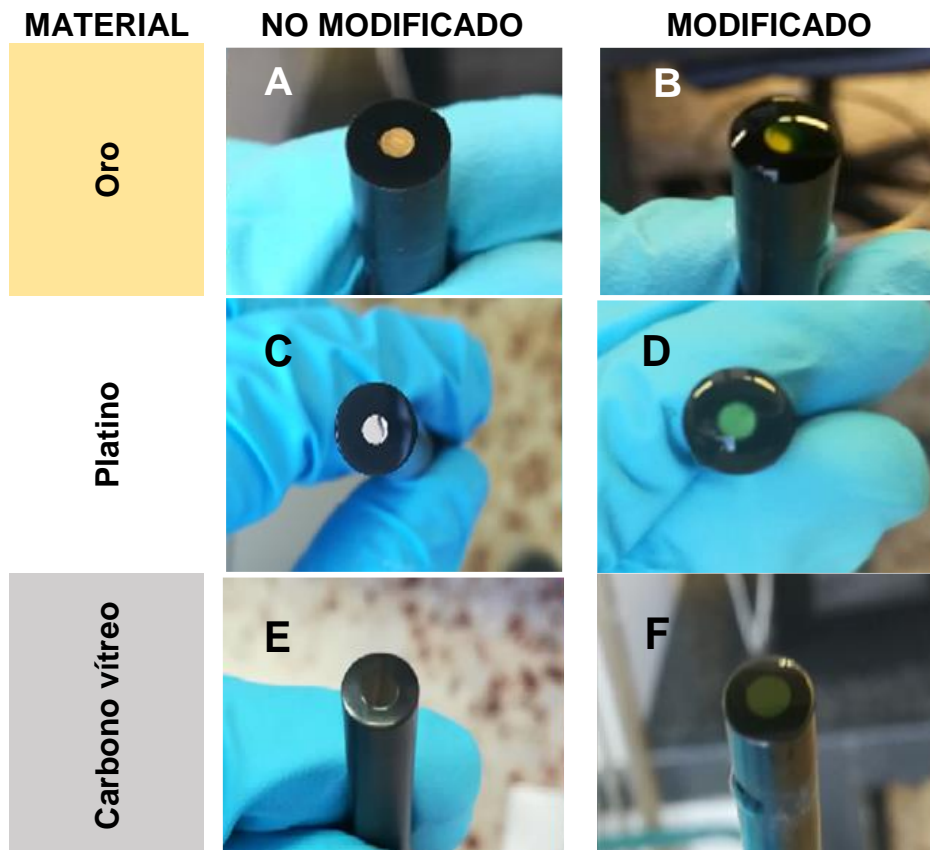
(***) Sólo se hizo una prueba, con 1 solución y 1 técnica (CV).

4. RESULTADOS

4.1 FIJACIÓN DE LA MICROALGA EN LOS MATERIALES

La adsorción de las microalgas en la superficie de los electrodos fue evidenciada mediante inspección óptica directa (organoléptica), dado que por las dimensiones de los electrodos no fue posible realizar observaciones en microscopio. En la Figura 7 se presentan imágenes comparativas de los electrodos modificados con microalga y sin modificar. En la presentación de los resultados se usó el color amarillo para el Oro, blanco para el Platino y gris para el carbono vítreo.

Figura 7. Vista de los 3 electrodos



El color verde es característico de las microalgas y fue útil para afirmar si hubo o no una capa de algas adsorbida en la superficie del electrodo, sabiendo esto se analizó cada uno de los materiales. En el Oro la superficie limpia no modificada presenta el color dorado claro característico del material (Figura 7, A), la vista del electrodo de oro modificado con alga tuvo una capa adsorbida y se confirmó que hay un cambio en la superficie porque tiene un color verde tenue (Figura 7, B).

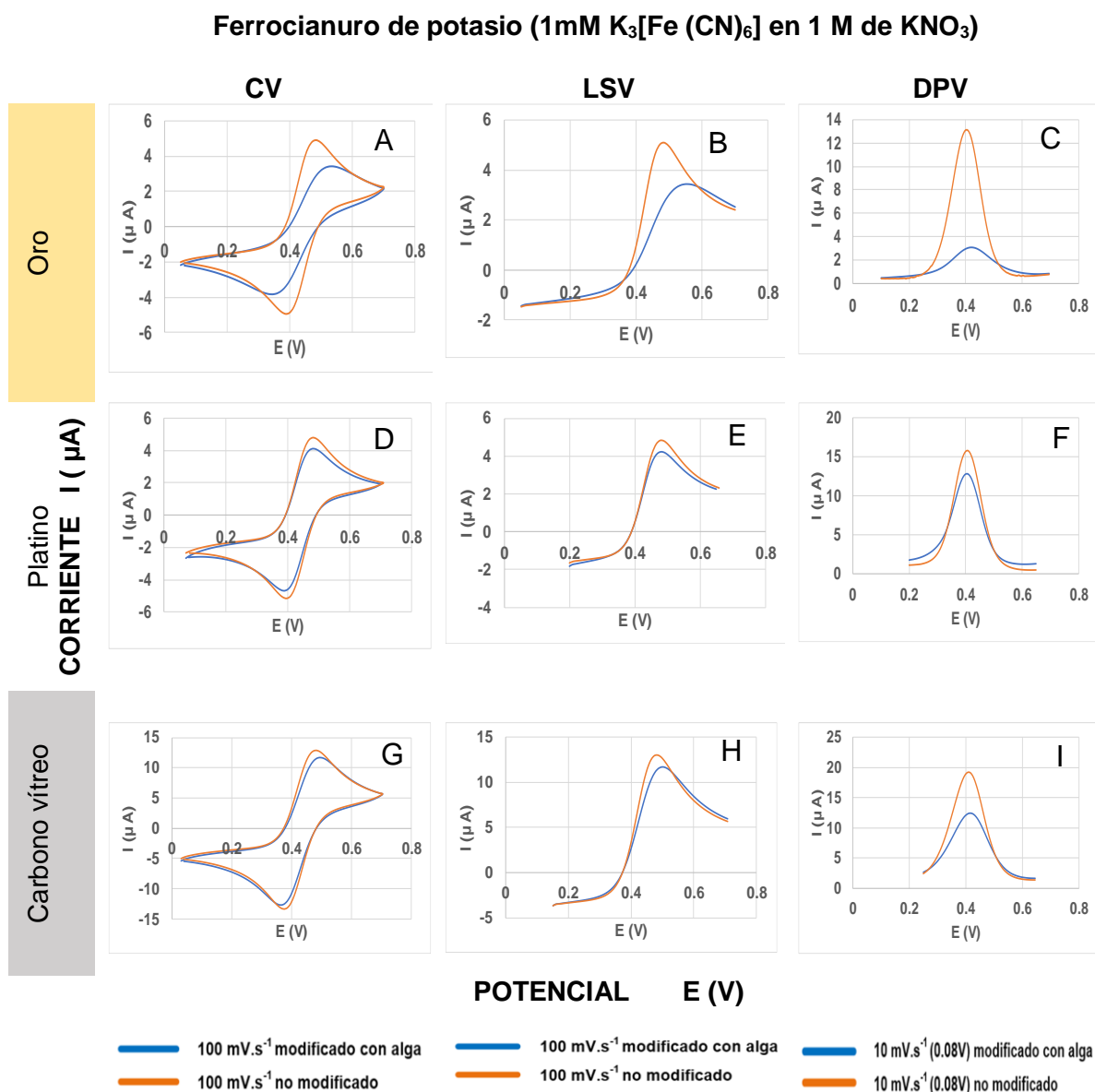
El electrodo de platino tiene un color plateado brillante en su superficie (Figura 7, C) que fue útil para una mejor comparación y permitió ver una mayor diferencia entre las 2 superficies, el diámetro de la superficie disponible es el mismo que el electrodo de Oro. La vista del electrodo de platino modificado con alga mostró una capa húmeda con un color verde característico de las células; hubo adsorción y células sobre la superficie (Figura 7, D).

El electrodo de carbono vítreo tiene un tono oscuro característico que no permitió ver grandes diferencias de color entre las 2 superficies. El electrodo no modificado (Figura 7, E) muestra un área superficial más grande disponible para la reacción y la adsorción en comparación con los otros electrodos (oro y platino). La superficie modificada con alga tuvo una fina capa adsorbida que tiene un ligero cambio de color, esta pudo contener algunas células adheridas (Figura 7, F).

4.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS MICROALGAS COMPARANDO UNA SUPERFICIE MODIFICADA Y NO MODIFICADA

4.2.1 Mediciones en celda electroquímica con ferrocianuro de potasio. La solución de ferrocianuro de potasio permitió evidenciar diferencias entre las 2 superficies para todas las velocidades de escaneo (10 – 200 mV/s), los gráficos resultantes con todos los escaneos de las 3 técnicas de voltametría están en el Anexo B. A continuación, se presenta un consolidado de los resultados a 100 mV/s.

Figura 8. Comparación entre la superficie modificada con alga y no modificada en ferrocianuro de potasio a una velocidad de escaneo de 100 mV/s



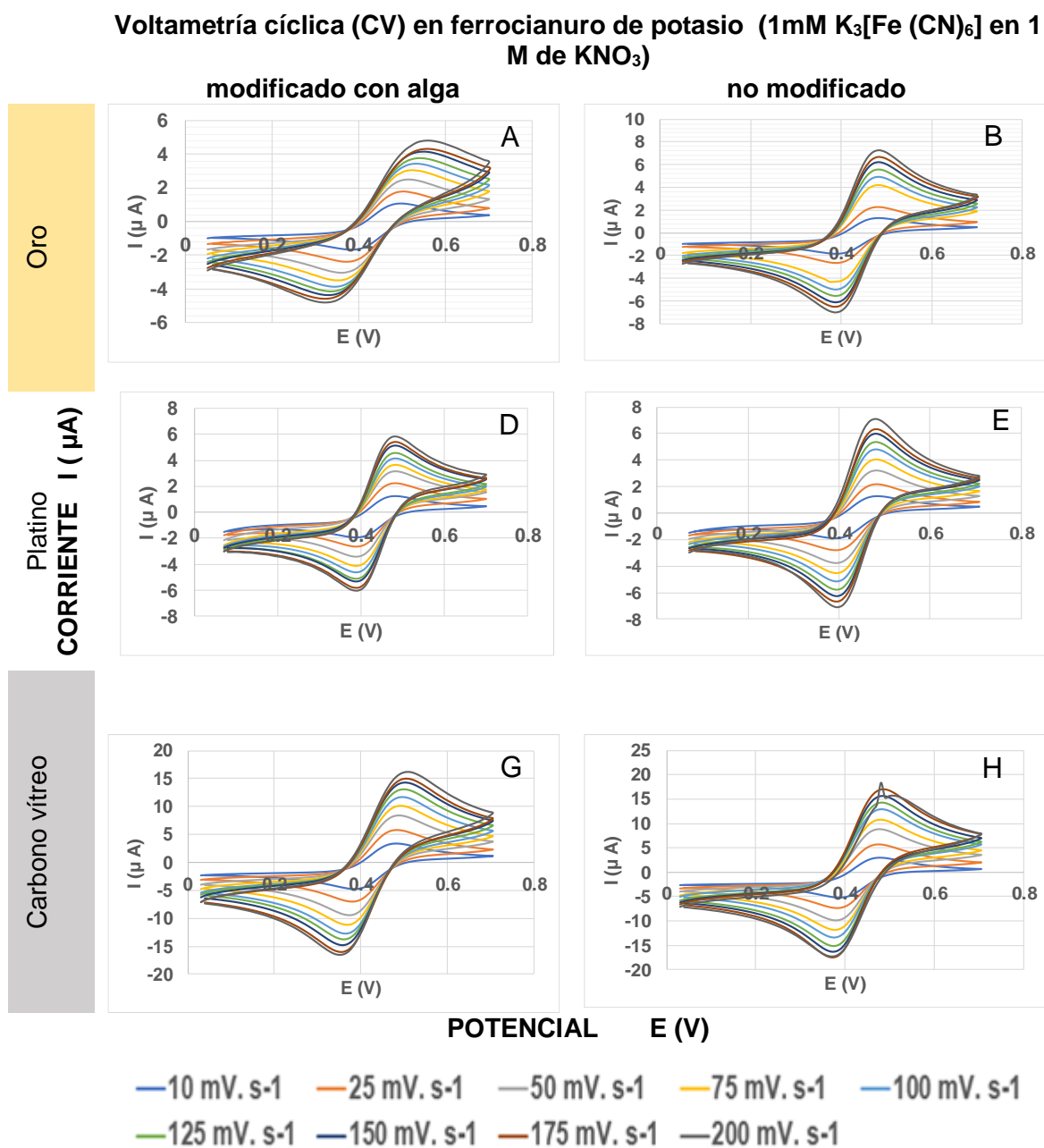
El resultado del análisis electroquímico fueron los voltamogramas de las técnicas aplicadas CV, LSV y DPV. El eje horizontal representa el potencial o voltaje aplicado (E) en un rango de 0.05 V a 0.7 V y el eje vertical es la intensidad o corriente resultante (I). La curva azul es la superficie modificada con alga y la curva color naranja es la superficie del electrodo no modificada.

