



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
ELECTROGÉNICAS A PARTIR DE LA BIOPELÍCULA ANÓDICA
DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: MARJORIE IVONNE MAZO RODRIGUEZ

DIRECTORA: ANA RAFAELA PACURUCUREYES MSc.

Riobamba-Ecuador

2020

© 2020, **Marjorie Ivonne Mazo Rodriguez**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Marjorie Ivonne Mazo Rodriguez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 13 de febrero de 2020.

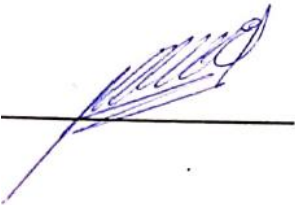

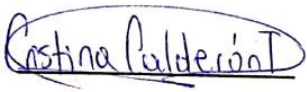
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'MARJORIE MAZO RODRIGUEZ' with a stylized flourish at the end.

Marjorie Ivonne Mazo Rodriguez

180535357-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal de Trabajo de titulación experimental certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Investigación, **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS A PARTIR DE LA BIOPELÍCULA ANÓDICA DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD**, realizado por la señorita **MARJORIE IVONNE MAZO RODRIGUEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud en Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ph. D. Magdy Mileni Echeverria Guadalupe PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		<u>13 febrero 2020</u>
Ana Rafaela Pacurucu Reyes MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		<u>13 de febrero del 2020</u>
Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc MIEMBRO DEL TRIBUNAL		<u>13 febrero 2020</u>

DEDICATORIA

A mis Padres, Iván y Laura, el esfuerzo y las metas alcanzadas reflejan la dedicación y el amor que invierten sus padres en sus hijos.

A mis hermanos, Hervin y Emily por su paciencia y apoyo en todo momento.

A Christian V., por el apoyo, paciencia y cariño brindado cada día.

A Verónica M., Adriana V., Thalía G., Laura M., y Santiago R. amigos incondicionales que siempre estuvieron pendientes.

Marjorie M.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por formarme como profesional.

A Rafita, más que mi directora, una gran amiga, quien, con sus conocimientos y su gran trayectoria, ha logrado en mí culminar mis estudios con éxito. Los docentes son un pilar fundamental para tu aprendizaje.

A Verónica M., por apoyo y conocimientos brindados en su laboratorio, por extender su mano en momentos difíciles.

Al grupo de investigación GIDAC, por abrirme las puertas a nuevos e interesantes conocimientos.

A Jairo y Cristian Vázquez, por su ayuda en la programación del monitoreo de mis celdas.

Marjorie M.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xi
v	
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Bacterias electrogénicas.....	4
1.1.1. <i>Principales bacterias electrogénicas descritas</i>	4
1.1.2. <i>Relación entre el tipo de bacteria y la generación de bioelectricidad</i>	6
1.2. Biopelículas.....	6
1.2.1. <i>Factores que afectan la formación de las biopelículas</i>	7
1.3. Aislamiento bacteriano.....	7
1.4. Caracterización bacteriana.....	8
1.4.1. <i>Caracterización fenotípica</i>	8
1.4.2. <i>Caracterización genotípica</i>	9
1.4.2.1. <i>Técnicas de identificación molecular</i>	9
1.4.2.2. <i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	10
1.4.2.3. <i>Amplificación de ADN bacteriano</i>	10
1.4.2.4. <i>Secuenciación de ADN bacteriano</i>	11
1.4.2.5. <i>Comparación de secuencias</i>	12
1.5. Bioelectricidad.....	12
1.5.1. <i>Tecnologías electroquímicas microbianas, MET</i>	13
1.6. Celdas de combustible microbianas.....	14
1.6.1. <i>Componentes de la celda de combustible microbiana</i>	15
1.6.2. <i>Principio de la celda de combustible microbiana</i>	18

1.6.3.	<i>Tipos de celdas de combustible microbianas</i>	19
1.6.4.	<i>Aplicaciones de las MFCs</i>	20

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	22
2.1.	Muestreo	22
2.2.	Configuración de las MFCs	22
2.2.1.	<i>Pretratamiento de las membranas</i>	23
2.2.2.	<i>Sustrato a incorporar en las MFCs reactivadas</i>	23
2.2.3.	<i>Monitoreo de las MFCs</i>	24
2.2.3.1.	<i>Densidad de corriente generado</i>	24
2.2.4.	<i>Determinación de la biopelícula (SEM)</i>	25
2.3.	Preparación de la biopelícula para el aislamiento	25
2.4.	Aislamiento bacteriano	25
2.4.1.	<i>Caracterización morfológica</i>	26
2.5.	Identificación molecular de bacterias	26
2.5.1.	<i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	26
2.5.2.	<i>Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR</i>	26
2.5.3.	<i>Secuenciación molecular</i>	27
2.5.4.	<i>Identificación molecular bacteriana</i>	27
2.6.	Potencial de generación de bioelectricidad de las cepas identificadas	27
2.7.	Reactivación de las MFCs	28
2.7.1.	<i>Pretratamiento de la membrana anódica</i>	28
2.7.2.	<i>Ensamblaje y monitoreo de las MFCs</i>	28
2.8.	Almacenamiento de cultivos identificados	28
2.9.	Diseño experimental	28
2.9.1.	<i>Imputación de datos faltantes</i>	29
2.9.2.	<i>Ley de probabilidad de los datos</i>	29
2.9.3.	<i>Prueba de Friedman para comparación de tratamientos</i>	30
2.9.4.	<i>Prueba de Wilcoxon para comparación de muestras</i>	31
2.9.5.	Variables	32
2.9.5.1.	<i>Independiente</i>	32
2.9.5.2.	<i>Dependientes</i>	32

2.9.5.3. <i>Intervinientes</i>	32
2.10. Lugar experimental	33
2.11. Materiales experimentales	33

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. pH y temperatura	35
3.2. Voltaje, densidad de corriente y densidad de potencia	35
3.3. Biopelícula a través del microscopio electrónico de barrido	38
3.4. Aislamiento bacteriano	38
3.5. Características microscópicas de las bacterias aisladas	40
3.6. Extracción y purificación de ADN bacteriano	42
3.7. Amplificación del Gen ARNr 16S	42
3.8. Secuenciación e identificación molecular	43
3.9. Potencial de generación de bioelectricidad de las cepas identificadas	46
3.10. Reactivación de las celdas de combustible microbiano	47
3.10.1. <i>pH y temperatura</i>	47
3.11. Conservación de las especies bacterianas identificadas	50
3.12. Comprobación de hipótesis	50
3.12.1. <i>Ley de probabilidad de los datos</i>	50
3.12.2. <i>Prueba de Friedman para comparación de tratamientos</i>	51
3.12.3. <i>Prueba de Wilcoxon para la comparación de pares de muestras</i>	51
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Bacterias electrogénicas descritas y densidad de potencia generada.....	5
Tabla 2-1:	Técnicas de caracterización fenotípica más usuales	8
Tabla 3-1:	Recomendaciones de las técnicas de identificación molecular bacteriana	9
Tabla 1-2:	Primers empleados en la PCR.....	27
Tabla 2-2:	Niveles de significancia comunes	30
Tabla 3-2:	Materiales experimentales empleados.....	33
Tabla 1-3:	Morfología de bacterias aisladas.....	39
Tabla 2-3:	Tinción Gram de bacterias aisladas.....	41
Tabla 3-3:	Identificación molecular de las bacterias aisladas.....	45
Tabla 4-3:	Especies bacterianas identificadas.....	46
Tabla 5-3:	Voltaje y densidad de corriente obtenida en las celdas reactivadas.....	48
Tabla 6-3:	Prueba de Anderson Darling	50
Tabla 7-3:	Estadístico Chi cuadrado de Friedman.....	51
Tabla 8-3:	Comparación del voltaje según el tipo de bacteria.....	51
Tabla 9-3:	Comparación del Voltaje con relación al Momento de Muestreo.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Proceso de formación de una biopelícula.....	6
Figura 2-1:	Representación de la reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	11
Figura 3-1:	Secuenciación de ADN mediante láser.....	12
Figura 4-1:	Diversas aplicaciones del MET.....	14
Figura 5-1:	Representación del principio de una celda de combustible microbiano.....	15
Figura 6-1:	Principio fundamental de una MFC, generación de bioelectricidad.....	19
Figura 7-1:	Clasificación de las MFC	19
Figura 8-1:	Varias aplicaciones de segunda generación desarrolladas a partir de MFC	20
Figura 3-2:	Biopelícula vista a través del MEB A: MFC40. B: MFC20.....	22
Figura 4-2:	MFC con cátodo expuesto A: vista lateral. B: vista frontal.....	23
Figura 1-3:	Biopelícula vista a través del MEB A: MFC40. B: MFC20, vistas a 10um.....	38
Figura 2-3:	Bacterias aisladas A: MFC20. B: MFC40.....	39
Figura 3-3:	Repliques de las bacterias aisladas A: MFC20. B: MFC40.....	40
Figura 4-3:	Tinción Gram A: Cepa B120 Coco Gram - B: Cepa B140 Coco Gram +.....	41
Figura 5-3:	Electroforesis del ADN extraído y purificado	42
Figura 6-3:	Electroforesis de la amplificación del gen ARNr 16S	43
Figura 7-3:	NCBI, A Comparación de la secuencia consenso y B elección del organismo más próximo	44
Figura 8-3:	Cepas bacterianas conservadas en glicerol.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	pH obtenido en las celdas reactivadas.....	35
Gráfico 2-3:	Curva de polarización de voltaje vs densidad de corriente de MFCs.....	37
Gráfico 3-3:	pH de las celdas reactivadas.....	48
Gráfico 4-3:	Comparación del voltaje generado de acuerdo al tipo de bacteria.....	52
Gráfico 5-3:	Comparación del voltaje generado de acuerdo al momento de muestreo.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO PURELINK® GENOMIC DNA KITS

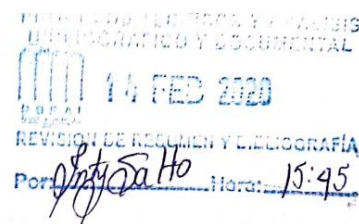
ANEXO B: REACTIVOS EMPLEADOS EN LA MASTER MIX PARA LA PCR

ANEXO C: MEDICIÓN DE VOLTAJE DE LAS CELDAS REACTIVADAS

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue realizar la identificación molecular de bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiano que fueron desarrolladas a partir de muestras de suelo proveniente del páramo alto andino de Chimborazo-Ecuador, para el estudio de la producción de bioelectricidad. Se realizó el aislamiento microbiano de las biopelículas anódicas extraídas a partir de celdas reactivadas, mediante siembra por extensión en superficie en medio sólido enriquecido y posterior incubación a 22.5°C; a partir de la caracterización morfológica de las colonias obtenidas se procedió a la obtención de trece cultivos puros de los tipos microbianos más representativos para su identificación molecular, para su identificación. Para desarrollar las pruebas de producción de bioelectricidad se reactivaron las celdas seleccionando tres de las ocho de las bacterias identificadas, tomando como base el cumplimiento de las siguientes características: no patógenas, anaerobias facultativas, degradadoras y buenas productoras de bioelectricidad, eligiendo finalmente a las cepas *Serratia* sp., *Rhodococcus erythropolis* y *Citrobacter freundii*. El nivel de voltaje fue medido tres veces al día durante un período de 15 días, y los resultados demuestran una generación aproximada de 0.3 a 0.5 V a un pH ligeramente ácido. Las cepas bacterianas identificadas fueron conservadas en glicerol a 4°C para posteriores investigaciones. Se sugiere proponer ensayos de generación de bioelectricidad a partir de consorcios bacterianos formulados con las cepas aisladas.

Palabras clave: <IDENTIFICACIÓN MOLECULAR>; <BACTERIAS ELECTROGÉNICAS>; <CELDA COMBUSTIBLE MICROBIANA>; <BIOELECTRICIDAD>; <BIOPELÍCULA ANÓDICA>



ABSTRACT

This degree work's main aim was to perform the molecular identification of electrogenic bacteria from the anodic biofilm of microbial fuel cells that were developed from soil samples coming from the Andean high lands of Chimborazo-Ecuador, for the study of bioelectricity production. The microbial isolation of two anodic biofilms extracted from reactivated cells was performed, by sowing through extension in enriched solid medium surface and subsequent incubation at 22.5 ° C; From the morphological characterization of the colonies obtained, thirteen pure cultures of the most representative microbial types were obtained for their molecular identification. To develop the bioelectricity production tests, the cells were reactivated by selecting three of the eight bacteria identified, based on compliance with the following characteristics: non-pathogenic, facultative anaerobic, degrading and good bioelectricity producers, finally choosing the strains *Serratia* sp., *Rhodococcuserythropolis* and *Citrobacterfreundii*. The voltage level was measured three times a day for 15 days, and the results show an approximate generation of 0.3 to 0.5 V at slightly acidic pH. The bacterial strains identified were stored in glycerol at 4 ° C for further research. It is suggested to propose bioelectricity generation tests from bacterial consortiums formulated with the isolated strains.

Key words: <MOLECULAR IDENTIFICATION>; <ELECTROGENIC BACTERIA>; <MICROBIAL FUEL CELL>; <BIOELECTRICITY>; <ANODIC BIOPELLECLE>



INTRODUCCIÓN

Las necesidades energéticas, el crecimiento poblacional y el avance industrial provocan el agotamiento de los recursos fósiles, principales responsables de la contaminación ambiental (Farias 2016, p. 5), contribuyendo en el interés de las comunidades científicas y tecnológicas en la búsqueda de nuevas energías alternativas para satisfacer estas necesidades sin contaminar el ambiente, buscando recursos energéticos económicos, accesibles y sustentables (Sun et al. 2010, p. 471).

Entre las energías alternativas en investigación se encuentran las celdas de combustible microbianas, MFCs, éstas generan energía y remueven compuestos presentes en diversos sustratos con múltiples aplicaciones como generar bioelectricidad, alta remoción de demanda bioquímica de oxígeno, DBO, metales pesados y producción de hidrógeno. Actualmente, En países desarrollados se investiga estas tecnologías por sus diversas aplicaciones. En lugares como Argentina, Chile, México, Colombia y Ecuador existe una gran diversidad de sustratos y microorganismos que podrían contribuir al desarrollo de MFCs, como lodos anaeróbicos provenientes de aguas residuales, material de desecho de rellenos sanitarios, sedimentos de ríos o sedimentos marinos, suelos de páramos y otras fuentes (Pant et al. 2010, p. 1534).