La diferencia entre las alturas y los valores de corriente entre las 2 curvas en todos los casos permite afirmar que hubo adsorción, es decir efectivamente hubo una modificación considerable en las superficies de los electrodos. Los picos de corriente fueron mayores para la superficie no modificada que para la superficie modificada con alga en las 3 técnicas aplicadas (CV,LSV y DPV) y para los 3 materiales (Figura 8), esto sugiere que no hubo generación de corriente (transferencia de electrones) de la microalga adsorbida en ninguno de los casos. Sabiendo esto, además se pudo ver que las diferencias entre los picos de corriente fueron mayores para el electrodo de Oro (Figura 8- A,B,C), también que los valores de corriente son muy similares entre Oro y Platino. El electrodo de carbono vítreo obtuvo valores considerablemente diferentes a los otros materiales (Figura 8- G,H,I).

En el ferrocianuro de potasio no hubo generación de corriente sobre los materiales esto se podría explicar diciendo que las células que se adsorbieron con el propósito de establecer una transferencia directa entre el microorganismo y el material por el contrario pudieron causar una interferencia que estuvo impidiendo una generación de corriente que fuera considerable.

Adicionalmente este análisis de la modificación de las superficies de los electrodos tenía como propósito identificar cuál de las técnicas definió mejor la modificación. En esta investigación la voltametría cíclica (CV) proporcionó toda la información necesaria para un análisis electroquímico completo. De los CV aplicados en este análisis se estimaron los picos de oxidación y reducción (amperios), la separación de los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE) y el área superficial efectiva (cm^2). Para ese propósito se utilizó la información presentada en la Figura 9, son los mismos resultados del consolidado de la Figura 8 pero esta vez se incluyeron todas las velocidades de escaneo, desde 10 mV/s (curva más baja) hasta el último escaneo 200 mV /s (curva más alta).

Figura 9. Comparación entre la superficie modificada con alga y no modificada en ferrocianuro de potasio.



Para completar el análisis electroquímico a partir de los valores de la Figura 9 se estimaron los valores de separación entre picos de potencial anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}).

Tabla 2. Comparación de separación entre picos de potencial para los 3 electrodos.

Material	Superficie	Potencial de pico anódico		Potencial de pico catódico		Separación entre picos		
		E _{pa} (V)	σ	E _{pc} (V)	σ	ΔE (V)	σ	ΔE (mV)
Oro	modificado con alga	0.529	0.022	0.347	0.021	0.182	0.03	182 ± 0.03
	no modificado	0.484	0.000	0.388	0.000	0.096	0.00	96 ± 0.00
Platino	modificado con alga	0.484	0.000	0.385	0.000	0.099	0.00	99 ± 0.00
	no modificado	0.480	0.000	0.396	0.000	0.084	0.00	84 ± 0.00
Carbono vítreo	modificado con alga	0.494	0.010	0.366	0.011	0.128	0.01	128 ± 0.01
	no modificado	0.480	0.000	0.375	0.004	0.105	0.00	105 ± 0.00

Lo importante de la Tabla 2 es identificar tendencias y en este caso la separación entre picos (ΔE) es mayor para la superficie modificada con alga en todos los casos. Esta tendencia representa un comportamiento similar en los 3 materiales, lo que le da consistencia al análisis. En este caso a mayor separación entre picos de potencial son menores los picos de corriente (Figura 9). Para un análisis electroquímico teóricamente la separación máxima ΔE ideal es 59 mV [3], en este caso fue mayor en todos los materiales desde 84 mV hasta 182 mV, sin embargo puede suceder frecuentemente, la mayoría de las veces tiene que ver con la limpieza del electrodo.

Para definir qué material adsorbió mejor las células, con los resultados de los CV (Figura 9) se calculó el área de superficie efectiva de los materiales y el número de células adsorbidas, los resultados se presentan en la Tabla 3.

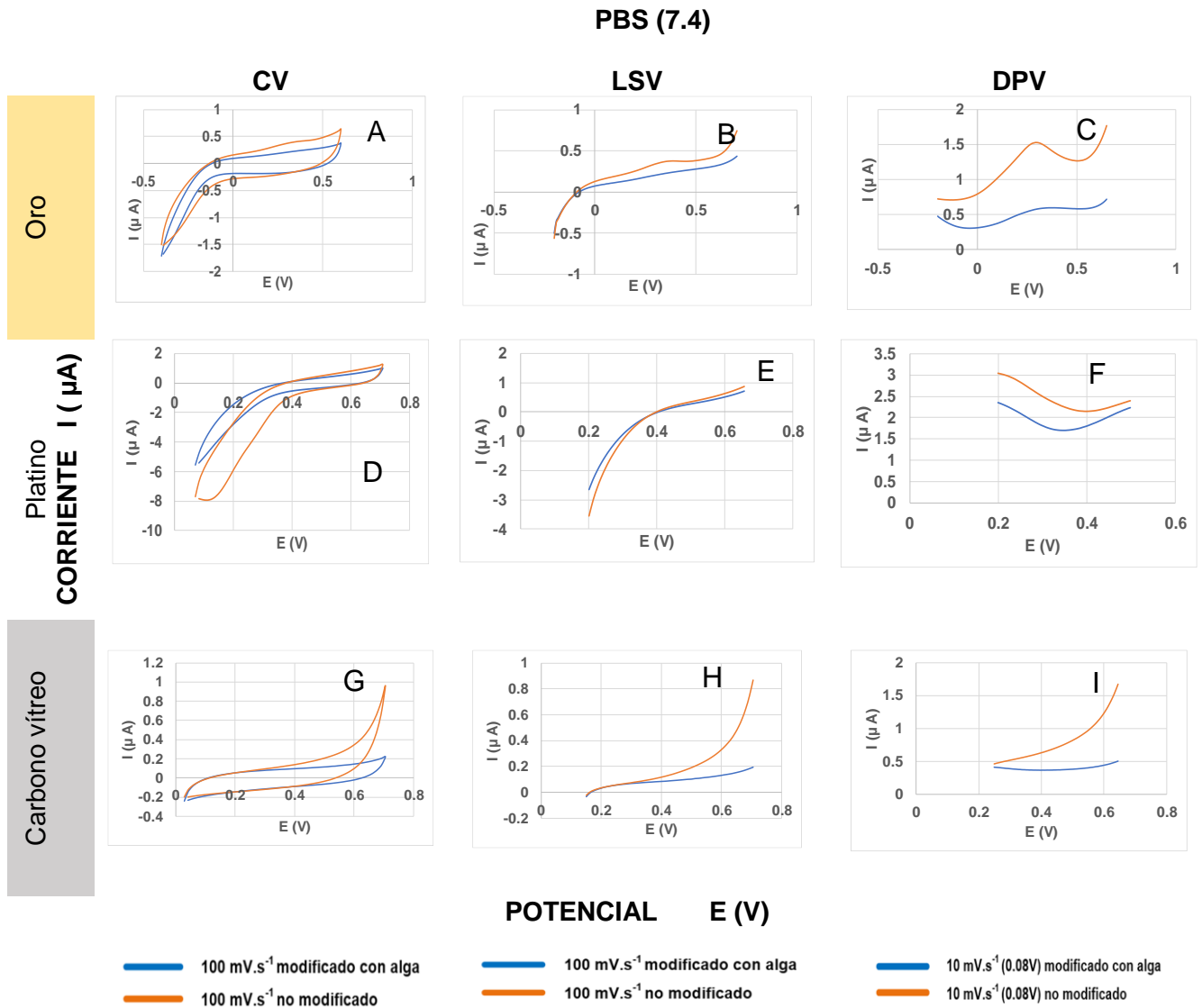
Tabla 3. Estimación de área superficial efectiva y número de células adsorbidas.

	Área superficial (cm ²)			Número de células adsorbidas
	modificado con alga	no modificado	diferencia	
Oro	0.0135	0.0270	0.0135	3.50E+04
Platino	0.0135	0.0270	0.0135	3.50E+04
Carbono vítreo	0.0539	0.0539	0.00	0.00

Fue posible calcular el área superficial efectiva de cada electrodo y comparar la superficie modificada con alga y la no modificada cuantificando la diferencia entre ellas en cm². También estimar el número aproximado de células que fueron adsorbidas en la superficie. El área superficial efectiva se calculó usando la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 1) y se explica paso a paso en el Anexo C, el diámetro de la microalga es aproximadamente de 2.8 a 7.5 μm, se supuso 7 μm por lo tanto el área de 1 célula es 3.85E-7 cm² y dividiendo la diferencia de áreas superficiales en el área de 1 célula se obtuvo el número de células adsorbidas. Este método demostró que hubo adsorción en la superficie de los electrodos de Oro y Platino, más de treinta mil células fueron adsorbidas (Tabla 3); es el 50% de la superficie disponible. Por el contrario, aparentemente no hubo adsorción de células en el carbono vítreo.