El estudio de la microbiota de las celdas de combustible microbiano se ve limitado en países latinoamericanos por el enfoque de obtención de energía a partir de consorcios bacterianos (Farias 2016, p. 8). En Ecuador, son escasos los estudios sobre identificación molecular de bacterias electrogénicas. El Grupo de Investigación y Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático, GIDAC de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ESPOCH, desarrolla proyectos enfocados en la microbiota de suelo de páramo para la obtención de bioelectricidad con el uso de MFCs.

Para la continuidad de sus estudios, se requiere la identificación molecular de bacterias electrogénicas presentes en la biopelícula de la membrana anódica de las MFCs, buscando el generar un cepario de bacterias electrogénicas provenientes del páramo alto andino de Chimborazo-Ecuador.

¿Las bacterias electrogénicas de la biopelícula anódica de Celdas de Combustible Microbianas generan bioelectricidad?

Justificación

Identificar y aislar un cultivo bacteriano puro es importante al momento de establecer una técnica fija para su uso y disposición, de acuerdo a los requerimientos nutricionales de la cepa en el medio de crecimiento y factores ambientales influyentes, se genera una amplia gama de aplicaciones como la degradación de compuestos contaminantes, con el valor agregado de producción un tipo de energía consumible.

Además, la importancia de la investigación de los suelos de páramo recae a la potencial microbiota, microorganismos afebles a condiciones ambientales extremas, humedad relativa entre 70-85%, bajas temperaturas, precipitaciones de 3000 mm/año aproximadamente. Estos factores han condicionado las formas de vida con adaptaciones específicas, dando lugar a un alto grado de endemismo en cuanto a flora y fauna, sin embargo, la microbiota del suelo y el papel que ésta desempeña en un ecosistema tan estratégico para la generación de agua, por ejemplo, ha sido poco investigado. De acuerdo a investigaciones las MFCs requieren microorganismos específicos capaces de generar electricidad, subsistiendo en diversas condiciones, motivo por el cual la microbiota del suelo de páramo genera un alto interés de investigación.

La ESPOCH es el beneficiario directo de la investigación, debido que éste trabajo aporta un avance importante en el proyecto denominado “*Evaluación de métodos de configuración en celdas de combustible microbianas y determinación de la matriz de sustratos orgánicos óptima con el fin de maximizar la obtención de energía a partir de residuos sólidos orgánicos*” desarrollado por el grupo de investigación GIDAC/ESPOCH. Además, la identificación de bacterias mediante técnicas moleculares ha demostrado mayor validez y confiabilidad en comparación con pruebas fenotípicas únicamente tradicionales, además pueden aportar resultados interesantes, considerando la escasa información sobre la microbiota del suelo alto andino de la provincia de Chimborazo - Ecuador.

En este contexto, la presente investigación pretende identificar molecularmente bacterias electrogénicas existentes en las MFCs con suelo de páramo y demostrar la generación de bioelectricidad como un valor agregado.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar, mediante técnicas moleculares, bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiano para la obtención de bioelectricidad.

Objetivos específicos:

- Reactivar celdas de combustible microbianas, manteniendo la formación de la biopelícula de bacterias adheridas en las membranas de intercambio anódico.
- Realizar el aislamiento y la caracterización molecular de bacterias electrogénicas de celdas de combustible microbianas reactivadas.
- Probar el nivel de producción de bioelectricidad de las bacterias identificadas mediante un ensayo en celdas de combustible microbianas.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Bacterias electrogénicas.

Las bacterias electrogénicas son microorganismos capaces de generar energía eléctrica a partir de su metabolismo, por ejemplo, en la respiración celular, estos microorganismos necesitan un medio favorable para oxidar la materia orgánica y al mismo tiempo reducir iones metálicos; mientras tenga la posibilidad de eliminar el exceso de electrones generados a partir de la liberación de energía en un proceso catabólico, estos electrones liberados en un medio adecuado generan electricidad(Light *et al.*, 2018, pp. 1-3).

De forma general existen dos tipos de bacterias electrogénicas.

- a. Bacterias electrogénicas capaces de producir sus propios mediadores redox, los cuales secretan al medio y reaccionan con el electrodo, por ejemplo, el género *Shewanella* bacterias que secretan riboflavinas que actúan como mediadores redox entre la bacteria y el electrodo(Hernández *et al.*, 2017, pp. 5-7).
- b. Bacterias electrogénicas capaces de reaccionar de forma directa con el electrodo sin mediador soluble alguno, por ejemplo, el género *Geobacter*(Light *et al.*, 2018, p. 11).

1.1.1. Principales bacterias electrogénicas descritas.

Entre los microorganismos potencialmente electrogénicos descritos se encuentran los géneros de *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Eumycotay Chlorophyta*. (Li *et al.*, 2018, pp. 1318-1319). Otros microorganismos como *Rhodoférx*, *Aeromonas* y *Enterococcus* también tienen la capacidad de ceder electrones, pero por mecanismos aún no conocidos, de acuerdo a la tabla 1-1:

Tabla 1-1: Bacterias electrogénicas descritas y densidad de potencia generada:

Género	Especie	Gram +/-	Intensidad potencia
γ-Proteobacteria	<i>Shewanella oneidensis</i>	G-	3000mW/m ²
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	G-	480mW/m ²
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	21mW/m ²
	<i>Aeromonashydrophila</i>	G-	N.D.
	<i>Escherichia coli</i>	G-	91mW/m ²
	<i>Klebsiellapneumoniae</i>	G-	410mW/m ²
	<i>Enterobactercloacae</i>	G-	42mW/m ²
	<i>Tolumonasonensis</i>	G-	424mW/m ²
	<i>Proteusvulgaris</i>	G-	85mW/m ²
	<i>Comamonasdenitrificans</i>	G-	35mW/m ²
	<i>Alcaligenesfaecalis</i>	G-	4900mW/m ²
	<i>Erwiniadissolvens</i>	G-	0.22mW
	<i>Citrobacter sp. SX-1</i>	G-	88mW/m ²
δ-Proteobacteria	<i>Geobactersulfurreducens</i>	G-	461mW/m ²
	<i>Geobactermetallireducens</i>	G-	40mW/m ²
	<i>Geopsychrobacterelectrodiphilus</i>	G-	6 mA/cm ²
	<i>Desulfobulbuspropionicus</i>	G-	28 mA/m ²
	<i>Desulfuromonasacetoxidans</i>	G-	N.D.
	<i>Desulfovibriodesulfuricans</i>	G-	233 mA/m ²
α-Proteobacteria	<i>Rhodopseudomonaspalustris</i>	G-	2720mW/m ²
	<i>Ochrobactrumanthropi</i>	G-	89mW/m ²
	<i>Acidiphiliumcryptum</i>	G-	13mW/m ²
	<i>Paracoccusdenitrificans</i>	G-	47 W/m ³
β-Proteobacteria	<i>Rhodoferaxferrireducens</i>	G-	74 mA/m ²
ε-Proteobacteria	<i>Arcobacterbutzleri</i>	G-	296 mW/L
Firmicutes	<i>Clostridium butyricum</i>	G+	19mW/m ²
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	G+	13.3 A/m ²
	<i>Thermincolapotens</i>	G+	N.D.
	<i>Thermincolaferriacetica</i>	G+	146mW/m ²
	<i>Bacillussubtilis</i>	G+	1.05 mW/cm ²
	<i>Enterococcusgallinarum</i>	G+	28.4 W/m ²
Acidobacteria	<i>Geothrixfermentans</i>	G-	N.D.
Actinobacteria	<i>Kocuriarhizophila</i>	G+	75mW/m ²
	<i>Corynebacterium sp.MFC03</i>	G+	41mW/m ²
Chlorophyta	<i>Chlorellavulgaris</i>	--	3.2 W/m ³

Fuente: LI, M., ZHOU, M., TIAN, X., TAN, C., MCDANIEL, C.T., HASSETT, D.J. y GU, T., 2018. Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020

1.1.2. *Relación entre el tipo de bacteria y la generación de bioelectricidad*

La mayoría de las bacterias electrogénicas son Gram-negativa, investigaciones recientes creen que se debe a la diferencia en su composición de la pared, que conduce a la diferencia en la carga de la superficie de la célula, que a su vez afecta a las actividades electrogénicas de estas bacterias; las bacterias Gram-positivas están compuestas por una capa de peptidoglicano ligada al ácido teicóico, lo que provoca un alto potencial Zeta, mientras que las bacterias Gram-negativas están compuestas por lipopolisacáridos, lo que le da un potencial Zeta más bajo en comparación con las bacterias Gram-positivas, estas cargas superficiales de las bacterias interactúan con las cargas superficiales de los electrodos (Veerubhotla, Varanasi y Das 2018, p. 238).

1.2. **Biopelículas**

Las biopelículas están formadas por microorganismos que crecen en asociación en una superficie de materiales inertes, y luego se adhieren por medio de una matriz viscosa llamada exopolisacáridos (EPS), estos polímeros son secretados por los microorganismos. Las biopelículas naturales contienen microorganismos de diferentes especies como bacterias, hongos, algas, protozoos, etc. (Figura 1-1) (Veerubhotla, Varanasi y Das 2018, p. 234).

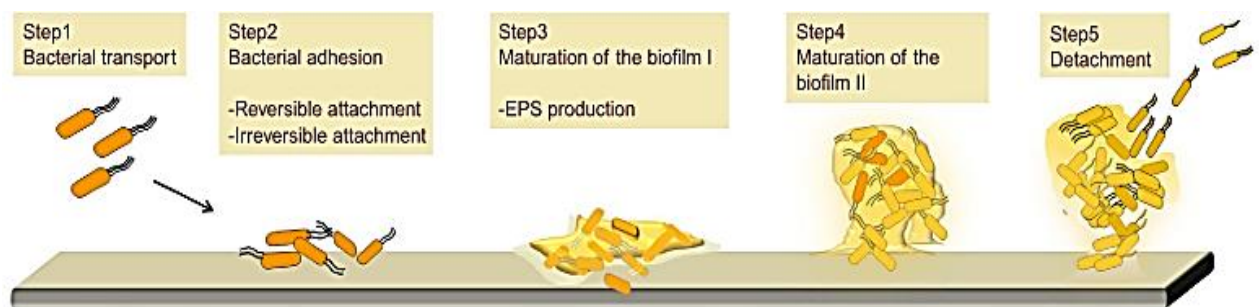


Figura 1-1: Proceso de formación de una biopelícula.

Fuente: (Veerubhotla, Varanasi y Das 2018, p. 234)

La notable resistencia de las biopelículas a varios productos químicos y condiciones extremas han generado problemas en las industrias biomédicas y alimentarias, sin embargo, algunas de ellas pueden ser extremadamente beneficiosas para varias técnicas de biorremediación, tratamiento de aguas residuales y lixiviación de metales. Entre ellas está la biopelícula electroactiva, que forma la base de los sistemas bioelectroquímicos, Las biopelículas electroactivas, consisten en una biopelícula conductora de electricidad formada por la combinación de EPS y nanocables bacterianos que se encuentran típicamente en el microorganismo (Veerubhotla, Varanasi y Das 2018, p. 236).

1.2.1. Factores que afectan la formación de las biopelículas.

El tipo de material al que se adhieren, se requiere porosidad y condiciones hidrofílicas para su formación; condiciones físico-químicas como pH, temperatura, tipo de sustrato y los iones presentes en el medio; y el tipo de microorganismos que formen la biopelícula (Veerubhotla, Varanasi y Das 2018, p. 236).

1.3. Aislamiento bacteriano

El aislamiento de las bacterias es esencial para la identificación bacteriana, independientemente de si la identificación se realiza mediante técnicas genotípicas o fenotípicas (Bou *et al.*, 2011, p. 602). Un cultivo suele incluir diversas colonias de microorganismos a partir de la muestra madre para la siembra (Bodega, y otros, 2015 págs. 107-108), a partir de este se procede a aislar las diferentes colonias de interés, mediante el cultivo celular en un sistema *in vitro* controlado y simplificado (Karp, 2014, pp. 749-751).

Los cultivos se realizan en medios, que pueden ser sólidos, líquidos o semilíquidos, considerando sus necesidades nutricionales, energía y electrones, además, de factores físicos y químicos como temperatura, pH, requerimiento de oxígeno y actividad del agua, del que dependen para desarrollarse (Bodega, y otros, 2015 págs. 124-137).

El aislamiento en microbiología es fundamental para el estudio cultivos puros, y se realiza mediante siembras varios tipos de siembra, entre las que están: siembra por extensión, donde se transfiere un volumen mínimo de muestra y se extiende por todo el medio. Siembra por agotamiento o estriado, donde se realiza el arrastre de la muestra por el medio dividiéndola en cuadrantes para obtener

cultivos puros; y la masificación, buscando que la muestra cubra toda la superficie para una mayor cantidad de cultivo puro (Bodega, y otros, 2015 págs. 124-137).

1.4. Caracterización bacteriana

La caracterización bacteriana se basa en la descripción del microorganismo, desde la observación directa con la caracterización fenotípica, hasta llegar a la caracterización genotípica teniendo como fin especificar la especie a la que el microorganismo pertenece (Bou et al. 2011 p. 602).

1.4.1. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de bacterias, es la más empleada en laboratorios por su bajo coste y facilidad de aplicación, consiste en las características observables tabla 2-1, crecimiento en medio de cultivo, morfología, propiedades bioquímicas y metabólicas. Se emplea en cultivos factibles, que crecen en laboratorio, estas técnicas facilitan el aislamiento, su identificación y su estudio, a más de ser una técnica de bajo costo (Bou *et al.*, 2011, p. 601).

Tabla 2-1: Técnicas de caracterización fenotípica más usuales

Técnica	Principales ejemplos
Técnicas macroscópicas	Morfología
Cultivo	Requisitos de cultivo y medios de cultivo
Técnicas bioquímicas	Lectura inmediata (oxidasa y catalasa) Pruebas rápidas (ureasa, indol),
Pruebas lentas	Reducción de nitratos DNasa
Pruebas de resistencia	Antibióticos
Pruebas comerciales automatizadas.	API

Fuente: BOU, G. et al. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020

1.4.2. Caracterización genotípica

Debido a las falencias de la caracterización fenotípica, y que esta es considerada una como identificación más probable y no definitiva se presenta la caracterización genotípica como un

procedimiento alternativo o complementario, consiste en identificar a la bacteria a partir de un análisis a nivel genético, buscando similitud en la secuencia (Bou *et al.*, 2011, p. 602).

1.4.2.1. Técnicas de identificación molecular

Las técnicas identificación molecular de bacterias consiste en diferentes metodologías con un fin en común, conocer el tipo de bacteria presente en una muestra. La parte inicial para el procedimiento es la extracción del ADN bacteriano, posteriormente se realiza la amplificación mediante PCR, donde se replican genes específicos del ADN bacteriano para su posterior secuenciamiento mediante la utilización de bases de datos como la del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI)(Bou *et al.*, 2011, pp. 602-605).

Entre las técnicas con mayor precisión para la identificación molecular bacteriana están:

- Análisis del ARNr 16S, considerado como un cronómetro molecular de alto grado de conservación genética debido a que es un polirribonucleótido que es codificado por el ADN ribosomal contenido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Con un tamaño aproximado de 1500 pb suficiente para proporcionar un polimorfismo interespecífico necesario para validar la identificación (Bou *et al.*, 2011, p. 603).
- Análisis del ARNr 23S, técnica auxiliar útil con fines filogenéticos y taxonómicos (Bou *et al.*, 2011, p. 603). De acuerdo a las necesidades en la identificación molecular de bacterias, se recomienda el uso del análisis del ARNr 16S y del rpoB, de acuerdo a la tabla 3-1 descrita a continuación.

Tabla 3-1: Recomendaciones de las técnicas de identificación molecular bacteriana.

Categoría	Recomendaciones
Cepas por secuenciar	Cepas con escasa descripción Cepas con baja frecuencia de aislamiento Cepas con fenotipos atípicos Cepas de difícil identificación fenotípica Cepas de crecimiento lento o fastidioso Nuevos patógenos Bacterias de difícil cultivo
Análisis del ARNr 16S	Mínimo: > 98,5% similitud

	Ideal: 1.300 a 1.500 pb secuenciadas < 1% posiciones ambiguas
Criterio para la identificación de especie	Mínimo: > 98,5% similitud Ideal: > 99% similitud Comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que posee estudios de homología de ADN. Para diferencias < 0,5% a la especie más cercana, considerar otras propiedades (fenotipo)
Criterio para la identificación de género	Rango de similitud 95-100%
Criterio para la asignación de familia	Similitud < 95%
Análisis retrospectivo de la identificación fenotípica	Morfología de la colonia Tinción Gram Catalasa/oxidasa Perfil bioquímico Requerimientos nutricionales

Fuente: BOU, Get al. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020

1.4.2.2. *Extracción y purificación de ADN bacteriano*

La mayoría de microorganismos poseen una variedad de componentes, si se busca estudiar una estructura en particular, en este caso el ADN bacteriano una de las técnicas más empleadas es la centrifugación diferencial. Esta técnica consiste en separar las sustancias mediante su densidad a velocidades distintas de centrifugación (Karp, 2014, p. 752).

Existen varios métodos entre los que destacan el uso de reactivos químicos y el uso de kits comerciales, siendo estos últimos los más recomendados por su estandarización y su fácil uso en el laboratorio (Bou *et al.*, 2011, p. 601).

1.4.2.3. *Amplificación de ADN bacteriano*

La amplificación de ADN se define como la síntesis de ADN a partir de la enzima ADN-polimerasa, cebadores con los extremos de la hebra a amplificar y desoxirribunucleótidos que actúan sobre una hebra de ADN monocatenario del extremo 3' al 5', formando oligonucleótidos sintéticos que luego serán utilizados por la enzima y los cebadores hasta obtener una cantidad grande de ADN (Watson *et al.*, 2016, p. 158).

El método más empleado para la amplificación de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que a diferencia de métodos como la propagación dentro de una célula hospedadora y la clonación implica trabajar *in vitro*. Amplifica una región del genoma, mediante ciclos de amplificación, véase en la figura 2-1, parte de la desnaturalización de la hebra de ADN con temperatura y se une a los cebadores para posteriormente con ayuda de la ADN-polimerasa copiar la hebra por la extensión de los cebadores, es decir, empieza con la desnaturalización luego la cebadura y finalmente la síntesis de ADN en cada ciclo en dirección 5' a 3' obteniéndose hebras en el orden de 2, 4, 8, 16, 32, 64, sucesivamente (Watson *et al.*, 2016, pp. 158-159).

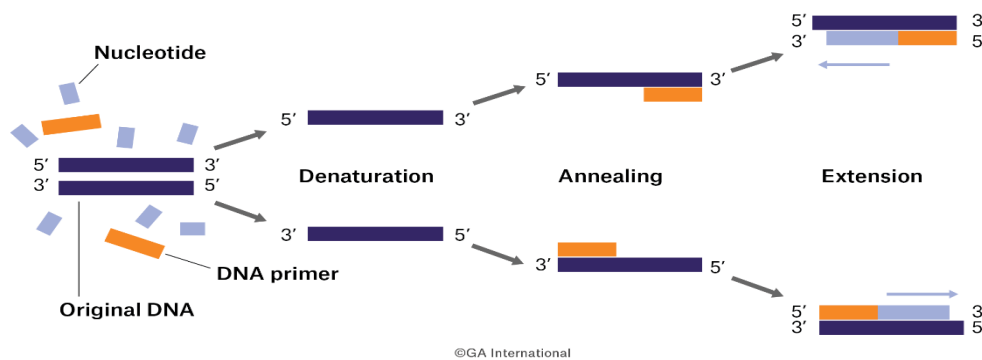


Figura 2-1: Representación de la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Fuente: (Karp, 2014, p. 770)

1.4.2.4. Secuenciación de ADN bacteriano

La secuenciación de ADN tiene como principio básico la separación de conjuntos imbricados de moléculas de ADN de acuerdo a su tamaño. Las moléculas de ADN tienen el extremo 5' común y difieren en su extremo 3' que puede finalizar con una adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C) (Watson *et al.*, 2016, p. 160).

El método más empleado en la secuenciación es la aplicación de nucleótidos de terminación de cadena conocidos como 2', 3' dideoxynucleótidos (ddNTP) del tipo ddTTP, ddCTP, ddGTP y ddATP, moléculas que carecen del grupo 2', 3' hidroxilo en su pentosa y por esto impiden el alargamiento de la cadena de ADN. Estas moléculas pueden ser marcadas mediante un cebador radioactivo o moléculas fluorescentes, y, a partir del orden de los fragmentos formados, se puede

leer la secuencia de ADN mediante un electroferograma generado por un escáner láser (figura 3-1), donde cada peldaño representara una C, T, A o G (Watson *et al.*, 2016, pp. 160-162).

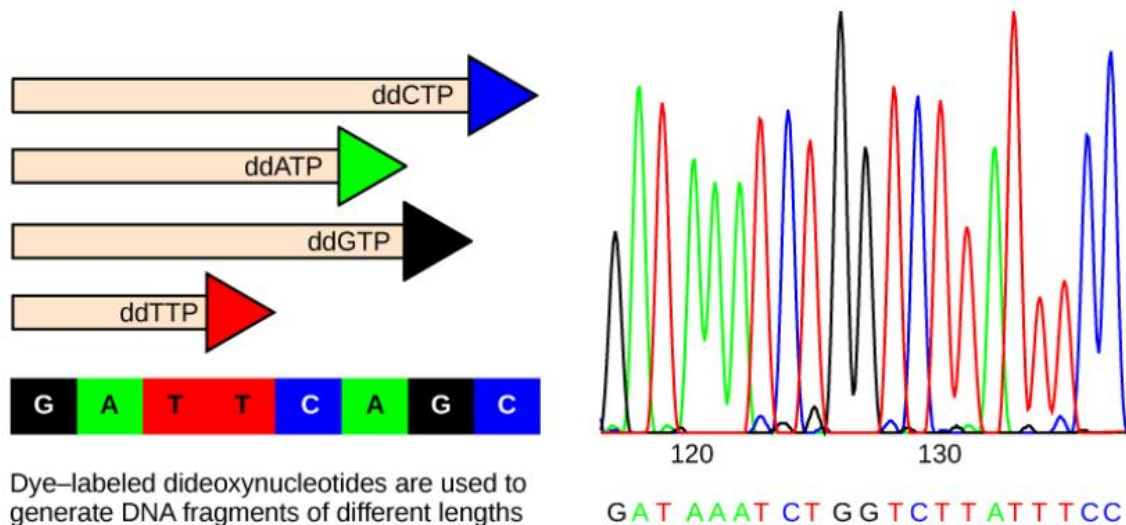


Figura 3-1: Secuenciación de ADN mediante láser

Fuente: Watson *et al.*, 2016, p. 162.

1.4.2.5. Comparación de secuencias

Una vez identificada la secuencia de nucleótidos de una parte del ADN es posible el uso de diversos softwares, bases de datos como Centro Nacional para la Información Biotecnológica, NCBI por sus siglas en inglés, base de datos de Suiza, Japón entre las principales, para analizar dicha secuencia y poder inferir en el organismo del que se trata al compararla con secuencias ya identificadas previamente (Karp, 2014, pp. 771-773).

1.5. Bioelectricidad.

La bioelectricidad de manera general se refiere a la capacidad de los organismos para generar electricidad, un mecanismo básico son las bombas de iones de membrana celular que consumen energía y polarizan una célula, y el potencial de acción generado si la célula se activa y se abren los canales de iones, teniendo como componentes básicos a la célula viva, y que esté rodeada por una solución electrolítica (Grimnes y Martinsen, 2007, pp.1-4).

La bioelectricidad es también conocida como bioelectrogénesis, proceso por el cual las bacterias electrogénicas pueden oxidar materia orgánica y generar electrones a una superficie conductora, por ejemplo, fibra de carbono (Beegle y Borole, 2018, p. 195).

1.5.1. Tecnologías electroquímicas microbianas, MET.

La tecnología electroquímica microbiana (MET) consiste en diversas aplicaciones que utilizan la interacción electroquímica de microorganismos y electrodos. La aplicación del MET se reporta en diversos campos, como, bioenergía, remediación de residuos, secuestro de CO₂, bioelectrónica, recuperación de recursos, desalinización, etc. Su ventaja básica radica en su flexibilidad para valorizar cualquier forma de residuo, para generar un espectro de productos (electricidad, biocombustibles, biogás, productos químicos de plataforma) de forma sostenible. Los sistemas son básicamente híbridos en su naturaleza y son interdisciplinarios con agregación cohesiva de varias áreas, como, electroquímica, microbiología, ingeniería ambiental, ciencias de los materiales, bioquímica y muchas otras áreas relacionadas (Mohan *et al.*, 2018, p. 3).

Basado en sus aplicaciones, el MET puede clasificarse ampliamente en: (Figura 4-1)

- Celdas de combustible microbianas (MFC) para generar bioelectricidad.
- Sistemas de tratamiento bioelectroquímico (BET) para tratar aguas residuales complejas, recalcitrantes y de alta resistencia.
- Celdas de electrólisis microbiana (MEC) para la producción de hidrógeno y metano.
- Sistemas de electrolisis microbiana (MES) para generar productos químicos de plataforma.
- Celdas de desalinización microbiana (MDC) para separar iones.
- Electrofermentación (EF) para mejorar la síntesis de productos basados en la biotecnología (Mohan *et al.*, 2018, p. 4).

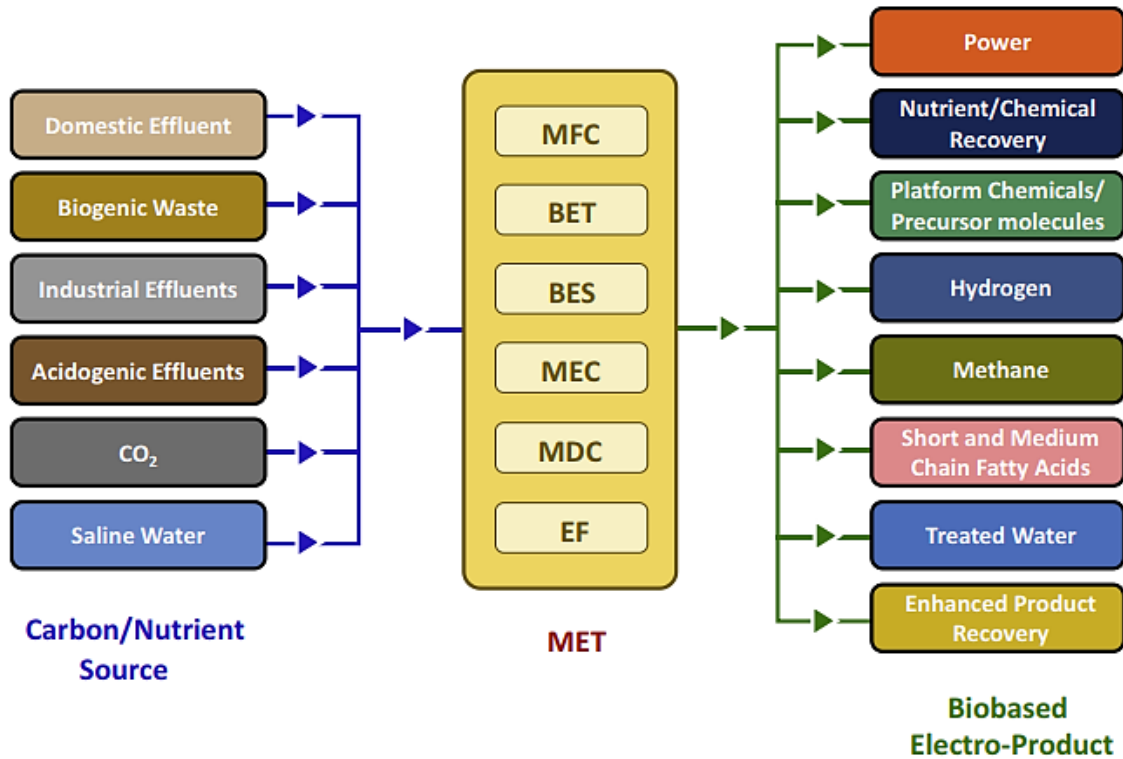


Figura 4-1: Diversas aplicaciones del MET

Fuente: (Mohan *et al.*, 2018, p. 4).