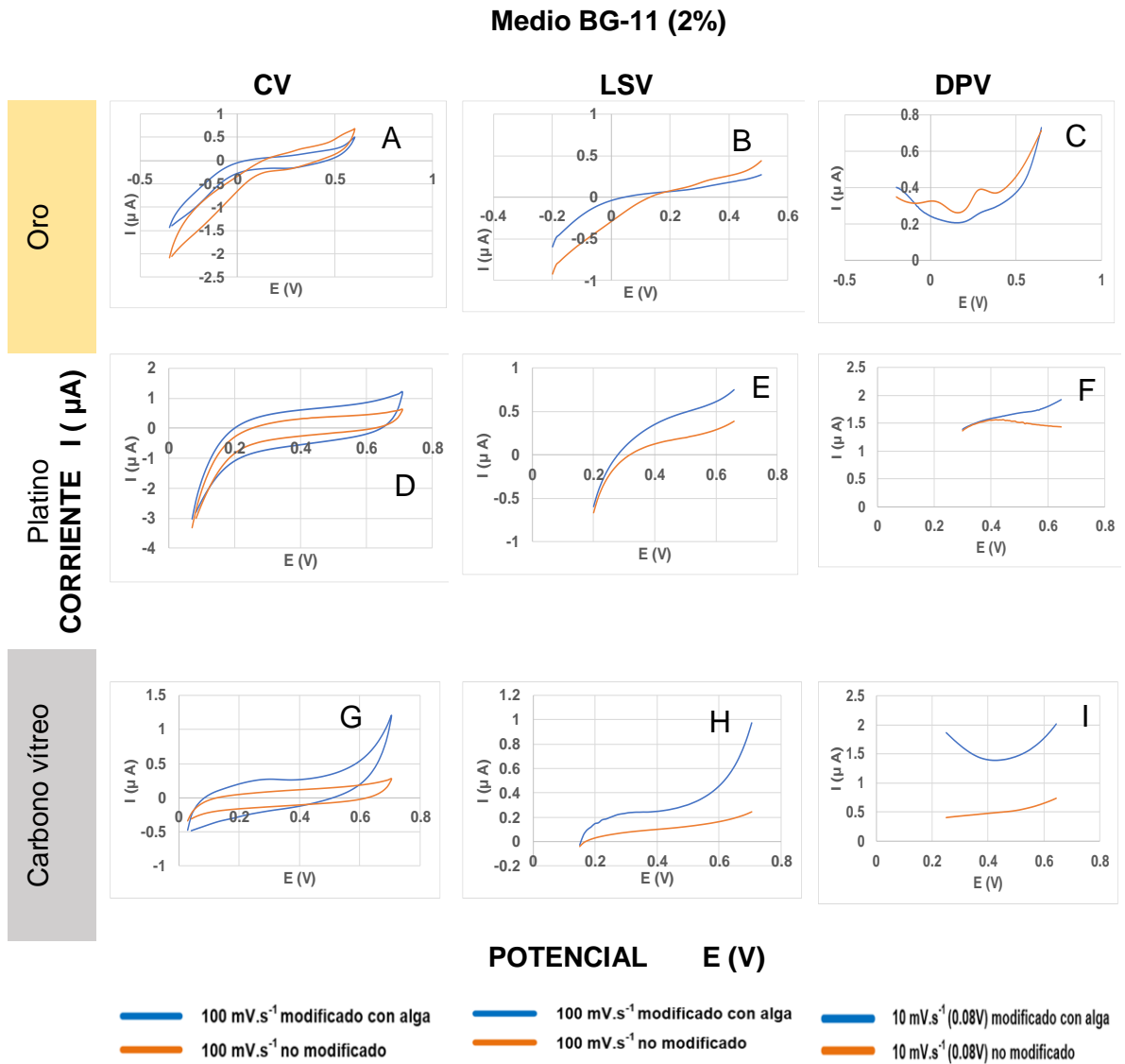
4.2.2 Mediciones en celda electroquímica con PBS y BG-11. Para la observación de transferencia directa de electrones se obtuvieron los voltamogramas en las soluciones PBS y de medio BG-11. La forma de las curvas es adecuada y similar a la trayectorias de oxidación y reducción que generalmente se obtienen de otros estudios [3]. Estas soluciones no presentan picos definidos para cuantificar resultados, pero fueron útiles para definir si hubo o no transferencia directa de electrones comparando las trayectorias y valores de corriente que alcanzan las curvas obtenidas. Los resultados para todos los escaneos (10 a 200 mV/s) y de las 3 técnicas (CV, LSV y DPV) en las soluciones PBS y BG-11 están en el Anexo D. A continuación, se presenta un consolidado los resultados en gráficos comparativos a la velocidad de escaneo promedio de 100 m V/s.

Figura 10. Comparación entre la superficie modificada con alga y la no modificada en solución PBS a una velocidad de escaneo de 100 m V /s.



Las mediciones de la Figura 10 muestran que las curvas de los electrodos con la superficie modificada con alga (azul) en todos los casos siempre están por debajo de la superficie no modificada (naranja). Es decir, en la solución PBS no hubo una liberación de electrones por parte de la microalga que permitiera establecer una transferencia directa de electrones entre el microorganismo y el material.

Figura 11. Comparación entre la superficie modificada con alga y la no modificada en solución del medio BG-11 a una velocidad de escaneo de 100 m V/s.

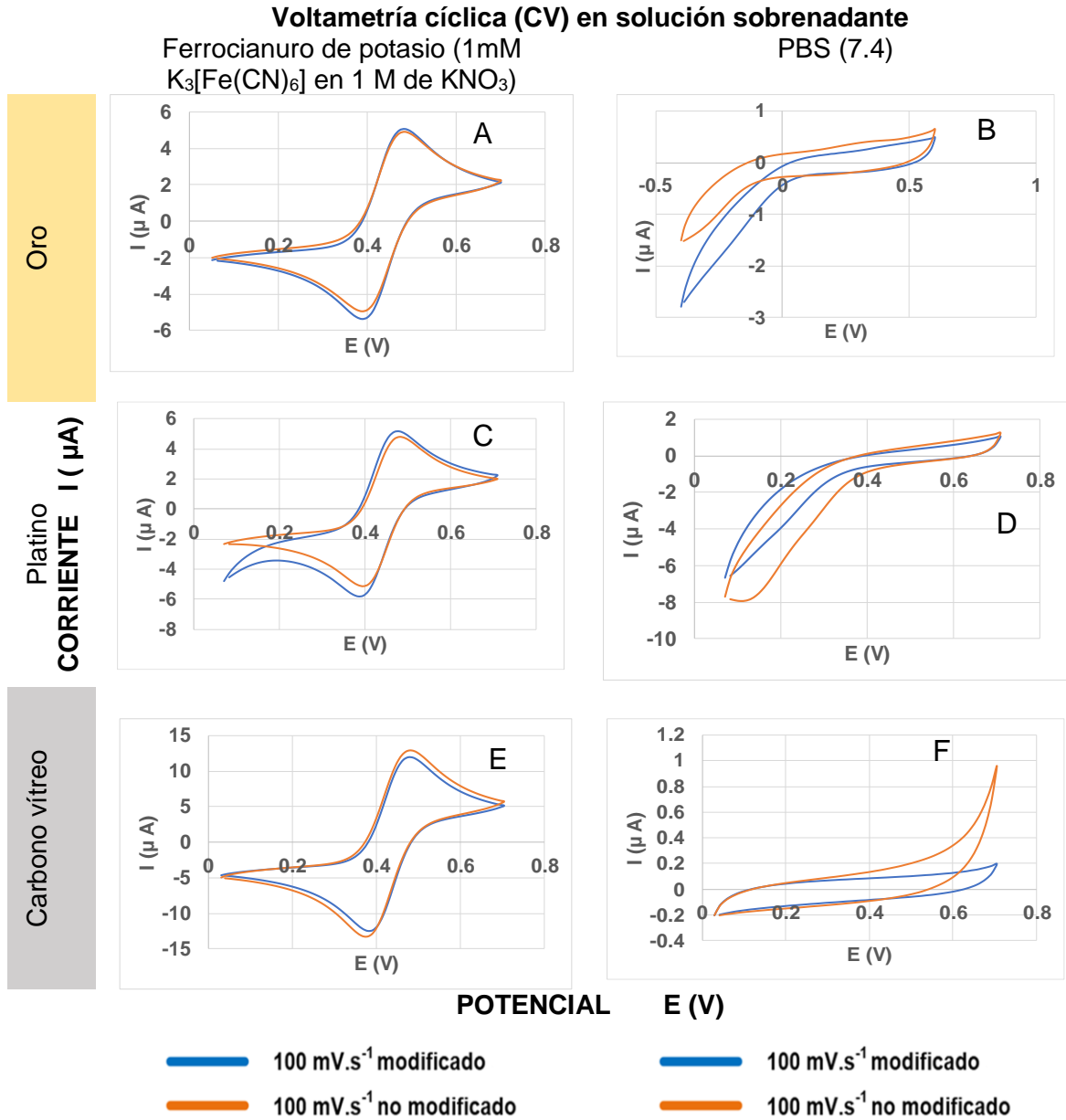


En el electrodo de Oro (Figura 11-A,B,C) no hubo liberación de electrones o transferencia de ellos entre el material y la microalga, la curva modificada con alga (azul) estuvo por debajo en valores de corriente. Para esta prueba, en los resultados del medio BG-11 hubo diferencias respecto a los resultados anteriores para los electrodos de Platino y carbono vítreo. Las diferencias estuvieron en que la superficie modificada con alga (azul) sí estuvo por encima de la no modificada en

esta ocasión; lo que indica que hay una aparente transferencia directa de electrones. La corriente generada no fue muy grande, pero hubo diferencias. Sin embargo, este resultado no fue concluyente porque no se presentó en los casos anteriores; para definir este resultado se aplicó una prueba final de electroactividad presentada en la sección 4.2.4.

4.2.3 Mediciones de la solución sobrenadante sin microalgas. La modificación con la solución sobrenadante tampoco tuvo electroactividad o generó una corriente considerable en la superficie de los electrodos y no causó grandes cambios a la superficie del electrodo (Figura 12). La curva de la superficie modificada sigue estando por debajo en valores de corriente (amperios). Esto permitió afirmar que la modificación de la superficie de los materiales y la posible generación de corriente sólo pudo ser causada por las células presentes en la biopelícula del alga cuando se adhirieron a los materiales.

Figura 12. Superficie modificada con solución sobrenadante.



La Tabla 4 muestra que los valores de ΔE (mV) fueron muy cercanos o iguales para la comparación entre superficies. Esto explica que el sobrenadante al ser adsorbido no modificó la superficie de los electrodos.

Tabla 4. Comparación de potencial entre picos de superficie modificada con solución sobrenadante.

Material	Superficie	Potencial de pico anódico		Potencial de pico catódico		Separación entre picos		
		Epa (V)	σ	Epc (V)	σ	ΔE (V)	σ	ΔE (m V)
Oro	modificado	0.484	0.000	0.388	0.000	0.096	0.00	96 \pm 0.00
	no modificado	0.484	0.000	0.388	0.000	0.096	0.00	96 \pm 0.00
Platino	modificado	0.480	0.000	0.384	0.000	0.096	0.00	96 \pm 0.00
	no modificado	0.480	0.000	0.396	0.000	0.084	0.00	84 \pm 0.00
Carbono vítreo	modificado	0.480	0.006	0.378	0.0041	0.102	0.01	102 \pm 0.01
	no modificado	0.480	0.000	0.375	0.004	0.105	0.00	105 \pm 0.00

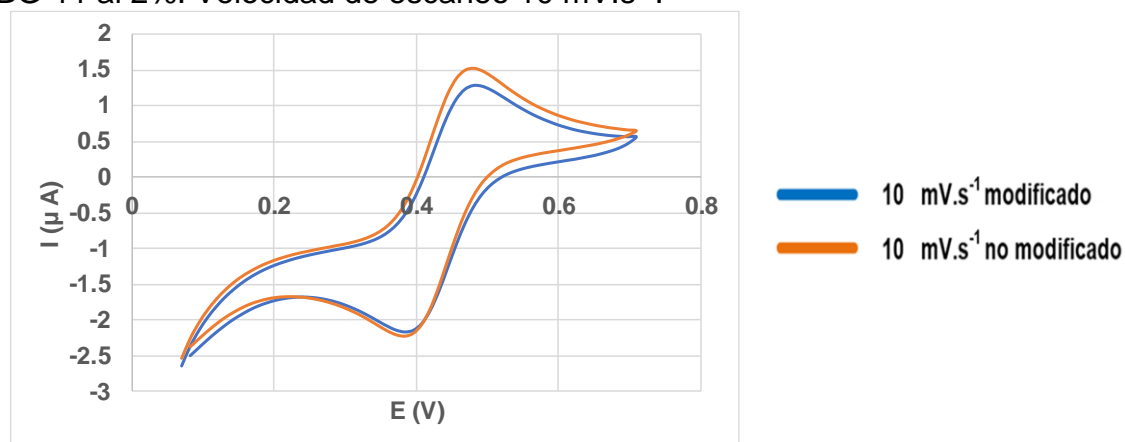
Se verificó que no hubo células adheridas y tampoco cambios en el área superficial, fueron iguales (Tabla 5) los cálculos paso a paso están en el Anexo C. Esto confirmó que cuando se modificó la superficie por adsorción del alga efectivamente se adhirieron únicamente las células.

Tabla 5. Estimación de área superficial efectiva de la modificación con solución sobrenadante.

	Área superficial (cm ²)			Número de células adsorbidas
	modificado	no modificado	diferencia	
Oro	0.0270	0.0270	0.000	0.00
Platino	0.0270	0.0270	0.000	0.00
Carbono vítreo	0.0539	0.0539	0.000	0.00

4.2.4 Prueba de electroactividad. Este experimento fue necesario para definir un resultado consistente respecto al Platino y carbono vítreo. El Platino adsorbió la microalga y presentó una aparente liberación de electrones (Figura 11-D,E,F) en medio BG-11. El comportamiento de los 3 electrodos fue similar en todos los resultados excepto en medio BG-11, por esta razón este experimento final para definir la electroactividad se realizó sólo con el electrodo de Platino.