Los parámetros que se analizan para evaluar el comportamiento eléctrico en bioelectricidad son: la densidad de potencia (dP) expresada en potencia por unidad de área del electrodo o por unidad de volumen del sustrato, densidad de corriente (dC) expresada en intensidad por unidad de área del electrodo, mediante el análisis de curvas de polarización derivadas del voltaje generado (Revelo y Hurtado, 2013, p. 20).

1.6. Celdas de combustible microbianas.

Una de las principales miras de aplicaciones industriales de bioelectricidad propuestas a nivel mundial es la celda de combustible microbiano (MFC por sus siglas en inglés) con ventajas sobre otros tipos de generadores de energía, por ejemplo, no emite gases contaminantes, tiene una mayor eficiencia, no tiene partes móviles, por lo que no hay contaminación acústica. Por el contrario, el alto costo y la alta generación masiva son las únicas desventajas de estas nuevas fuentes de energía (Rahimnejad *et al.*, 2015, p.746).

Una celda de combustible microbiano se define como un dispositivo con la capacidad de convertir la energía química almacenada en los sustratos orgánicos presentes en la alimentación del combustible en energía eléctrica útil mediante la utilización de las actividades catalíticas de los microorganismos, es decir, éstos descomponen la materia orgánica presente en estos dispositivos y, en el proceso, generan electrones y estos, a su vez, dan lugar a energía eléctrica útil generando como residuo agua y dióxido de carbono, representación gráfica del principio en la figura 5-1 (Dutta y Kundu, 2018, p. 1).

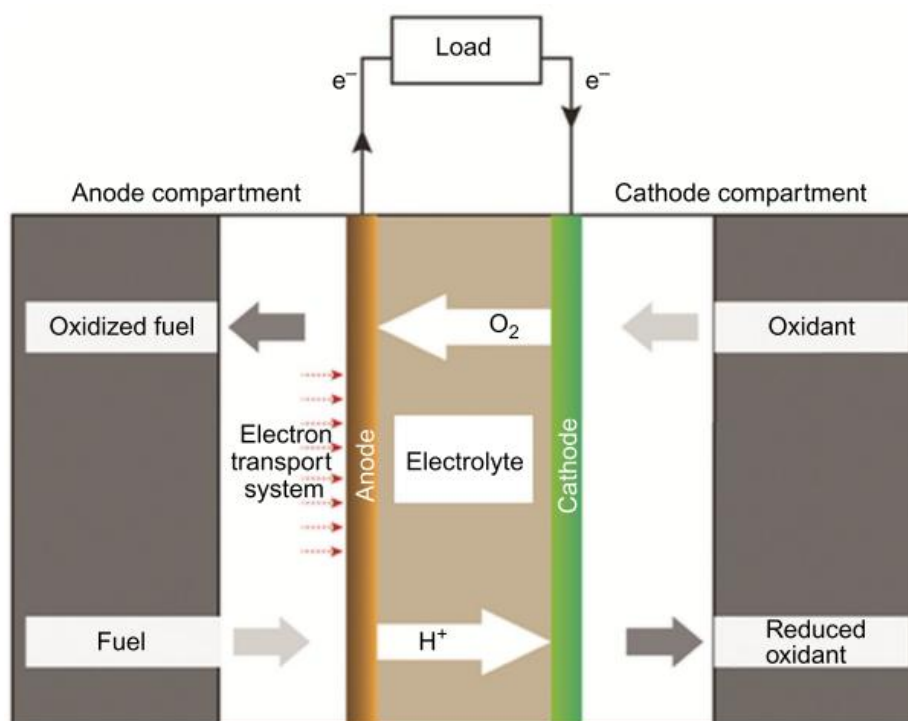


Figura 5-1: Representación del principio de una celda de combustible microbiano

Fuente: Dutta y Kundu, 2014, p.402

1.6.1. Componentes de la celda de combustible microbiana

De acuerdo a Bhunia y Dutta, (2018, pp.3-5) las principales partes funcionales de las MFC son: el compartimiento del ánodo, compartimiento de cátodo, ánodo, cátodo, catalizadores de ánodos, catalizadores de cátodos, electrolito, sustratos, microorganismos y el sistema de transporte de electrones.

a. **Ánodo:**

Suele estar hecho de fibra de carbono o grafito, entre los más utilizados, permanece conectado con un alambre de titanio o cobre externo. Los electrones generados por la acción de los microorganismos sobre los sustratos de carbono presentes en el sustrato son transportados al alambre a través del ánodo(Bhunia y Dutta, 2018, p. 4).

b. **Compartimiento del ánodo:**

Contiene el ánodo, el sistema catalizador del ánodo, el sustrato, los microorganismos y el sistema de transporte de electrones (figura 5-1). El sustrato, al entrar en el compartimiento del ánodo a través de la entrada, es sometido a tratamiento por microorganismos empleados. Resulta en la oxidación del sustrato, generando electrones, protones y varios productos oxidados. Estos productos oxidados escapan del compartimiento a través de la salida suministrada(Bhunia y Dutta, 2018, p. 3).

c. **Cátodo:**

Suele estar con el mismo material del ánodo, permanece conectado con el otro extremo de alambre externo, que conecta el cátodo con el ánodo. Los electrones del compartimiento del ánodo son transportados al cátodo a través de este cable externo(Bhunia y Dutta, 2018, p. 4).

d. **Compartimiento de cátodo:**

Contiene el cátodo, el sistema de catalizador del cátodo y el oxidante (figura 5-1). El oxidante empleado suele ser aire u oxígeno puro. En algunos casos, las parejas redox se añaden al compartimiento del cátodo para acelerar la reacción del cátodo. El oxígeno reacciona con los protones y electrones transportados desde el compartimiento del ánodo para formar agua(Bhunia y Dutta, 2018, p. 3).

e. **Catalizadores de ánodos y cátodos:**

En general, los microorganismos presentes en el compartimento del ánodo funcionan como biocatalizadores. Sin embargo, en algunos casos, se emplean catalizadores químicos para acelerar la reacción del ánodo. El platino es el catalizador anódico más utilizado (Bhunia y Dutta, 2018, p. 4).

f. Electrolitos:

Las funciones principales de un electrolito son conducir los protones generados en el compartimento del ánodo al compartimento del cátodo, mantener el contenido del compartimento del ánodo separado del compartimento del cátodo, y evitar que los electrones fluyan desde el ánodo al compartimento del cátodo. Por lo tanto, el electrolito se coloca entre el ánodo y los compartimentos del cátodo (figura 6-1) (Bhunia y Dutta, 2018, p. 4).

g. Sustratos:

Los MFCs pueden funcionar con una amplia variedad de sustratos naturales y sintéticos, tales como aguas residuales domésticas y municipales, efluentes industriales y sustratos orgánicos de cualquier otra fuente (Bhunia y Dutta, 2018, p. 5).

h. Componente microbiano.

Corresponde a microorganismos que descomponen la materia orgánica presente en los sustratos para generar protones y electrones útiles, los más utilizados son las bacterias, éstas pueden ser propias del sustrato o cultivadas, éstos se aglomeran en forma de biopelículas en el ánodo de la celda y permiten la transferencia de electrones. La biopelícula formada por las bacterias electrogénicas se conoce como la "casa de la energía" de las MFCs ya que proporciona la fuente de electrones a los electrodos para el funcionamiento de los MFCs (Bhunia y Dutta, 2018, p. 5).

i. Sistema de transporte de electrones:

Muchos microorganismos son capaces de transportar de forma independiente los electrones generados en su cuerpo al ánodo. Sin embargo, cuando esto no es posible, se requiere de un sistema de transporte de electrones (Bhunia y Dutta, 2018, p. 5).

1.6.2. Principio de la celda de combustible microbiana

El principio fundamental de una MFC consiste en el uso de microorganismos capaces de transferir electrones directamente al ánodo o pueden requerir una sustancia química externa para este fin (figura 6-1), los dos compartimentos - el compartimiento del ánodo y el compartimiento del cátodo - contienen al ánodo y al cátodo que están separados por un electrolito y conectados externamente por un cable conductor a través de los electrodos (Bhunia y Dutta, 2018, p. 5).

El sustrato que entra en el compartimiento del ánodo es oxidado por los microorganismos, produciendo electrones en el proceso. Estos electrones son transportados al ánodo por el sistema de transporte de electrones y al llegar, los electrones son transportados más allá, a través del alambre conductor conectado externamente, hasta el cátodo, proporcionando así energía eléctrica a la carga conectada en el camino. Por otro lado, los protones, generados al descomponerse la materia orgánica son transportados hasta el cátodo donde se combinan en la presión del oxígeno y forman agua (Bhunia y Dutta, 2018, p. 9).

Las reacciones principales que ocurren en el ánodo y cátodo (descritas en la figura 6-1) son:

Ánodo: sustrato orgánico \rightarrow H^+ + e^- + sustrato oxidado

Cátodo: $4H^+$ + $4e^-$ + $O_2 \rightarrow 2H_2O$

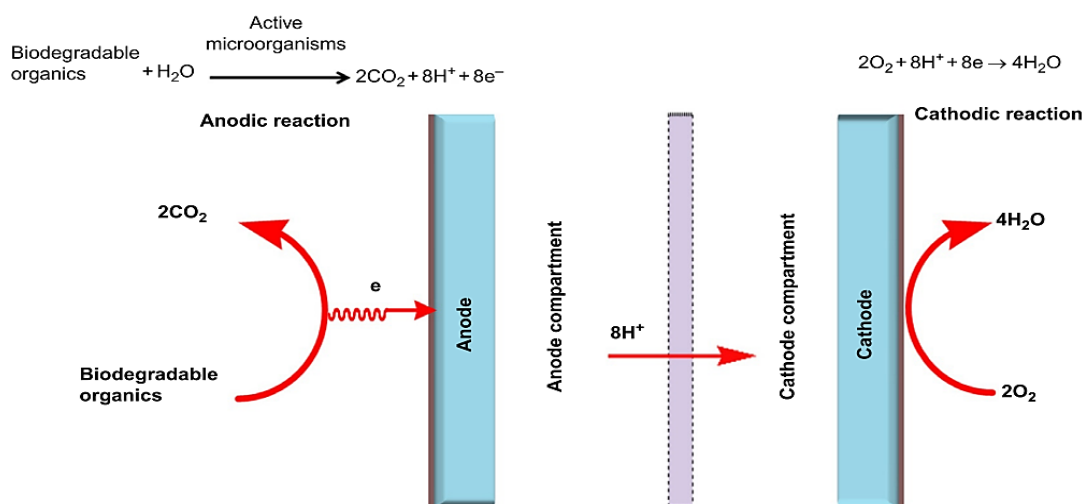


Figura 6-1: Principio fundamental de una MFC, generación de bioelectricidad.

Fuente: Bhunia y Dutta, 2018, p. 328.

1.6.3. Tipos de celdas de combustible microbianas:

Las celdas de combustible microbiano se clasifican de acuerdo al mecanismo y la aplicación, como se observa en la figura 7-1:

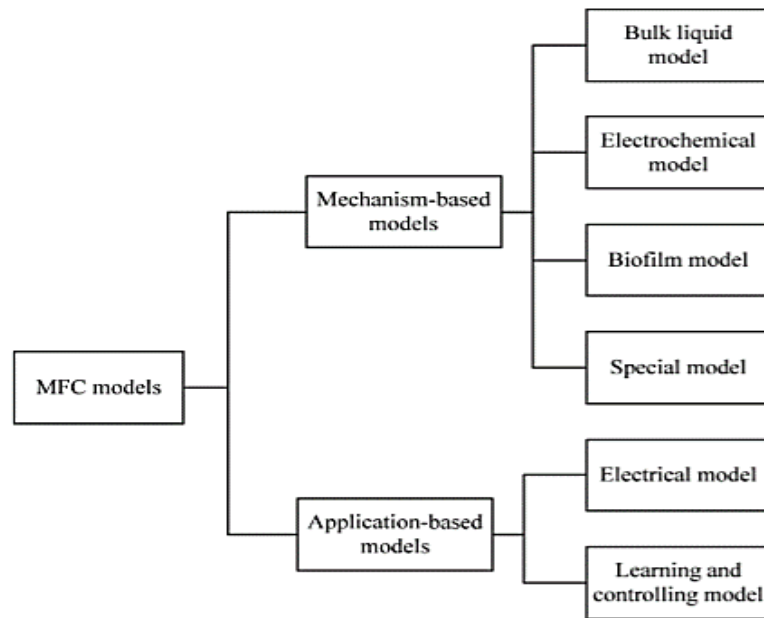


Figura 7-1: Clasificación de las MFC.

Fuente: Xia *et al.*, 2018, p. 121

Además, las MFC también se pueden clasificar de acuerdo a otros criterios:

a. Configuración de la celda

Se tienen MFC de tipo cámara simple, con un solo compartimento donde están el cátodo y el ánodo y de cámara doble, donde se tienen dos compartimentos, uno para el cátodo y otro para el ánodo (Nandy y Kundu, 2018, p. 27).

b. Tipo de sustrato

Entre los sustratos mayormente utilizados están: glucosa, cultivo mixto, cultivo bacteriano, sedimentos y metales pesados (Nandy y Kundu, 2018, p. 27).

c. Tipo de electrodo

Entre los tipos de electrodos que más se utilizan se tiene: fibra de carbono, grafito, platino y poliamida y papel carbón (Rahimnejad *et al.*, 2015, p. 748).