Figura 13. CV- Comparación entre la superficie del electrodo de Platino modificada con algas y no modificada en ferrocianuro de potasio diluido en solución de medio BG-11 al 2%. Velocidad de escaneo $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Con la solución electroquímica de ferrocianuro de potasio se definieron picos de oxidación y reducción que permitieron un análisis más preciso y si hubo una generación de corriente considerable o liberación de electrones se debió apreciar con la adicional presencia del medio BG-11. La velocidad de escaneo baja de 10 mV/s tomó mucho más tiempo en realizar, pero fue indicada para precisar diferencias entre picos de corriente así fuesen mínimas. La Figura 13 muestra que no hubo una generación de corriente considerable para el Platino en presencia de la microalga, esto permitió concluir el mismo resultado para todos los materiales. *Synechocystis sp.* PCC 6803 no tuvo una transferencia de electrones cuando fue adsorbida sobre los materiales.

5. CONCLUSIONES

La adsorción simple fue efectiva como método de fijación del alga a la superficie de los electrodos, en primera medida se observaron modificaciones de color y cuando se realizó el análisis electroquímico los voltamogramas presentaron diferencias apreciables (1 a 2 μA) entre las curvas de superficie no modificada y la modificada con alga en los materiales estudiados; lo que permitió identificar adsorción de células.

La cepa seleccionada *Synechocystis sp.* PCC 6803 no mostró generación de corriente o transferencia de electrones en las soluciones de Ferrocianuro de Potasio, PBS y en del medio BG-11 cuando se expuso a los tres materiales (Oro, Platino y carbono vítreo). Hubo una modificación física en la superficie y células adsorbidas, pero no hubo liberación de electrones.

6. RECOMENDACIONES

- A pesar de que no hubo transferencia de electrones el Oro y el Platino dieron indicios de biocompatibilidad con la microalga para desarrollar biopelículas en su superficie. Sería interesante realizar las mediciones con otras especies de microalga que también tengan propiedades electrogénicas y evaluar si hay transferencia de electrones.
- Evaluar la transferencia de electrones de las microalgas modificando primero las condiciones de luz y luego el suministro de alimento para el microorganismo.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- [1]. MCCORMICK, Alistair, *et al.* Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 2015, Vol. 8, no. 4, p. 1092-1109.
- [2]. BARDONE, E, *et al.* Exoelectrogenic Activity of a Green Microalgae, *Chlorella vulgaris*, in a Bio-Photovoltaic Cells (BPVs). *Chemical Engineering Transactions*, 2014, Vol. 38, p. 523-528.
- [3]. FERRÉ, Jordi. Electrogenic characterization and optimization of the cyanobacterium *Anabaena sp.* and construction of a Photovoltaic Microbial Fuel Cell. *Nanoscience, Materials and Processes*, 2015.
- [4]. MCCORMICK, Alistair, *et al.* Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system. *Energy Environmental Science*, 2011, Vol 4, p. 4699.
- [5]. SCHNEIDER, Kenneth, *et al.* An investigation of anode and cathode materials in photomicrobial fuel cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016, Vol. 374, no. 2061, p. 20150080.
- [6]. GORBY, Yuri, *et al.* Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, Vol. 103, no. 30, p. 11358-11363.

- [7]. MARUTHUPANDY, Muthuchamy, *et al.* Preparation and Exploration on the Electrochemical Behavior of Nickel Oxide Nanoparticles Coated Bacterial Nanowires. *Journal of Cluster Science*, 2018, Vol. 29, no. 3, p. 483-492.
- [8]. LEE, Duu, *et al.* Microalgae–microbial fuel cell: A mini review. *Bioresource Technology*, 2015, Vol. 198, p. 891-895.
- [9]. CHENG, Lihua, *et al.* Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 2006, Vol. 50, no. 3, p. 324-329.
- [10]. VENKATA Subhash, *et al.* Microalgae mediated bio-electrocatalytic fuel cell facilitates bioelectricity generation through oxygenic photomixotrophic mechanism. *Bioresource Technology*, 2013, Vol. 136, p. 644-653.
- [11]. BRADLEY, Robert, *et al.* Biological photovoltaics: intra- and extra-cellular electron transport by cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 2012. Vol. 40, p.1302–1307.
- [12]. PISCIOTTA, Jhon, *et al.* Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria. *Plos One*, 2010, Vol.5, no.4, p. 10821.
- [13]. ZHAO, Feng, *et al.* Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society Reviews*, 2009, Vol 38, no.7, p. 1926.
- [14]. CHANDRA, Rashmi, *et al.* Mixotrophic operation of photo-bioelectrocatalytic fuel cell under anoxygenic microenvironment enhances the light dependent bioelectrogenic activity. *Bioresource Technology*, 2012, p. 46–56.

- [15]. WANG, Joseph. Analytical Electrochemistry, Third Edition, 2006, p. 1-250.
- [16]. BUSALMEN, Juan Pablo, *et al.* Spectroelectrochemical Examination of the Interaction between Bacterial Cells and Gold Electrodes Spectroelectrochemical Examination of the Interaction between Bacterial Cells and Gold Electrodes. Society, 2007, Vol.23, no.2, p. 6459–6466.
- [17]. MARSILI, Enrico, *et al.* Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 2008, Vol.74, no.23, p.7329–7337.
- [18]. Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles — Department of Chemical Engineering and Biotechnology. [En línea]. (Recuperado en 26 septiembre 2017.) Disponible en <https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles>. (Accessed: 26th September 2017)
- [19]. CHENG, Shaoan, *et al.* Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. Environ. Sci. Technol, 2009, Vol. 43, p. 3953–3958.
- [20]. ARRIGO, Rosa. The Characterization of Electrochemical Surface Research Lines, 2014, p.46.
- [21]. BOMBELLI, Paolo, *et al.* Quantitative analysis of the factors limiting solar power transduction by *Synechocystis* sp. PCC 6803 in biological photovoltaic devices. Energy & Environmental Science, 2011, Vol.4, no.11, p. 4690–4698.
- [22]. THORNE, Rebecca, *et al.* Iron reduction by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Bioelectrochemistry, 2015, Vol.105, p. 103–109.

- [23]. BRADLEY, Robert, *et al.* Terminal oxidase mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 show increased electrogenic activity in biological photo-voltaic systems. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, Vol.15, no.32, p. 13611–13618.
- [24]. THORNE, Rebecca. *Bio-Photo-Voltaic Cells (Photosynthetic- Microbial Fuel Cells)*. University of Bath, 1997, Vol. 1085, no.29, p. 1–26.
- [25]. BRYANT, Donald, *et al.* The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, 1979, Vol.123, no.2, p. 113–127.
- [26]. ROSENBAUM, Miriam, *et al.* Photomicrobial solar and fuel cells. *Electroanalysis*, 2010, Vol.22, no 7-8, 844–855.
- [27]. CEREDA, Angel, *et al.* A bioelectrochemical approach to characterize extracellular electron transfer by *synechocystis* sp. PCC6803. *Plos One*, 2014, Vol.9, no.3, p. 1–8.
- [28]. THORNE, Rebecca, *et al.* Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, Vol.21, no.44, p.18055.
- [29]. MADIRAJU, Kartik, *et al.* Carbon neutral electricity production by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 2012, Vol.110, p.214–218.

BIBLIOGRAFÍA

ARRIGO, Rosa. The Characterization of Electrochemical Surface Research Lines, 2014, p.46.

BARDONE, E, et al. Exoelectrogenic Activity of a Green Microalgae, *Chlorella vulgaris*, in a Bio-Photovoltaic Cells (BPVs). Chemical Engineering Transactions, 2014, Vol. 38, p. 523-528.

BOMBELLI, Paolo, et al. Quantitative analysis of the factors limiting solar power transduction by *Synechocystis* sp. PCC 6803 in biological photovoltaic devices. Energy & Environmental Science, 2011, Vol.4, no.11, p. 4690–4698.

BRADLEY, Robert, et al. Terminal oxidase mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 show increased electrogenic activity in biological photo-voltaic systems. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013, Vol.15, no.32, p. 13611–13618.

BRADLEY, Robert, et al. Biological photovoltaics: intra- and extra-cellular electron transport by cyanobacteria. Biochemical Society Transactions, 2012. Vol. 40, p.1302–1307.

BRYANT, Donald, et al. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. Archives of Microbiology, 1979, Vol.123, no.2, p. 113–127.

BUSALMEN, Juan Pablo, et al. Spectroelectrochemical Examination of the Interaction between Bacterial Cells and Gold Electrodes Spectroelectrochemical Examination of the Interaction between Bacterial Cells and Gold Electrodes. Society, 2007, Vol.23, no.2, p. 6459–6466.

CEREDA, Angel, et al. A bioelectrochemical approach to characterize extracellular electron transfer by *synechocystis* sp. PCC6803. *Plos One*, 2014, Vol.9, no.3, p. 1–8.

CHANDRA, Rashmi, et al. Mixotrophic operation of photo-bioelectrocatalytic fuel cell under anoxygenic microenvironment enhances the light dependent bioelectrogenic activity. *Bioresource Technology*, 2012, p. 46–56.

CHENG, Lihua, et al. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 2006, Vol. 50, no. 3, p. 324-329.

CHENG, Shaoan, et al. Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol*, 2009, Vol. 43, p. 3953–3958.

FERRÉ, Jordi. Electrogenic characterization and optimization of the cyanobacterium *Anabaena* sp . and construction of a Photovoltaic Microbial Fuel Cell. *Nanoscience, Materials and Processes*, 2015.

GORBY, Yuri, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, Vol. 103, no. 30, p. 11358-11363.

LEE, Duu, et al. Microalgae–microbial fuel cell: A mini review. *Bioresource Technology*, 2015, Vol. 198, p. 891-895.

Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles — Department of Chemical Engineering and Biotechnology. [En línea]. (Recuperado en 26 septiembre 2017.) Disponible en <https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching->

notes/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles. (Accessed: 26th September 2017)

MADIRAJU, Kartik, et al. Carbon neutral electricity production by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 2012, Vol.110, p.214–218.

MARSILI, Enrico, et al. Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, Vol.74, no.23, p.7329–7337.

MARUTHUPANDY, Muthuchamy, et al. Preparation and Exploration on the Electrochemical Behavior of Nickel Oxide Nanoparticles Coated Bacterial Nanowires. *Journal of Cluster Science*, 2018, Vol. 29, no. 3, p. 483-492.

MCCORMICK, Alistair, et al. Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system. *Energy Environmental Science*, 2011, Vol 4, p. 4699.

MCCORMICK, Alistair, et al. Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 2015, Vol. 8, no. 4, p. 1092-1109.

PISCIOTTA, Jhon, et al. Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria. *Plos One*, 2010, Vol.5, no.4, p. 10821.

ROSENBAUM, Miriam, et al. Photomicrobial solar and fuel cells. *Electroanalysis*, 2010, Vol.22, no 7-8, 844–855.

SCHNEIDER, Kenneth, et al. An investigation of anode and cathode materials in

photomicrobial fuel cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016, Vol. 374, no. 2061, p. 20150080.

THORNE, Rebecca, et al. Iron reduction by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioelectrochemistry*, 2015, Vol.105, p. 103–109.

THORNE, Rebecca, et al. Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, Vol.21, no.44, p.18055.

THORNE, Rebecca. *Bio-Photo-Voltaic Cells (Photosynthetic- Microbial Fuel Cells)*. University of Bath, 1997, Vol. 1085, no.29, p. 1–26.

VENKATA Subhash, et al. Microalgae mediated bio-electrocatalytic fuel cell facilitates bioelectricity generation through oxygenic photomixotrophic mechanism. *Bioresource Technology*, 2013, Vol. 136, p. 644-653.

WANG, Joseph. *Analytical Electrochemistry*, Third Edition, 2006, p. 1-250.

ZHAO, Feng, et al. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society Reviews*, 2009, Vol 38, no.7, p. 1926.

ANEXOS

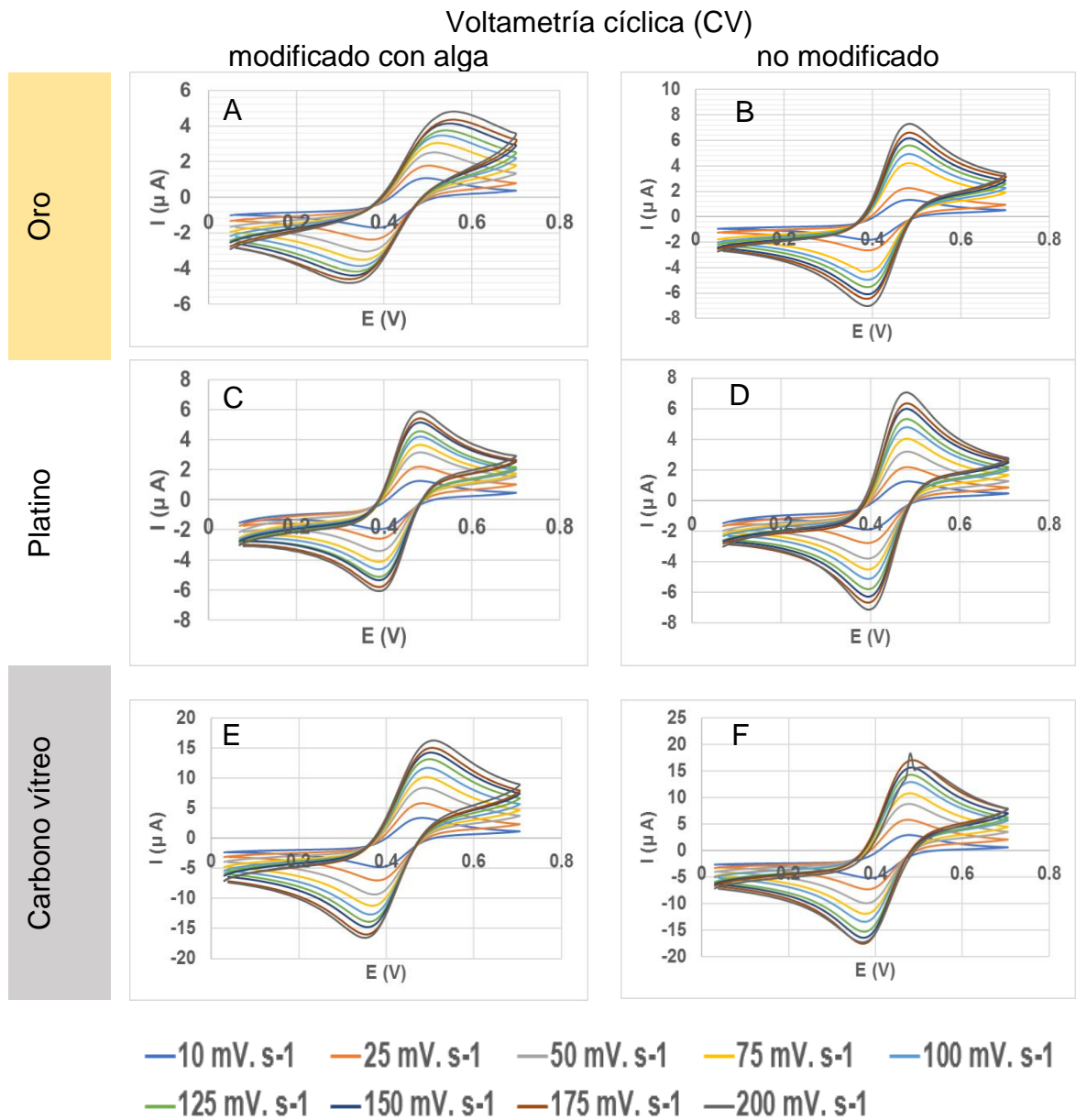
Anexo A. Materiales utilizados en celdas BPV.

Tabla A1. Resumen de materiales y potencias de salida de celdas BPV. Sistemas BPV discutidos, que enumera los parámetros relevantes con respecto a los electrodos, catalizadores, donantes de electrones / aceptores y rendimiento.

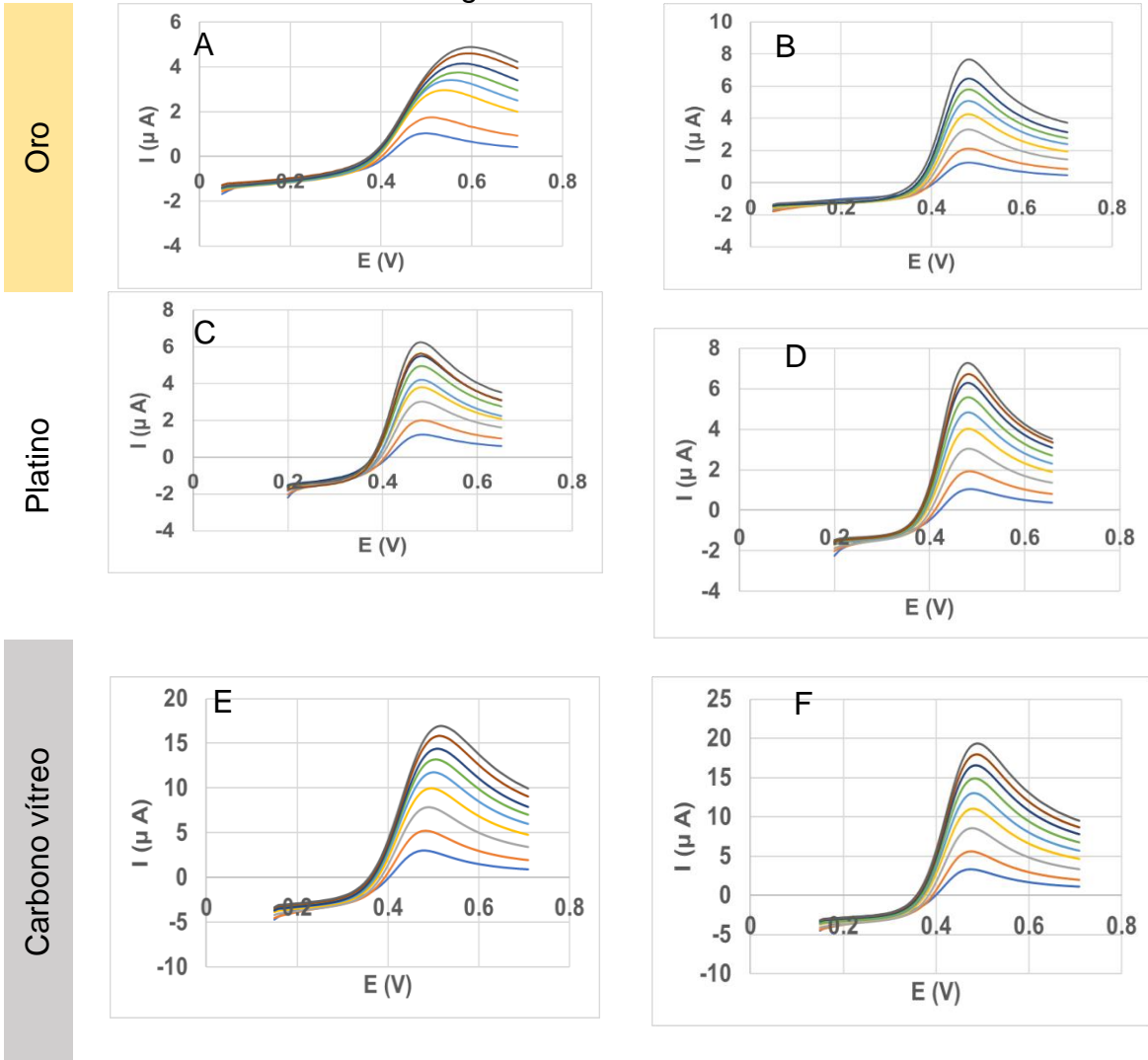
Estudio autor	material electrodo		geometría electrodo área (cm ²)		catalizador o electrodo donador/aceptor			densidad de potencia (m W.m ⁻²)	fuente
	ánodo	cátodo	ánodo	cátodo	ánodo	cátodo	separador		
Thorne <i>et al.</i>	fieltro de carbono	tela de carbón activado cátodo de aire	5	2.3	<i>C. vulgaris</i> con mezcla ferricianuro/ferrocianuro	ninguno	Nafion 115	0.04	[[28]]
Thorne <i>et al.</i>	FTO-recubierto TiO ₂ cerámico	tela de carbón activado cátodo de aire	3.9	2.3	<i>C. vulgaris</i> con mezcla ferricianuro/ferrocianuro	ninguno	Nafion 115	27.6	[[28]]
Thorne <i>et al.</i>	FTO- cristal recubierto	tela de carbón activado cátodo de aire	2.3	2.3	<i>C. vulgaris</i> con mezcla ferricianuro/ferrocianuro	ninguno	Nafion 115	24	[[28]]
Schneider <i>et al.</i>	FTO-recubierto TiO ₂ cerámico	tela de carbón activado cátodo de aire	3.9	2.3	<i>C. vulgaris</i> con mezcla ferricianuro/ferrocianuro	ninguno	Nafion 115	14.5	[[5]]
Madiraju <i>et al.</i>	fibra de carbono	fibra de carbono	15	15	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	ninguno	Nafion T117 y J-tela	0.268	[[29]]

Fuente: Schneider, K., Thorne, R. J. & Cameron, P. J. An investigation of anode and cathode materials in photomicrobial fuel cells. *Philos. Trans. A* 374, 20150080 (2016).

Anexo B. Resultados de técnicas de voltimetría CV, LSV y DPV en ferrocianuro de potasio



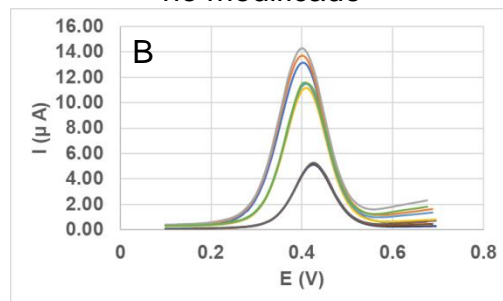
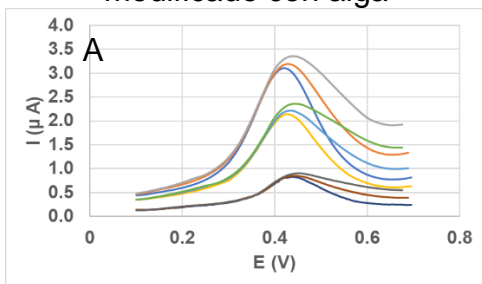
Voltametría de barrido lineal (LSV)
modificado con alga no modificado



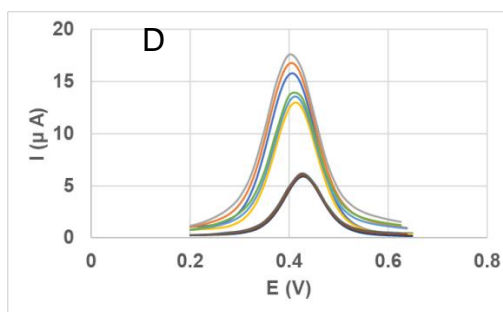
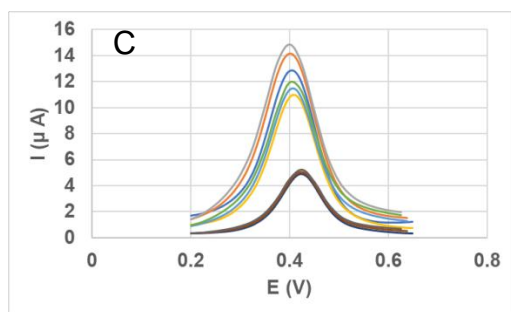
- 10 mV. s-1 — 25 mV. s-1 — 50 mV. s-1 — 75 mV. s-1 — 100 mV. s-1
— 125 mV. s-1 — 150 mV. s-1 — 175 mV. s-1 — 200 mV. s-1