1.6.4. Aplicaciones de las MFC:

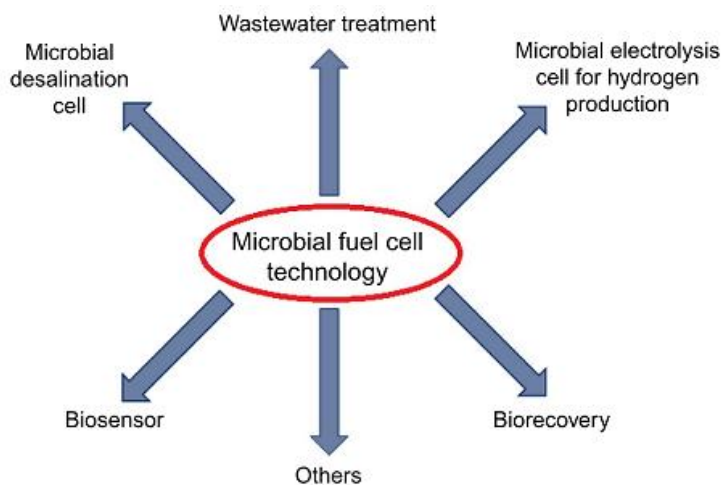


Figura 8-1: Varias aplicaciones de segunda generación desarrolladas a partir de MFC.

Fuente: Dutta y Kundu, 2018, p.6

Hay grandes expectativas de las MFC (figura 8-1), principalmente debido a la multifacética utilidad de estos dispositivos. El número de tecnologías de segunda generación que ya se han desarrollado a partir de la tecnología MFC lo demuestra. Se puede suponer que en los próximos años aumentará el número y la variedad de estas tecnologías, lo que justificará una mayor investigación sobre el desarrollo de los MFC. Sin embargo, la necesidad más apremiante es que los dispositivos MFC produzcan una mayor potencia de salida a un menor coste, de acuerdo con su estado actual (Dutta y Kundu, 2018, p.6).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Muestreo

Se parte de la biopelícula identificada en la figura 1-2, correspondiente al trabajo de investigación “Evaluación de métodos de configuración en celdas de combustible microbianas y determinación de la matriz de sustratos orgánicos óptima con el fin de maximizar la obtención de energía a partir de residuos sólidos orgánicos” del Grupo de Investigación GIDAC – ESPOCH, en donde se observa la biopelícula formada a partir de suelo de la parroquia Villa La Unión, Cantón Colta, provincia de Chimborazo.

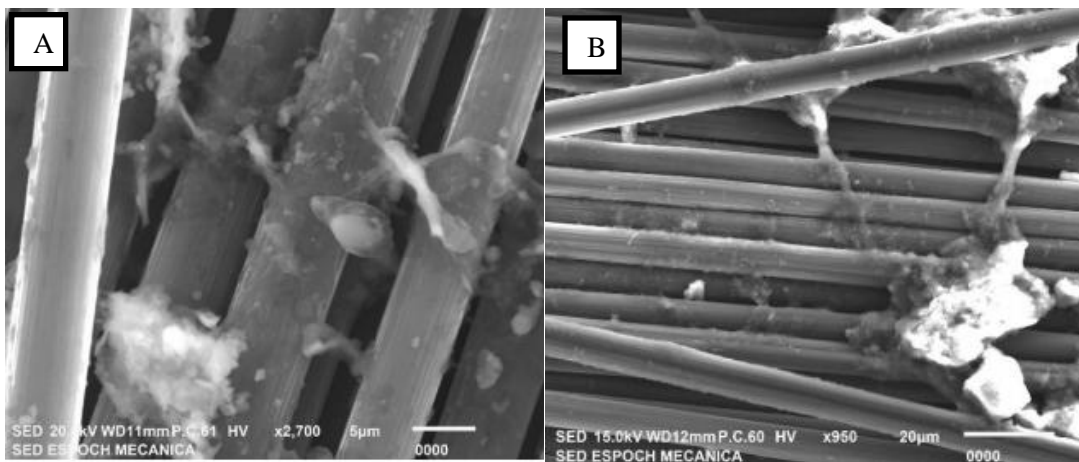


Figura 1-2: Biopelícula vista a través del MEB **A:** MFC40. **B:** MFC20

Realizado por: GIDAC-ESPOCH, 2019

2.2. Configuración de las MFCs

Los materiales empleados en la construcción de las MFCs fueron sumergidos en una solución de ácido acético al 3% durante 30 minutos, posteriormente fueron enjuagados con agua tratada y alcohol al 96%, y finalmente expuestos a luz UV en una cámara de flujo laminar (Zhi et al. 2014, p. 11).

El desarrollo de las MFCs (figura 2-2) consistió en la elaboración de una cámara simple, con cátodo expuesto de manera parcial al aire y construidas con acrílico traslucido de espesor de 3mm; la cámara anódica fue elaborada en forma de cubo de 8 cm de lado, en dos de sus caras laterales se instalaron tapones de caucho para el abastecimiento de nutrientes, en la cara basal superior se colocó la membrana del ánodo previamente almacenada para la reactivación de su biopelícula. El cátodo se dispuso a partir de cinco láminas del mismo material de la cámara anódica, dispuestas en forma paralela. Las cámaras anódica y catódica fueron aseguradas mediante pernos galvanizados de ¼” con tuerca (GIDAC-ESPOCH 2019).

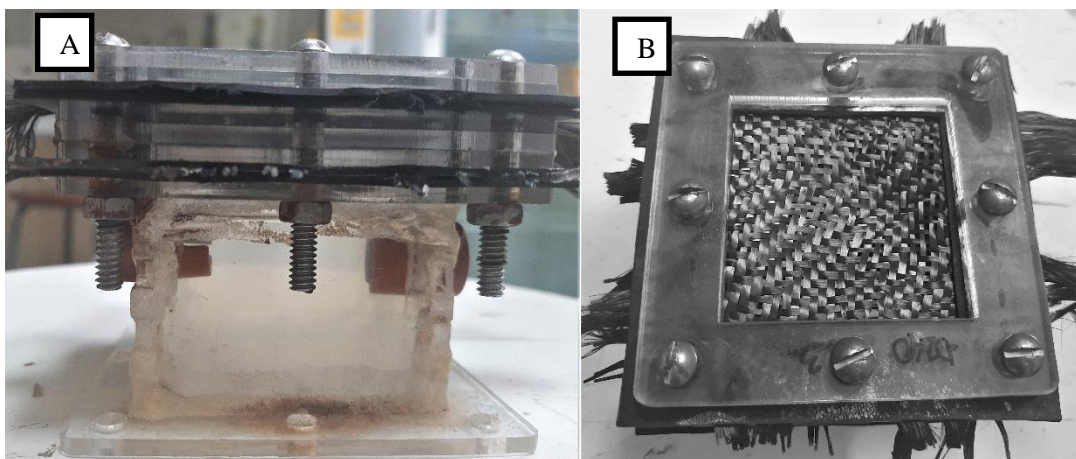


Figura 2-2: MFC con cátodo expuesto **A:** vista lateral. **B:** vista frontal

Realizado por: GIDAC-ESPOCH, 2019

2.2.1. Pretratamiento de las membranas.

Se realizaron varios enjuagues de la membrana catódica con agua destilada para la eliminación de impurezas; la membrana anódica fue almacenada en una bolsa ziploc estéril durante la construcción de las MFCs.

2.2.2. Sustrato a incorporar en las MFCs reactivadas

En el trabajo de investigación mencionado se trabajó con residuos orgánicos de frutas y verduras, para la reactivación de las celdas, se investigó un sustrato sintético, similar ya empleado en las celdas, formulado según HUANG, (2018, p. 379), como se señala a continuación: alcohol etílico 1.46 mL, acetato de sodio 2.14 g, cloruro de amoníaco 9.81 g, urea 0.15 g, caldo nutriente 0.15 g, fosfato

diácido de potasio 2.95 g, fosfato ácido de potasio trihidratado 6.6 g, cloruro de potasio 0.13 g y agua corriente.

2.3. Monitoreo de las MFCs

El monitoreo de las MFCs consistió en la lectura y almacenamiento de los datos de voltaje en un sistema de adquisición de datos, la DAQ NI USB-6009 de 8 entradas y 14bits, que operó con el software Lab-View, lanzando datos análogos con un intervalo de recolección de 1 minuto, tomando cada lapso de 24 horas como ciclo independiente, por un periodo de 15 días de monitoreo (Stefanova et al. 2018, p. 18). El potencial de hidrogeno (pH) fue medido el día 0, el día 8 y al final del monitoreo de las MFCs; la temperatura ambiente fue registrada diariamente con una estación meteorológica portátil. Además, con la ayuda de una jeringuilla estéril, se inyectó sustrato a razón de la reducción del volumen en la celda.

2.3.1. *Densidad de corriente generado.*

Con el voltaje, V y la Ley de Ohm, ecuación 2-1, se calculó la densidad de corriente, ecuación 2-2, considerando 1000Ω como resistencia eléctrica de la fibra de carbono (Ning Jiang, Yi-Long Luo 2019, p. 9).

$$I = \frac{V}{R}$$

Ecuación 1-2: Fórmula de la intensidad de corriente

Fuente:(Ning Jiang, Yi-Long Luo 2019, p. 9)

Donde:

I= intensidad (A)

V= voltaje (V)

R= resistencia (Ω)

$$dC = \frac{I}{A}$$

Ecuación 2-2: Fórmula de la densidad de corriente

Donde:

dC = densidad de corriente (A/m^2)

A = área (m^2)

2.4. Determinación de la biopelícula (SEM)

Se cortó 1 cm^2 de la membrana del ánodo, bajo condiciones de asepsia, y estos cortes fueron almacenados en bolsas ziploc estériles, y posteriormente fijados con cinta de carbono para ser examinadas bajo un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-IT100.

2.5. Preparación de la biopelícula para el aislamiento

La membrana del ánodo se enjuagó con agua destilada hasta eliminar los residuos visibles, a continuación fue sumergida en dodecilsulfato sódico SDS (1%) durante 1 hora y entonces se obtuvo una suspensión de bacterias (Sacco, Bonetto y Cortón 2017, p. 3).

2.6. Aislamiento bacteriano

Se preparó un medio compuesto, con el sustrato sintético empleado en las celdas y agar nutritivo, para las siembras en medio sólido, y para las siembras en medio líquido se trabajó con el sustrato sintético y caldo nutritivo.

La suspensión obtenida fue diluida en serie de orden 10 hasta 10^{-6} , y mediante vertido en placa se realizó la respectiva siembra; los cultivos fueron incubados durante 48 horas en una estufa a $22.5^{\circ}C$ (Sacco, Bonetto y Cortón 2017, p. 3).

2.6.1. Caracterización morfológica.

Tras el periodo de incubación se tomaron las colonias más representativas en función de características como la forma, elevación, superficie, consistencia, color, luz reflejada y luz transmitida y se realizaron repiques sucesivos hasta obtener cultivos puros.

Las cepas aisladas fueron replicadas e incubadas en medio sólido durante 72h a 22.5°C para su masificación, luego fueron almacenadas a una temperatura de 4°C y finalmente fueron transportadas en un cooler a temperatura ambiente para su análisis molecular.

2.7. Identificación molecular de bacterias

2.7.1. Extracción y purificación de ADN bacteriano

Se utilizó un kit comercial de extracción y purificación de ADN PureLink® Genomic DNA Kits **ANEXO A**, según se trataba de bacterias Gram positivas o Gram negativas (Life technologies, 2013, pp. 18, 23-24).

La cantidad de ADN fue estimada de acuerdo a la intensidad de las bandas mediante una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cámara horizontal, con bromuro de etidio para la visualización de las bandas y buffer TBE 1X. Se cargaron las muestras en cada pocillo a razón de 2uL de buffer de carga 1X y 4uL de ADN purificado, y se corrió a 110 V durante 30 min (Fierro, 2014, pp. 32-38)

2.7.2. Amplificación del gen 16S ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de la región 16S del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el kit GoTaq® Green Master Mix. Utilizando primers universales, detallados en el **Anexo B**. La programación del termociclador para la PCR fue la siguiente: fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido la fase de hibridación a 54°C durante 15 segundos y finalmente la fase de elongación a 72°C durante 5 minutos, por 40 ciclos. Los primers empleados en la PCR se detallan en la tabla 1-2.

Tabla 1-2. Primers empleados en la PCR

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Especificidad
------------	---------------	------------------------	----------------------

16S ARNr	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria
	1492R	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	Bacteria

Fuente: Thamhesl et al. 2015. Rhodococcus erythropolis MTHt3 biotransforms ergopeptines to lysergic acid
Microbial

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020

Se verificó la amplificación con una corrida de electroforesis en gel de agarosa, utilizando el marcador molecular Labnet de 100bp.

2.7.3. Secuenciación molecular

Los amplicones obtenidos en la PCR fueron etiquetados y enviados al Centro de Investigaciones “Macrogen” de Corea para su secuenciación. Se realizó el envío de aproximadamente 25uL de cada primer empleado, con una concentración de 10pml/uL, y aproximadamente 20uL de cada amplicón, con una concentración de 100ng/uL, según los requerimientos del laboratorio.

2.7.4. Identificación molecular bacteriana

Una vez obtenidas las secuencias de pares de bases, se utilizó el programa Geneious R9.1 y se analizó la calidad de las secuencias de ADN recibidas mediante un análisis forward y reverse. A continuación, se realizó el ensamblaje del forward y el reverse y se generaron las secuencias de ADN. Obtenidas las secuencias consenso, éstas fueron comparadas con en la base de datos de NCBI, mediante la herramienta de BLAST. Se tomó en cuenta la longitud de la cadena, el porcentaje de calidad y el porcentaje de identidad de cada cepa.

2.8. Potencial de generación de bioelectricidad de las cepas identificadas.

Mediante revisión bibliográfica se analizaron las características de las cepas identificadas, verificando que éstas son electrogénicas y seleccionando a los tipos bacterianos anaerobios facultativos, biodegradadores y no patógenos para comprobar experimentalmente la generación de voltaje.

2.9. Reactivación de las MFCs

2.9.1. *Pretratamiento de la membrana anódica.*

La membrana anódica fue sumergida durante una noche en acetona, seguidamente se enjuagó con agua destilada 6 veces, a continuación, fue sumergida en peroxidisulfato de amonio en una concentración de 50g/250mL durante 5 minutos, luego se enjuago con agua destilada, seguido fue sumergida en ácido sulfúrico al 10% durante 15 minutos y finalmente se calentó en una mufla a 450°C durante 20 minutos. Las membranas anódicas y catódicas fueron almacenadas en bolsas ziploc estériles hasta el armado de las celdas.

2.9.2. *Ensamblaje y monitoreo de las MFCs.*

Con las cepas identificadas con potencial de generación de bioelectricidad se emplearon en la reactivación y monitoreo de las celdas de acuerdo a lo mencionado en el ítem 2.2.

2.10. Almacenamiento de cultivos identificados

Las cepas identificadas fueron conservadas en glicerol, mediante una inoculación de la cepa identificada en 1,5ml de una solución estéril de glicerol (1:1) y se mantiene conservada a -22°C. A continuación, se cultivó la muestra en cajas Petri con agar nutritivo para conservar las colonias, se mantuvieron a 22.5°C en la estufa hasta su crecimiento y luego fueron llevadas a refrigeración (4°C). Las muestras originales se mantienen en los tubos de ensayo iniciales a 4°C.

2.11. Diseño experimental

La descripción del comportamiento de las celdas microbianas corresponde a un estudio de tipo descriptivo-exploratorio, seguido del análisis de la producción de bioelectricidad de las bacterias seleccionadas, cuya variable de respuesta fue el voltaje generado.

2.11.1. *Imputación de datos faltantes*

Debido a los datos faltantes correspondientes a las mediciones de voltaje de los días sábado y domingo, se plantea un proceso de relleno de datos mediante RandomForest, por ser un algoritmo que permite la realización de una regresión de información con variables cualitativas y cuantitativas como atributos de explicación (Momento de Muestreo y Voltaje) y permite una variable cualitativa

como clase de salida (Tipo de Bacteria), rellenando los datos en los valores perdidos en los atributos de explicación.

2.11.2. Ley de probabilidad de los datos

Para determinar la prueba de necesaria para la comprobación de diferencias entre el Voltaje y el Tipo de Bacteria y el Momento de Muestreo, se debe determinar la ley de probabilidad de los datos, puesto que si los datos siguen una ley de probabilidad Normal se usarán pruebas paramétricas para el análisis, por el contrario, si no siguen una ley de probabilidad normal, el análisis deberá realizarse con pruebas no paramétricas, las cuales en orden de determinar la ley de probabilidad de los datos, se aplica la Prueba de Normalidad de Anderson Darling, cuyo planteamiento se realiza de la siguiente manera:

Planteamiento de Hipótesis:

H_0 : Los datos se distribuyen mediante ley de probabilidad Normal

H_1 : Los datos no se distribuyen mediante ley de probabilidad Normal

Estadístico de Prueba:

$$A^2 = -n - S$$

Donde:

$$S = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (2i - 1) [\ln F(Y_i) + \ln(1 - F(Y_{n+1-i}))]$$

Donde:

n : total de datos de la muestra.

$F(Y_i)$: distribución de probabilidades acumulada.

Y_i : datos ordenados ascendentemente.

Y_{n+1-i} : datos ordenados descendientemente.

2.11.2.1. *Región de Rechazo:*

Si $A^2 \geq A_t^2$, se rechaza H_0 .

Donde los valores tabulados para la prueba, para niveles de significancia comunes, tabla 2-2:

Tabla 2-2. Niveles de significancia comunes

Nivel de Significancia α	0,10	0,05	0,025	0,01
Valor crítico A_t^2	0,631	0,752	0,873	1,035

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020

O comparando con relación al p – valor:

Si $p - valor < \alpha$, se rechaza H_0 .

2.11.3. *Prueba de Friedman para Comparación de Tratamientos*

Es el análogo no paramétrico del ANOVA de dos vías sin repetición, permitiendo determinar los cambios en una variable respuesta (Voltaje), en una variable explicativa de interés (Tipo de Bacteria) y otra variable de bloque (Momento de toma de muestra), que no es la variable principal, pero que se desea comparar para determinar si provoca un cambio, todo en torno a las medianas, que es una medida de tendencia central robusta. El planteamiento de la prueba es el siguiente:

2.11.3.1. *Planteamiento de Hipótesis:*

H_0 : Las medianas del Voltaje son iguales para todos los tratamientos.

H_1 : Al menos un tratamiento presenta una mediana de Voltaje diferente de las demás (Se debe comparar individualmente)

Estadístico de Prueba:

$$\chi_r^2 = \frac{12}{HK(K+1)} * \sum_{i=1}^k R_c^2 - 3H(K+1)$$

Donde:

H : Número de elementos (hileras, filas)

K : Número de variables relacionadas

R_c : Suma de rangos por columnas

Región de Rechazo:

Si $\chi_r^2 > \chi_{\alpha, k-1}^2$: se rechaza H_0 .

Si $p - valor < \alpha$, se rechaza H_0 .

De rechazarse la hipótesis nula, se debe realizar la comparación dos a dos entre los diferentes niveles de las variables explicativas (Tipo de Bacteria y Momento de muestreo) mediante la prueba de Wilcoxon.

2.11.4. Prueba de Wilcoxon para Comparación de Muestras

Este contraste se aplica cuando se quiere comprobar si 2 muestras tienen medianas iguales. Trabaja con variables al menos de escala ordinal y es paralela a la prueba paramétrica t de comparación de medias. Para realizar la prueba se debe seguir el siguiente procedimiento:

Planteamiento de Hipótesis:

$H_0: \tilde{\mu}_1 = \tilde{\mu}_2$ (Las medianas de los tratamientos son iguales)

$H_1: \tilde{\mu}_1 \neq \tilde{\mu}_2$ (Las medianas de los tratamientos son diferentes)

Estadístico de Prueba:

$$T = \min\{T^+, T^-\}$$

Donde:

T^+ : Diferencias positivas entre los grupos en comparación.

T^- : Diferencias negativas entre los grupos en comparación.

Región de Rechazo:

Si $T < T_{\frac{\alpha}{2},n}$, se Rechaza H_0 .

Si $p - valor < \alpha$, se rechaza H_0 .

2.11.5. Variables

2.11.5.1. Independiente

Bacterias electrogénicas

2.11.5.2. Dependientes

Producción de bioelectricidad (voltaje en corriente directa obtenido). Tiempo de medición (mañana, tarde y noche)

2.11.5.3. Intervinientes

Condiciones de laboratorio, desgaste de las celdas durante el monitoreo.

2.12. Lugar experimental

El trabajo de titulación fue desarrollado en el laboratorio de biotecnología ambiental de la Facultad de Ciencias, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la ciudad de Riobamba y en el laboratorio de Identificación Molecular ID-Gen ubicado en la Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro en la ciudad de Quito.

2.13. Materiales experimentales

Los materiales experimentales utilizados se detallan en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Materiales experimentales empleados.

Etapa de la investigación	Equipos y materiales	Cantidad
Análisis de la biopelícula	Cámara de flujo laminar	1
	microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT100	1
	Lámpara de alcohol	2
	Bolsas ziploc	?
	Pinza	Continuará
	Cinta de carbono	Continuará
Configuración de las MFCs	Celdas de acrílico de 8cmx8cm	
	Tapones de caucho	18
	Fibra de carbono	352cm ²
	Jeringuilla	4
	Pernos galvanizados de ¼" con tuerca	88
	Anemómetro	1
	Destornillador	1
	Llave #8 para tuerca	1
	Cámara de flujo laminar	1
	pH-metro	1
	Monitoreo de las MFCs	Multímetro
DAQ NI USB-6009		1
Lagartos		22
Cable		10 m
Computadora		1
Aislamiento de las bacterias	Cámara de flujo laminar	1
	Probeta de 100ml	2
	Erlenmeyer de 500ml	5
	Balanza analítica	1
	Tubos 10ml	20
	Lámparas de alcohol	2
	Micropipeta 100-1000 ul	1
	Cajas petri	50
	Asa de siembra	1
	Estufa	1
	Autoclave	1
Identificación molecular de bacterias	Cajas petri	28
	Cooler	2
	Microcentrifuga	1
	Baño maría	1

	Micropipeta 0,5-10 ul	1
	Micropipeta 10-100 ul	1
	Micropipeta 100-1000 ul	1
	Cámara horizontal de electroforesis	1
	Tubos ependorf	50
	Peine 12 pocillos	2
	Microondas	1
	Puntas para micropipeta	1000
	Vortex	Continuará
	Termociclador	Continuará
	Cámara de flujo laminar	
	Computadora	1

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2020

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.14. pH y temperatura

En las celdas el pH tuvo un descenso mínimo durante los 15 días de monitoreo, gráfico 1-3, manteniéndose en un rango neutro a ligeramente ácido. La temperatura ambiente media durante los 15 días de monitoreo se mantuvo entre los 22 a 22.5°C.

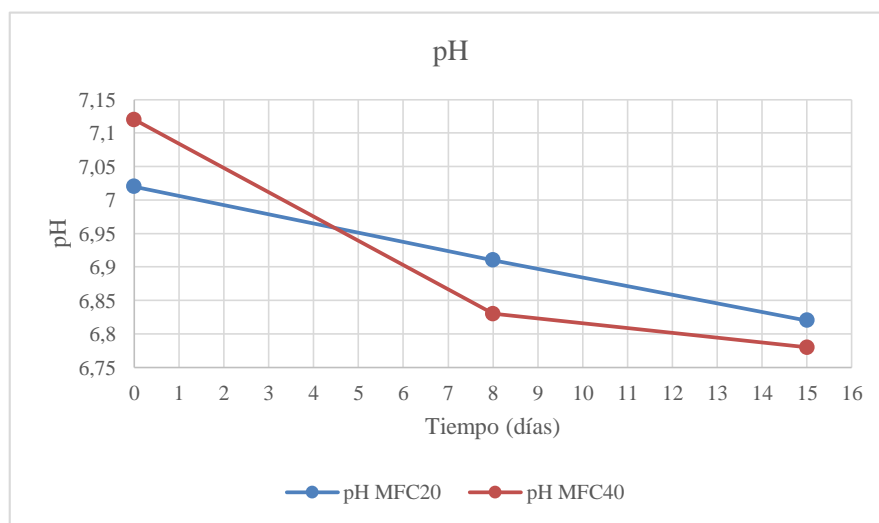


Gráfico 1-3: pH obtenido de las celdas reactivadas

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

2.15. Voltaje, densidad de corriente y densidad de potencia.

El voltaje generado por las celdas tuvo su pico más alto de 845 mV, y 131 mA/m² de densidad de corriente MFC40, el día 1 y MFC20 el día 2; seguido de una fluctuación leve hasta el pico más bajo de 187 mV, 28 mA/m² de densidad de corriente MFC40 el día 9 y 118 mV, 18 mA/m² de densidad

de corriente MFC20 el día 10; seguido de un ascenso mínimo y se estabilizó los 3 días finales de monitoreo en 385 mV y 60 mA/m² (gráfico 2-3).

La relación entre la generación de voltaje, densidad de corriente y el pH en las MFCs tiene que ver con la cantidad de protones presentes en el medio de acuerdo a Stefanova et al. (2018, p.45),trabajocientífico que menciona que a un pH con tendencia básica, >7.5, la producción de bioelectricidad es mayor, y a medida que el pH desciende la producción de bioelectricidad disminuye, lo que concuerda con Leiva-Aravena et al. (2019, p. 3) si solo se toma en cuenta la generación de bioelectricidad.

Si la finalidad es la degradación de contaminantes ácidos, los pHs <7 son ideales, sin embargo, la generación de bioelectricidad disminuye (Huang et al. 2012, p. 168).

El voltaje obtenido en las celdas se muestra similar durante los primeros 10 días de monitoreo, inicia en 845 mV cuando el pH fue de 7, pero al día 9 y 10 disminuye dando como resultado los picos más bajos, de 187 y 118 mV respectivamente,observándose este efecto cuando el pH se torna ligeramente ácido, resultados que concuerdan con Stefanova et al. (2018, p.45) y Leiva-Aravena et al. (2019, p. 3); el voltaje medido durante los últimos 3 días de monitoreo muestra cierta estabilidad (385 mV aproximadamente) que se da mientras el pH sigue bajando, lo que puede sugerir que las bacterias presentes en las celdas estudiadas serían bastante útiles para la degradación de contaminantes ácidos sin que esto afecte considerablemente la producción de bioelectricidad (Huang et al. 2012, p. 168).

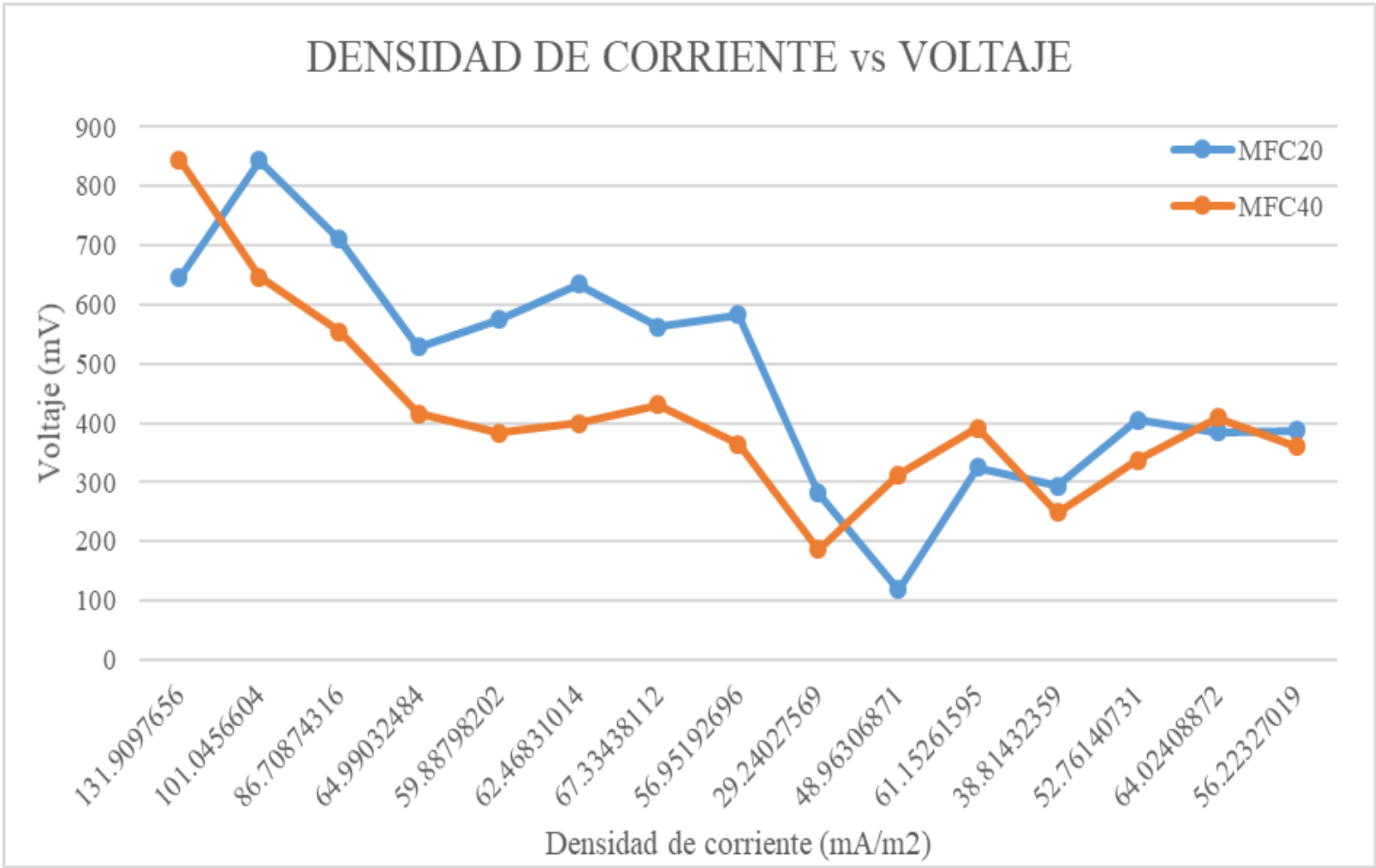


Grafico 2-3: Curva de polarización de voltaje vs densidad de corriente de las MFCs