Voltametría de pulso diferencial (DPV)
modificado con alga no modificado

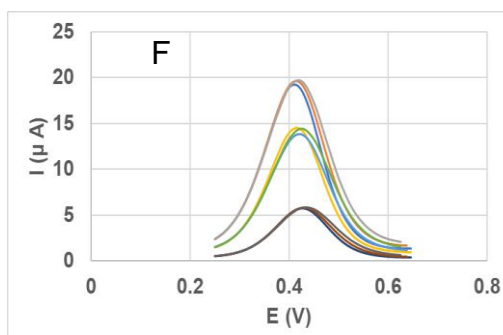
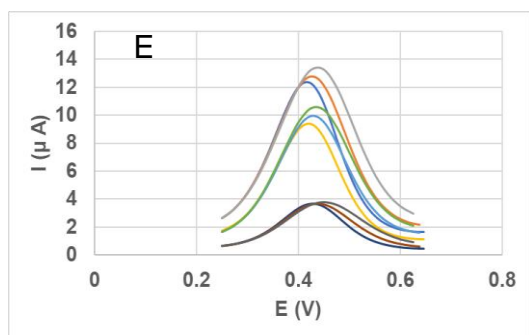
Oro



Platino



Carbono vítreo



- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| — 10 mV.s ⁻¹ (0.08 V) | — 25 mV.s ⁻¹ (0.08 V) | — 50 mV.s ⁻¹ (0.08 V) |
| — 10 mV.s ⁻¹ (0.06 V) | — 25 mV.s ⁻¹ (0.06 V) | — 50 mV.s ⁻¹ (0.06 V) |
| — 10 mV.s ⁻¹ (0.025 V) | — 25 mV.s ⁻¹ (0.025 V) | — 50 mV.s ⁻¹ (0.025 V) |

Anexo C. Picos de corriente para los 3 materiales y cálculo del área de superficie efectiva

Tabla C1. Picos de corriente para los 3 electrodos (10-200 m V/s).

	Oro				Platino				Carbono vítreo			
	modificado con alga	no modificado	modificado con alga	no modificado	modificado con alga	no modificado	modificado con alga	no modificado	modificado con alga	no modificado	modificado con alga	no modificado
velocidad de escaneo (m V/s)	i_{pa} (μ A)	i_{pa} (μ A)	i_{pc} (μ A)	i_{pc} (μ A)	i_{pa} (μ A)	i_{pa} (μ A)	i_{pc} (μ A)	i_{pc} (μ A)	i_{pa} (μ A)	i_{pa} (μ A)	i_{pc} (μ A)	i_{pc} (μ A)
10	1.09	1.32	-1.68	-1.81	1.27	1.25	-1.89	-1.91	3.39	3.03	-4.80	-5.11
25	1.77	2.22	-2.38	-2.64	2.19	2.14	-2.61	-2.81	5.86	5.84	-6.95	-7.35
50	2.52	3.32	-3.02	-3.59	3.12	3.22	-3.42	-3.75	8.37	8.82	-9.42	-9.89
75	3.03	4.19	-3.48	-4.33	3.59	4.04	-4.15	-4.51	10.23	10.81	-11.15	-11.88
100	3.45	4.92	-3.85	-4.98	4.15	4.78	-4.66	-5.16	11.70	12.83	-12.64	-13.52
125	3.79	5.58	-4.13	-5.56	4.52	5.35	-5.10	-5.78	13.01	14.31	-13.87	-15.18
150	4.15	6.19	-4.37	-6.10	5.14	5.98	-5.35	-6.29	14.27	15.78	-14.77	-16.28
175	4.46	6.71	-4.58	-6.52	5.45	6.40	-5.77	-6.86	15.10	17.06	-15.87	-17.41
200	4.78	7.24	-4.78	-7.00	5.88	7.08	-6.04	-7.13	16.17	18.20	-16.62	-17.30

Cálculo del área de superficie efectiva.

Como referencia se tuvieron las dimensiones estándar de la superficie de los electrodos, el diámetro de fábrica es de 2 mm para los electrodos de oro y platino y el diámetro es de 2.5 mm para electrodo de carbono vítreo, por lo que el área de superficie dada por el fabricante es 0.0314 cm² para electrodos de oro y platino y 0.05 cm² para el electrodo de carbono vítreo.

El área superficial efectiva se calculó usando la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \exp 5) * n^{\frac{3}{2}} * A * D^{\frac{1}{2}} * C * V^{\frac{1}{2}}$$

Ec.1 Ecuación de Randles-Sevcik [15].

A = (cm²) Área superficial del electrodo de trabajo.

D= 7.6 exp-6 (cm²/s) Coeficiente de difusión del ferrocianuro [15].

C= 1 exp-6 (mol/cm³) Concentración de la solución de ferrocianuro (1mM=1 exp-6 mol/m³).

n= 1 electrón [15].

V= (V/s) Velocidad de escaneo (V=Voltios).

I_p= (A) Pico de corriente (A=Amperios).

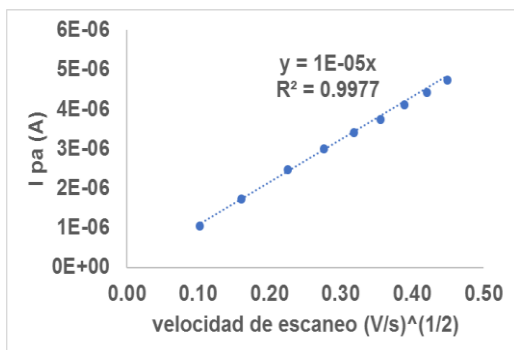
K= 2.69exp 5 [C/mol. V^{1/2}] (C= Culombio).

El área superficial se obtuvo graficando los picos de corriente (Tabla C1) versus la raíz cuadrada de las velocidades de escaneo. Es decir, I_{pa} (A) vs V^{1/2} (V/s). Se utilizaron los picos de corriente anódicos (I_{pa}) leídos de los CV en ferrocianuro de potasio para todas las velocidades de escaneo (10 – 200 mV/s). El objetivo fue calcular la pendiente resultante mediante una regresión lineal. A continuación, se muestran los gráficos de cada electrodo, para la superficie con alga y la no modificada.

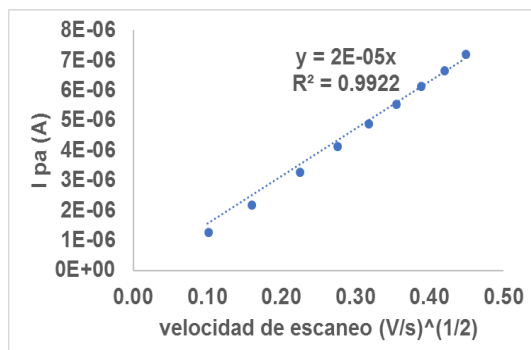
I_{pa} (A) vs V^{1/2} (V/s)

Oro

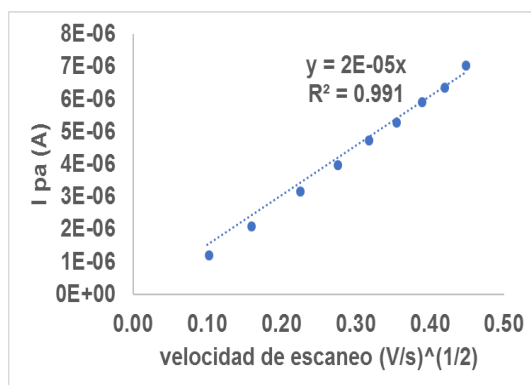
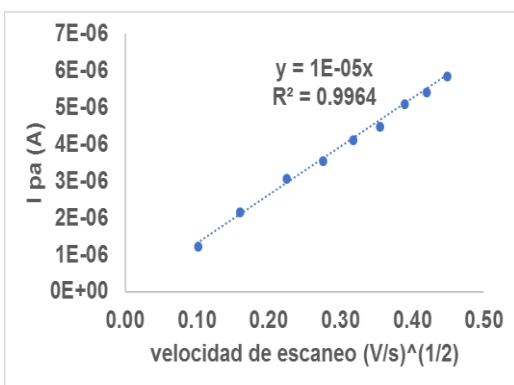
MODIFICADO CON ALGA



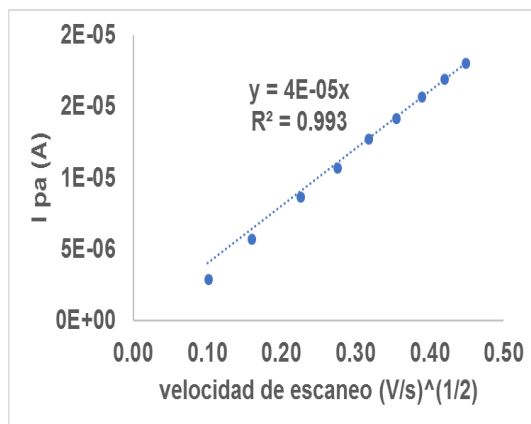
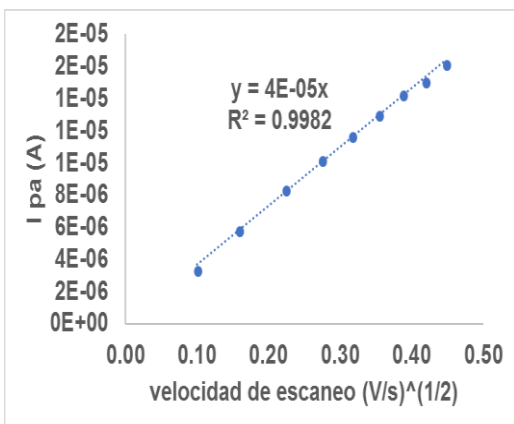
NO MODIFICADO



Platino



Carbono vítreo



Valores de la pendiente Ipa vs V ^{1/2}		
	Modificado con alga	No modificado
Oro	1.00E-05	2.00E-05
Platino	1.00E-05	2.00E-05
Carbono vítreo	4.00E-05	4.00E-05

El siguiente procedimiento muestra el cálculo del área para el electrodo de Oro modificado con alga, se toma su valor de pendiente (1exp-5). Recta obtenida equivalente a la ecuación de Randles-Sevcik:

$$y = (1 \text{ exp } -5)x$$

$$I_p = (1 \text{ exp } -5)V^{\frac{1}{2}}$$

Los valores de la pendiente son útiles para calcular el área de superficie efectiva, ahora se reemplaza en la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \text{ exp } 5) * n^{\frac{3}{2}} * A * D^{\frac{1}{2}} * C * V^{\frac{1}{2}}$$

$$I_p = (1 \text{ exp } -5)V^{\frac{1}{2}}$$

Por lo tanto, se puede reemplazar:

$$1 \text{ exp } -5 = (2.69 \text{ exp } 5) * n^{\frac{3}{2}} * A * D^{\frac{1}{2}} * C$$

$$A = \frac{1 \text{ exp } -5}{(2.69 \text{ exp } 5) * n^{\frac{3}{2}} * D^{\frac{1}{2}} * C}$$

$$A = \frac{1 * 10^{-5}}{(2.69 * 10^5) * 1^{\frac{3}{2}} * (7.6 * 10^{-6})^{\frac{1}{2}} * (1 * 10^{-6})}$$

$$A = 0.0135 [cm^2]$$

Valores calculados de área de superficie efectiva (cm²)		
	Modificado con alga	No Modificado
Oro	0.0135	0.0270
Platino	0.0135	0.0270
Carbono vítreo	0.0539	0.0539