Realizado por: Marjorie Mazo, 2019

2.16. Biopelícula a través del microscopio electrónico de barrido

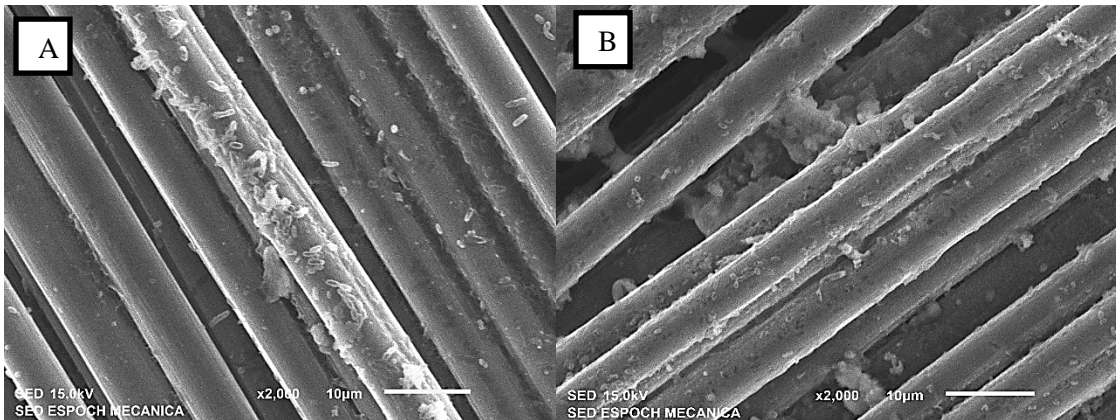


Figura 1-3: Biopelícula vista a través del MEB **A:** MFC40. **B:** MFC20, vistas a 10µm.

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

La microscopía electrónica de barrido de la muestra de la membrana anódica (figura 1-3) tanto de MFC20 como MFC40 mostró la presencia de microorganismos en forma de bacilos adheridos a una matriz de exopolisacáridos que contrasta con lo mencionado por Jayashree et al., (2016, p. 357) que las biopelículas en las MFCs contienen exopolisacáridos, polímeros que permiten a las bacterias formar biopelículas en el ánodo facilitando el transporte de electrones.

2.17. Aislamiento bacteriano

Se obtuvo 13 cepas aisladas, de las cuales 3 pertenecían a la celda MFC20 y 10 a la celda MFC40. Se describió la morfología macroscópica de las bacterias (tabla 1-3) y en la figura 2-2 se observan las colonias aisladas. Cada cepa bacteriana fue replicada 6 veces hasta obtener un cultivo puro (Figura 3-3).

Tabla 1-3: Morfología de bacterias aisladas.

MFC CEPA	FORMA					BORDE				ELEVACIÓN			SUPERFICIE		CONSISTENCIA		COLOR	LUZ REFLEJADA		LUZ TRANSMITIDA		
	CIRCULAR	PUNTIFORME	IRREGULAR	RIZOIDE	FUSIFORME	ENTERO	ONDULADO	LOBULADO	FILAMENTOSO	PLANA	CONVEXA	ELEVADA	LISA	RUGOSA	CREMOSA	MEMBRANOSA		OCAPA	BRILLANTE	TRANSPARENTE	OPACA	TRASLUCIDA
A120	X					X				X			X		X		BLANCA	X			X	
B120	X					X				X			X		X		BEIGE		X			X
A220	X					X				X			X		X		BEIGE		X			X
A140	X					X				X			X		X		BEIGE		X			X
B140	X					X				X			X		X		NARANJA-INTENSO		X		X	
C140	X					X				X			X		X		AMARILLO-VERDOSO		X			X
D140	X					X				X				X	X		BEIGE		X			X
E140	X						X			X			X		X		CREMA		X			X
A240	X					X				X			X		X		AMARILLO-VERDOSO		X			X
B240	X					X				X			X		X		BEIGE		X		X	
C240	X					X				X				X	X		BEIGE		X		X	
D240	X					X				X			X		X		CREMA		X			X
E240			X				X			X				X	X		BEIGE		X		X	

Realizado

por:

Mazo,

Marjorie,

2019

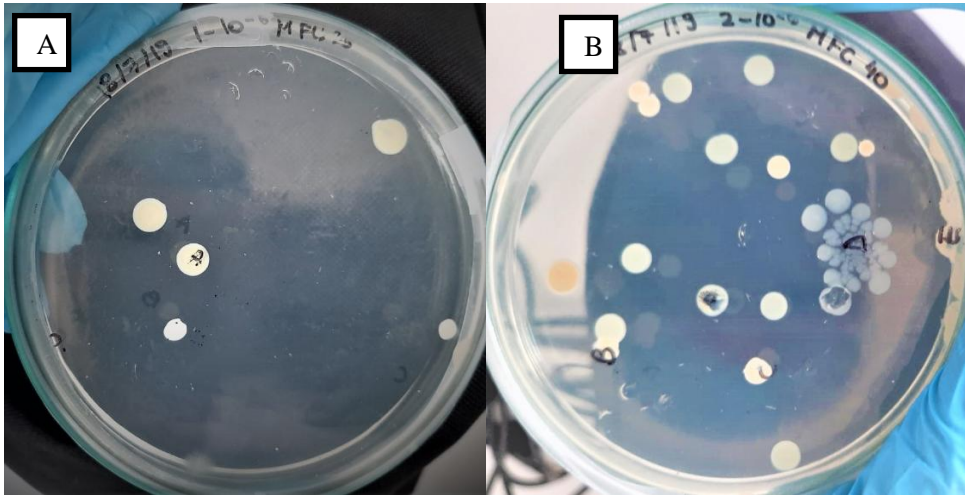


Figura 2-3: Bacterias aisladas A: MFC20. B: MFC40

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

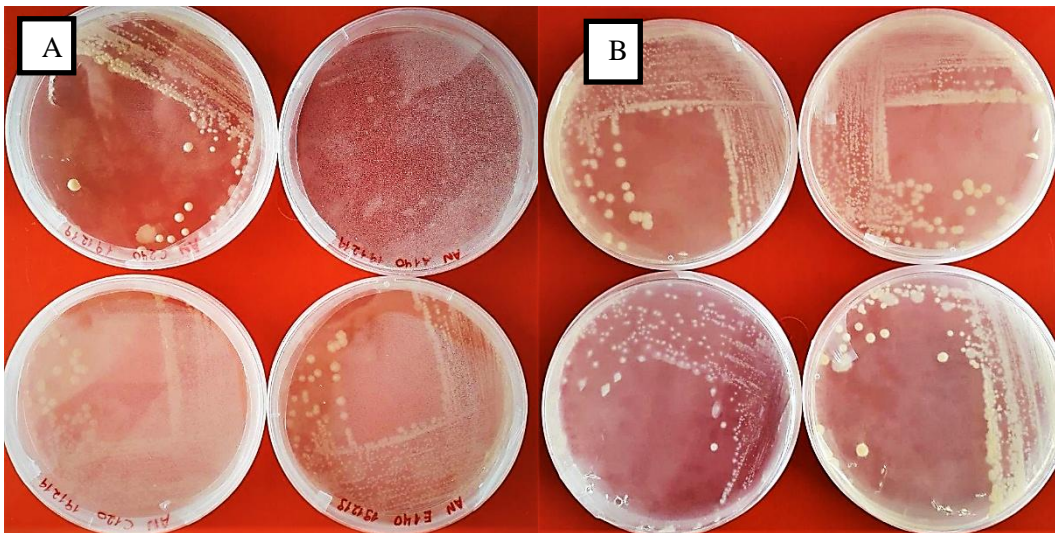


Figura 3-3: Repliques de las bacterias aisladas A: MFC20. B: MFC40

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

2.18. Características microscópicas de las bacterias aisladas.

Las cepas bacterianas fueron caracterizadas microscópicamente mediante tinción Gram (Tabla 2- 3) y vistas a través de un microscopio óptico (Figura 4-3).

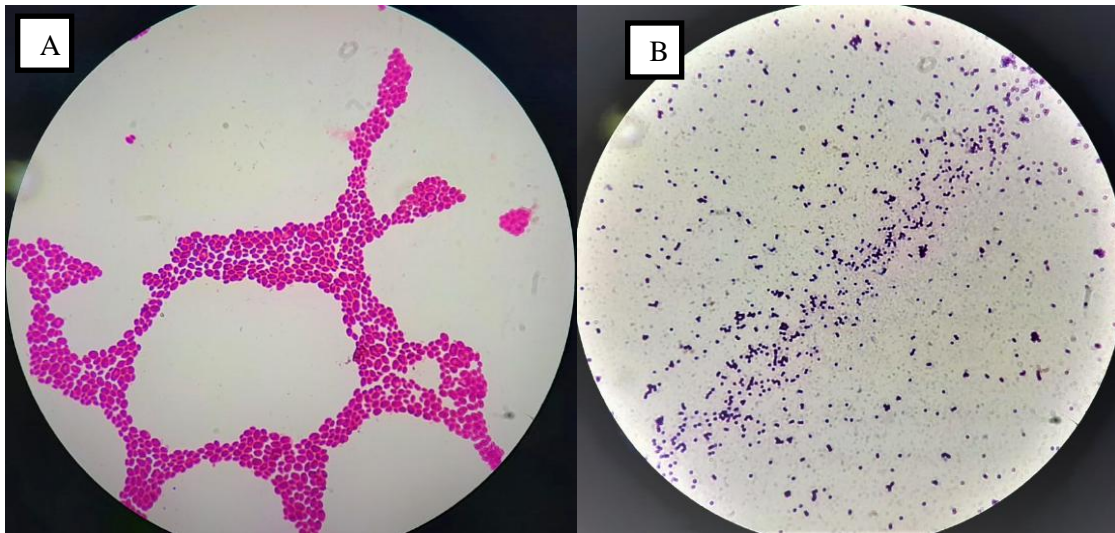


Figura 4-3: Tinción Gram **A:** Cepa B120 Coco Gram - **B:** Cepa B140 Coco Gram +, 100X

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

Tabla 2-3: Tinción Gram de Bacterias aisladas.

N°	BACTERIA	TINCION GRAM	
		TIPO	FORMA
1	A1-40	G+	BACILO
2	B1-40	G+	COCO
3	C1-40	G-	COCO
4	D1-40	G-	COCO
5	E1-40	G-	BACILO
6	A2-40	G-	BACILO
7	B2-40	G-	COCO
8	C2-40	G-	COCO
9	D2-40	G-	BACILO
10	E2-40	G-	COCO
11	A1-20	G+	COCO
12	B1-20	G-	COCO
13	A2-20	G+	BACILO

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

Los bacilos observados mediante microscopía óptica podrían ser los mismos que se observaron de forma más notable mediante microscopía electrónica.

2.19. Extracción y purificación de ADN bacteriano

El ADN bacteriano fue extraído y purificado de acuerdo al kit de extracción citado en la metodología, protocolo que se detalla en el **Anexo C**, se verificó la existencia de ADN mediante una corrida en gel de electroforesis (Figura 5-3).

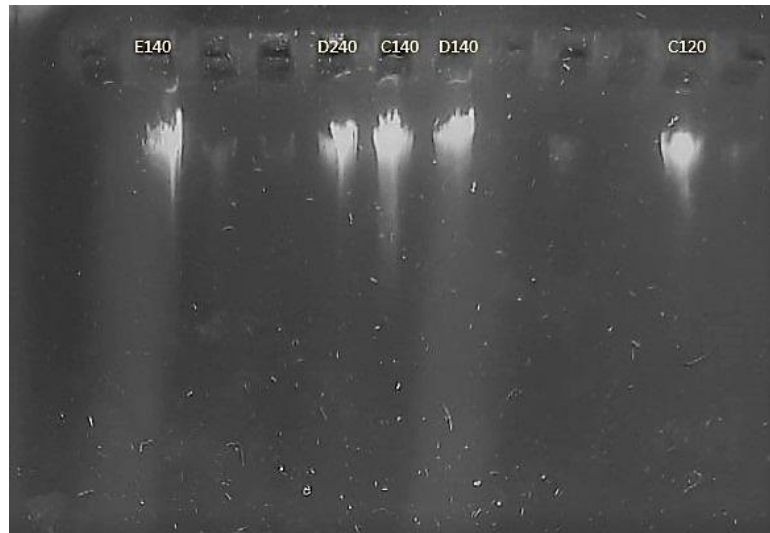


Figura 5-3: Electroforesis del ADN extraído y purificado

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

2.20. Amplificación del Gen ARNr 16S

El ADN bacteriano fue amplificado y se observó el amplicón con una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%, se utilizó el marcador molecular Labnet de 100 bp y las bandas obtenidas desplegaron un tamaño descrito en la figura 6-3.