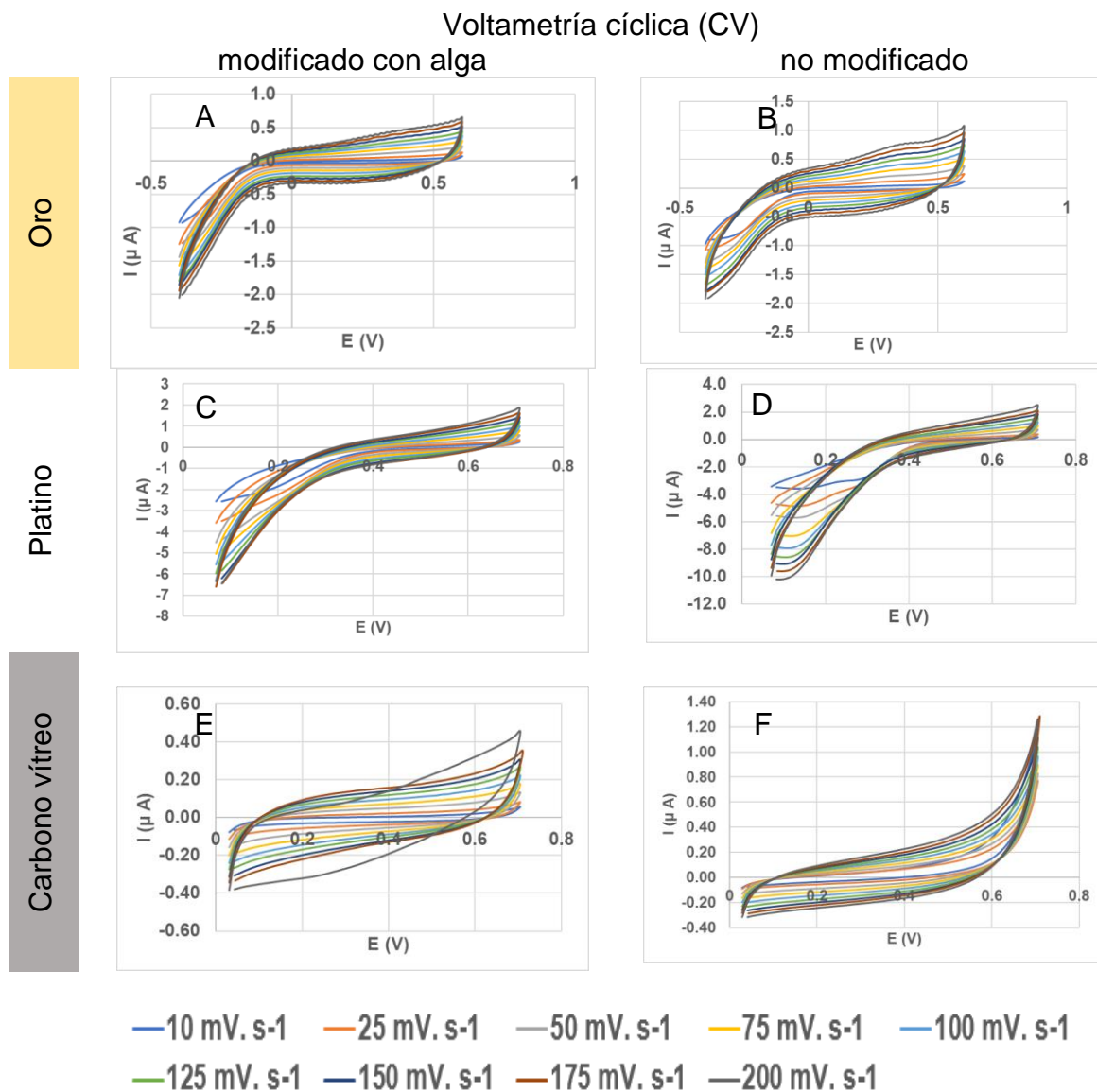
Con el mismo procedimiento se calcularon las áreas de superficie efectiva para la solución sobrenadante:

Valores de la pendiente solución sobrenadante		
	Modificado	no modificado
Oro	2.00E-05	2.00E-05
Platino	2.00E-05	2.00E-05
Carbono vítreo	4.00E-05	4.00E-05

Valores calculados de área de superficie efectiva para solución sobrenadante (cm²)		
	modificado	no modificado
Oro	0.0270	0.0270
Platino	0.0270	0.0270
Carbono vítreo	0.054	0.054

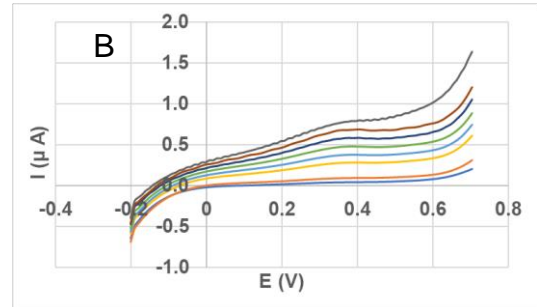
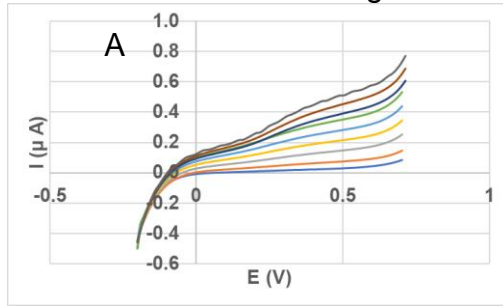
Anexo D. Resultados de técnicas de voltimetría CV, LSV y DPV en PBS y medio BG-11

- CV, LSV y DPV en solución PBS (pH =7.4)

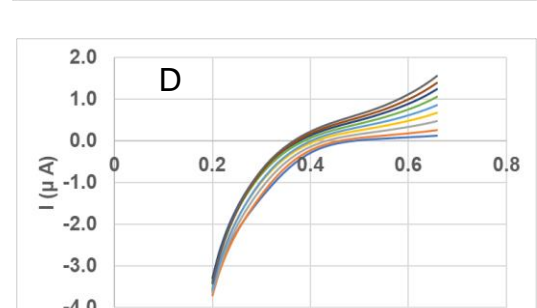
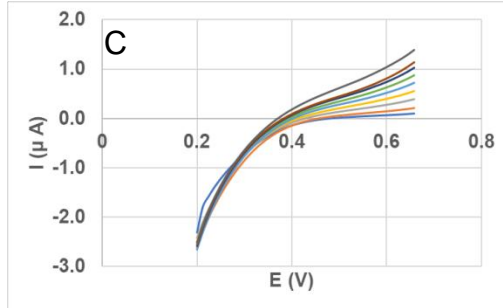


Voltametría de barrido lineal (LSV)
modificado con alga no modificado

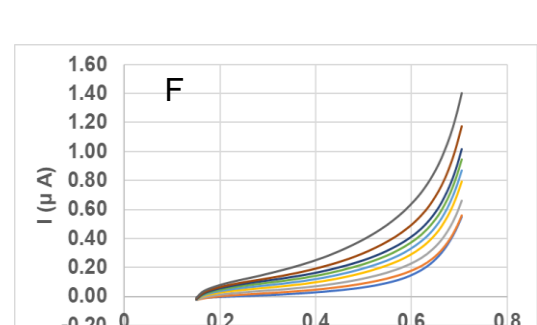
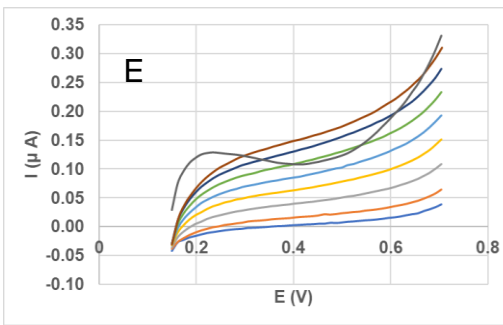
Oro



Platino

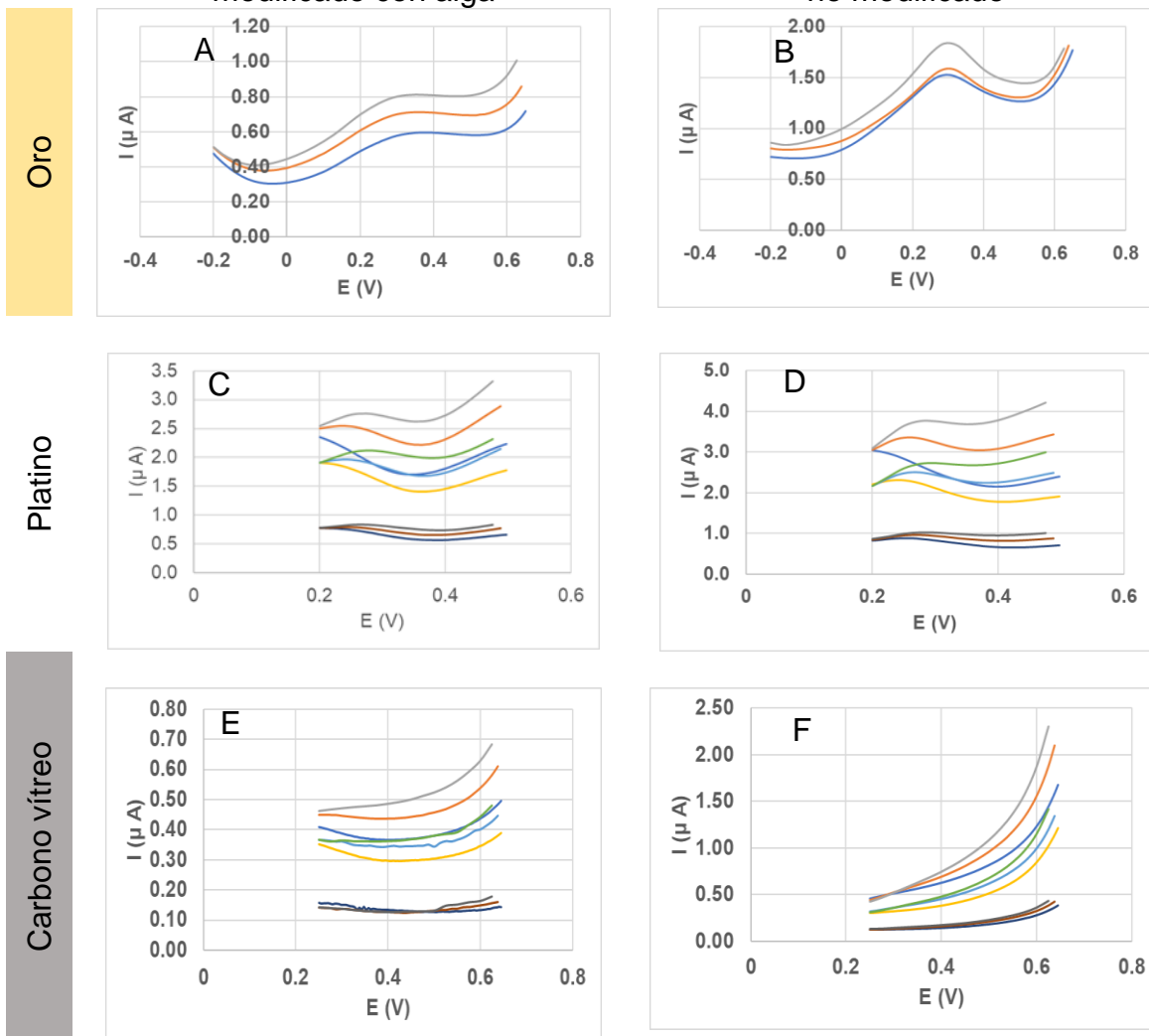


Carbono vítreo



- 10 mV. s-1
- 25 mV. s-1
- 50 mV. s-1
- 75 mV. s-1
- 100 mV. s-1
- 125 mV. s-1
- 150 mV. s-1
- 175 mV. s-1
- 200 mV. s-1

Voltametría de pulso diferencial (DPV)
modificado con alga no modificado



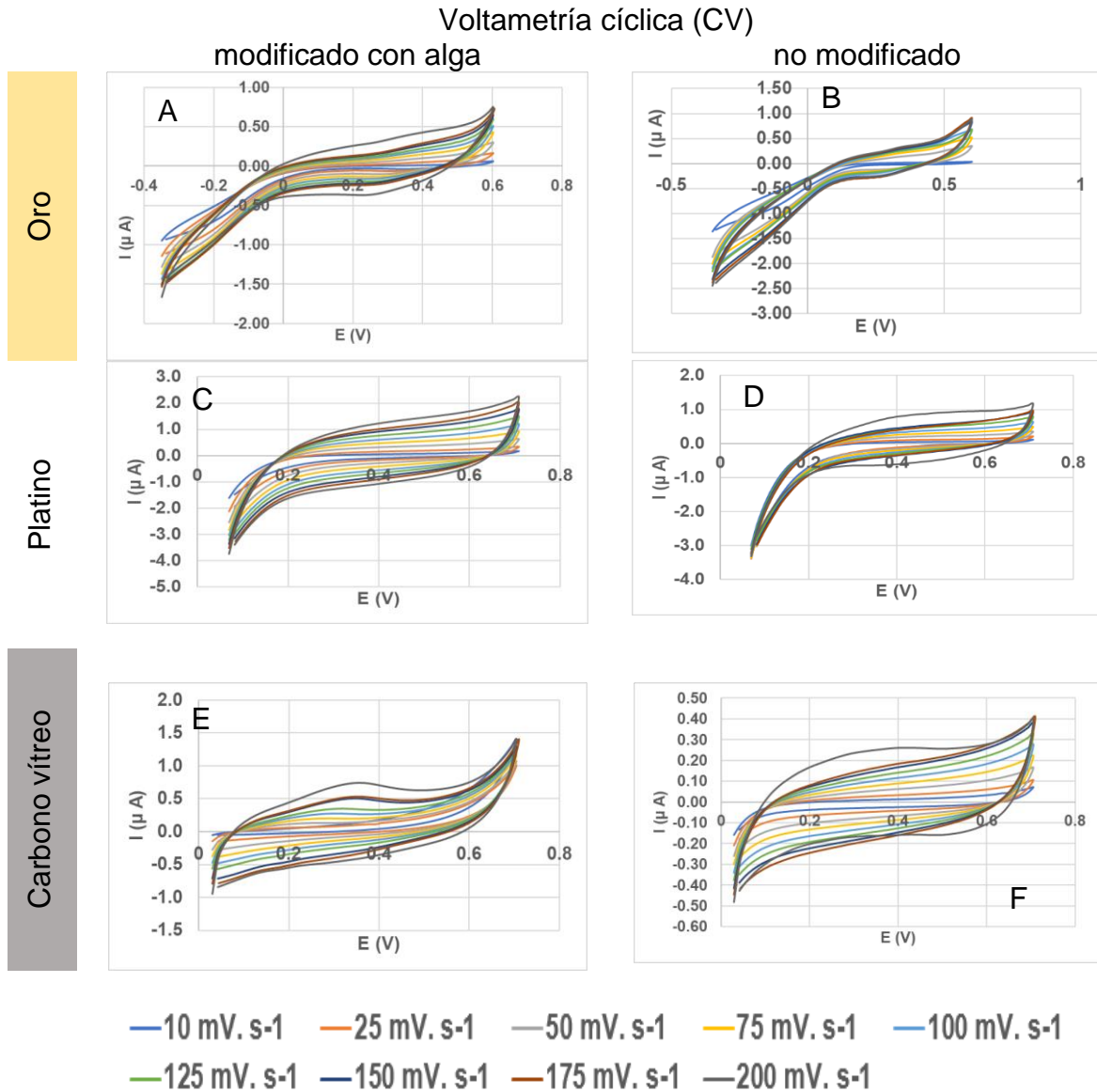
Oro

Platino

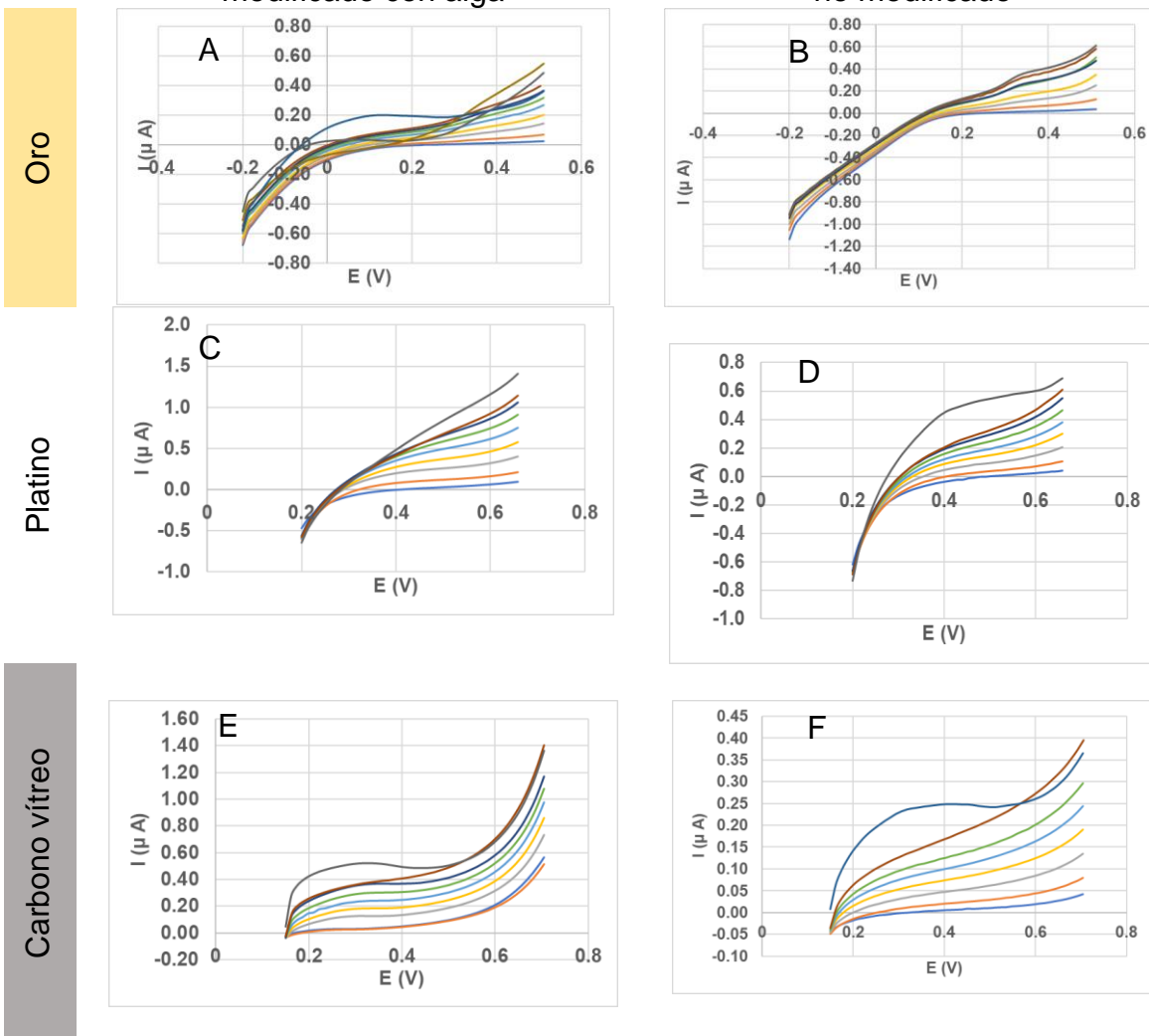
Carbono vítreo

- 10 mV.s-1 (0.08 V) — 25 mV.s-1 (0.08 V) — 50 mV.s-1 (0.08 V)
- 10 mV.s-1 (0.06 V) — 25 mV.s-1 (0.06 V) — 50 mV.s-1 (0.06 V)
- 10 mV.s-1 (0.025 V) — 25 mV.s-1 (0.025 V) — 50 mV.s-1 (0.025 V)

- CV, LSV y DPV en medio BG-11 (2%).



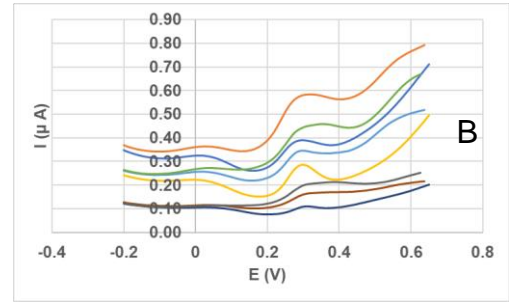
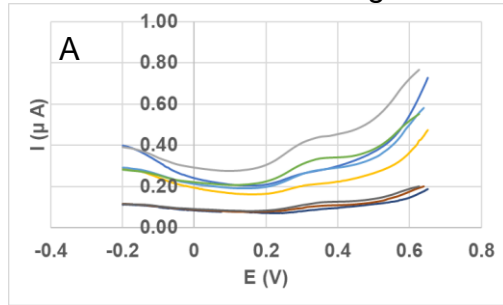
Voltametría de barrido lineal (LSV)
modificado con alga no modificado



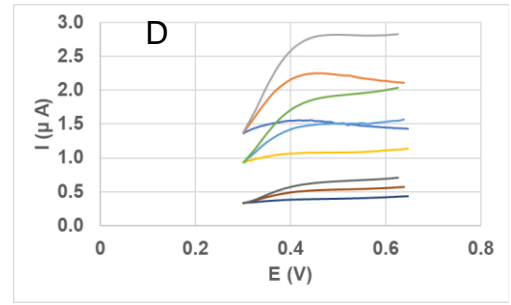
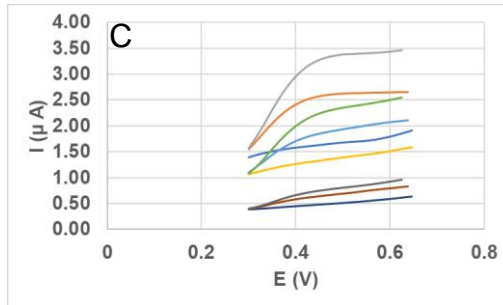
- 10 mV. s-1 — 25 mV. s-1 — 50 mV. s-1 — 75 mV. s-1 — 100 mV. s-1
 — 125 mV. s-1 — 150 mV. s-1 — 175 mV. s-1 — 200 mV. s-1

Voltametría de pulso diferencial (DPV)
modificado con alga no modificado

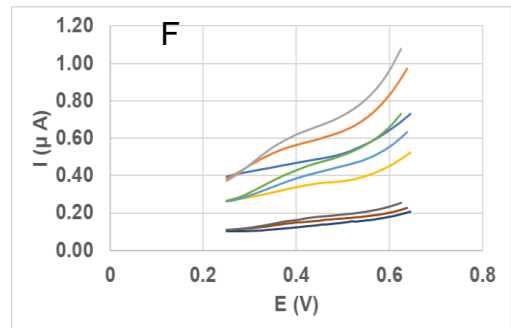
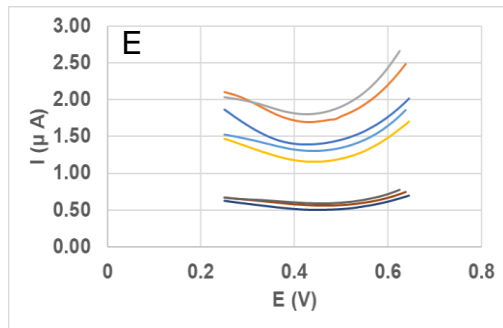
Oro



Platino



Carbono vítreo



- 10 mV.s⁻¹ (0.08 V) — 25 mV.s⁻¹ (0.08 V) — 50 mV.s⁻¹ (0.08 V)
- 10 mV.s⁻¹ (0.06 V) — 25 mV.s⁻¹ (0.06 V) — 50 mV.s⁻¹ (0.06 V)
- 10 mV.s⁻¹ (0.025 V) — 25 mV.s⁻¹ (0.025 V) — 50 mV.s⁻¹ (0.025 V)