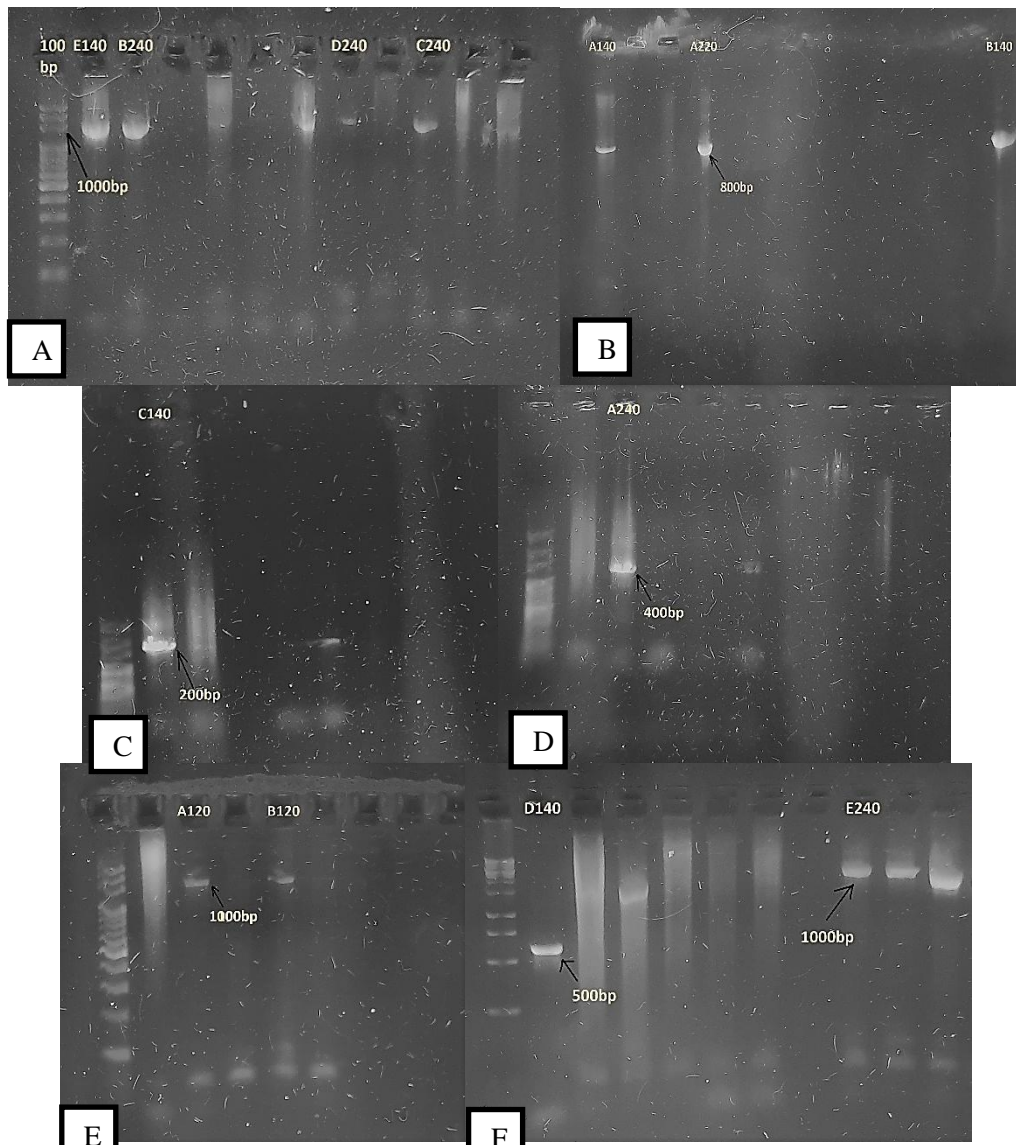


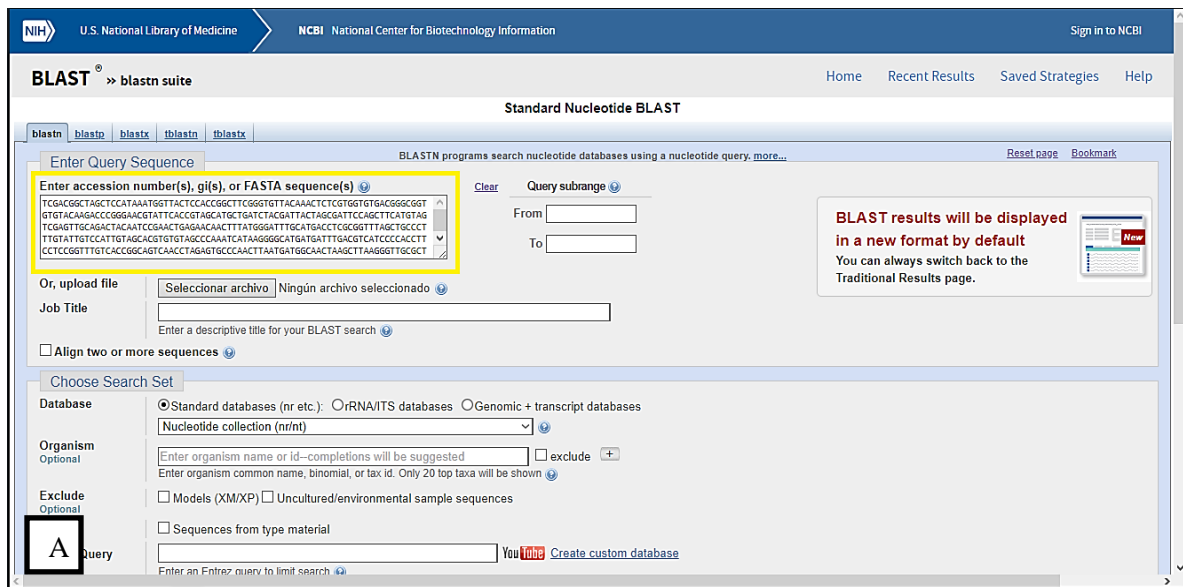
Figura 6-3: Electroforesis de la amplificación del gen ARNr 16S, **A** cepas E140, B240, D240, C240, 1000bp; **B** cepas A140, A220, B140, 800bp; **C** cepa C140, 200bp; **D** cepa A240, 400bp; **E** cepas A120, B120, 1000bp; **F** cepas D140, 500bp, E240, 1000bp.

Realizado por:Marjorie Mazo, 2019

2.21. Secuenciación e identificación molecular.

Las secuencias resultantes fueron ensambladas mediante el programa Geneious 9.0.1 1, y las secuencias consenso obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos NCBI (figura

7-3). De acuerdo al porcentaje de identidad y porcentaje de calidad se identificaron las especies bacterianas más próximas a las secuencias obtenidas (Tabla 3-3)



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download | Manage Columns | Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain 4G163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MK026832.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain 4G155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MK026831.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain 4G31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MK026830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain L29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MG719556.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain WW167 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MH396756.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain WW144 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MH396754.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain WTPi172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MH396742.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain MBL_B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	MF776606.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain G23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	KX343982.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacterium BFL_B6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	KT382401.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NSW25-1	2628	2628	100%	0.0	100.00%	AB697718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. BQN4T-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	FJ380997.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain OTUC3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	100.00%	FJ210844.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain G4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	99%	0.0	100.00%	KX343963.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain Lmb035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	99%	0.0	100.00%	KT986100.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus saprophyticus strain Lmb030 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	99%	0.0	100.00%	KT986100.1

B

Feedback

Figura 7-3: NCBI, A Comparación de la secuencia consenso y B elección del organismo más próximo

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2020

Para una buena identificación molecular bacteriana se sugiere un 99% de identidad, en este contexto los resultados de la secuenciación de las cepas A120, A140, A240, B120, C140, D140 y D240 ofrecen un menor nivel de confiabilidad; el gen ARNr 16S es altamente conservado y su secuencia puede guardar un alto grado de similitud con otras especies, por lo que es preferible utilizar otro par de primers (Sun et al. 2010, p. 473).

Tabla 3-3: Identificación molecular de las bacterias aisladas.

Cepa aislada	Identificación Molecular		Organismo más próximo	N° acceso GenBank	Orden
	% Cal.	% Ident.			
A1-40	62.1	97.24	<i>Delftia acidovorans</i>	MG576160.1	Burkholderiales
A2-20	94.3	99.10	<i>Providencia alcalifaciens</i>	KJ124176.1	Enterobacterales
A2-40*	66.5	97.81	<i>Serratiasp.</i>	KC253774.1	Enterobacterales
A1-20*	56.7	97.92	<i>Stenotrophomonasmaltophilia</i>	AP021867.1	Xanthomonadales
B1-40	98.0	100	<i>Staphylococcusaprophyticus</i>	MK026832.1	Bacillales
B2-40	95.6	100	<i>Rhodococcuserythropolis/ Rhodococcusqingshengii/ Rhodococcusdegradans</i>	CP044284.1C P042917.1 MF980884.1	Corynebacterales
C1-40*	33.7	95.44	<i>Stenotrophomonasmaltophilia</i>	MG714895.1	Xanthomonadales
C2-40	98.4	100	<i>Rhodococcuserythropolis/Rhodococcusqingshengii/Rhodococcusdegradans</i>	CP044284.1C P042917.1MF 980884.1	Corynebacterales
D1-40*	42.4	98.90	<i>Rhodococcuserythropolis</i>	MG835927.1	Corynebacterales
D2-40	72.8	97.44	<i>Citrobacterfreundii</i>	CP040698.1	Enterobacterales
E1-40	96.9	99.43	<i>Providencia alcalifaciens</i>	KJ124176.1	Enterobacterales
B1-20	96.2	99.64	<i>Stenotrophomonasmaltophilia</i>	CP040432.1	Xanthomonadales
E2-40	91.9	99.20	<i>Rhodococcuserythropolis/Rhodococcusqingshengii/Rhodococcusdegradans</i>	CP044284.1 CP042917.1 MF980884.1	Corynebacterales

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2020

A partir de los 14 amplicones secuenciados, una a nivel de género se identificaron 7 especies bacterianas y (tabla 4-3).

Tabla 4-3: Especies bacterianas identificadas

Bacteria identificada	Cepas iguales	N° cepas aisladas obtenidas
<i>Delftia acidovorans</i>	A140	1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	A220, E140	2
<i>Serratiasp.</i>	A240	1
<i>Stenotrophomonasmaltophilia</i>	A120, C140, B120	3
<i>Staphylococcussaprophyticus</i>	B140	1
<i>Rhodococcuserythropolis/</i> <i>Rhodococcusqingshengii/</i> <i>Rhodococcusdegradans</i>	B240, C240, E240	3
<i>Rhodococcuserythropolis</i>	D140	1
<i>Citrobacterfreundii</i>	D240	1

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2019

2.22. Potencial de generación de bioelectricidad de las cepas identificadas

La cepa *Delftia acidovorans* es un bacilo, Gram negativo, aeróbico, no fermentador, resistente a los aminoglucósidos y patógeno (Bilgin et al. 2015, p. 278); presenta características electrogénicas, empleada en MFCs con cátodo expuesto generó un voltaje máximo de 340.75mV (Chen, Chen y Chung 2014, p. 3).

La cepa *Providencia alcalifaciens* es un Gram negativo y patógeno relacionado con la gastroenteritis (Shah et al. 2015, p. 5) y presenta antecedentes de generación de bioelectricidad a nivel de género (Ilamathi, Merline Sheela y Nagendra Gandhi 2019, p. 5).

La cepa *Serratia sp.* es un anaerobio facultativo, Gram negativo y bacilo en la mayoría de especies (Vicente et al. 2016, p. 2); usado en la remoción de metales pesados en MFCs (Huang et al. 2018, p. 65).

La cepa *Stenotrophomonasmaltophilia* es un Gram negativo, aerobio, no fermentativo, móvil y patógeno (Mukherjee y Roy 2016, p. 4); usado en la biorremediación y remoción de metales pesados (Shen et al. 2017, p. 2) y MFCs (Tao et al. 2017, p. 319).

La cepa *Staphylococcussaprophyticus* es un coco, Gram positivo y patógeno (Korte-Berwanger et al. 2013, p. 4526); utilizado en MFCs y reducción de hidrocarburos a nivel de género (Hassan et al. 2018, p. 5).

Las cepas *Rhodococcuserythropolis*, *Rhodococcusqingshengii* y *Rhodococcusdegradans* son un Gram positivos, aerobios facultativos, que de acuerdo a su entorno reacciona como coco o bacilo y de gran importancia en la industria por su remoción de hidrocarburos y compuestos orgánicos (Thamhesl et al. 2015, p. 2)(Khairy, Wübbeler y Steinbüchel 2015, p. 8295); la primera utilizada en la reducción de fenoles y producción de electricidad, generando un máximo de 5,2 W/m³(Huang et al. 2012, p. 169).

La cepa *Citrobacterfreundii* es un Gram negativo, anaerobio facultativo, en forma de bacilo que en ocasiones puede actuar como un patógeno oportunista (Shah et al. 2015, p. 2), utilizado en la remoción de metales pesados y generación de bioelectricidad (Gunasekaran et al. 2011, p. 14915).

De acuerdo a las características de las cepas identificadas, se escogió 3 cepas para el ensayo de bioelectricidad, *Serratiasp.*, *Rhodococcuserythropolis* y *Citrobacterfreundii*, bacterias que presentaron características en bibliografía para la producción de bioelectricidad.

2.23. Reactivación de las celdas de combustible microbiano

Las MFCs fueron reactivadas en tratamientos con las bacterias *Serratiasp.* (A240), *Rhodococcuserythropolis* (D140) y *Citrobacterfreundii* (D240), reactivadas por triplicado y el voltaje generado se muestra en el ANEXO C.

2.23.1. pH y temperatura

las celdas fueron reactivadas en las mismas condiciones de temperatura que las anteriores, y el pH inició neutro, al día 8 de monitoreo tuvo un descenso mínimo a 6.88 y finalmente al día 15 de monitoreo el pH terminó en 6.77. Comportamiento similar al de sus celdas madres (gráfico 4-3).

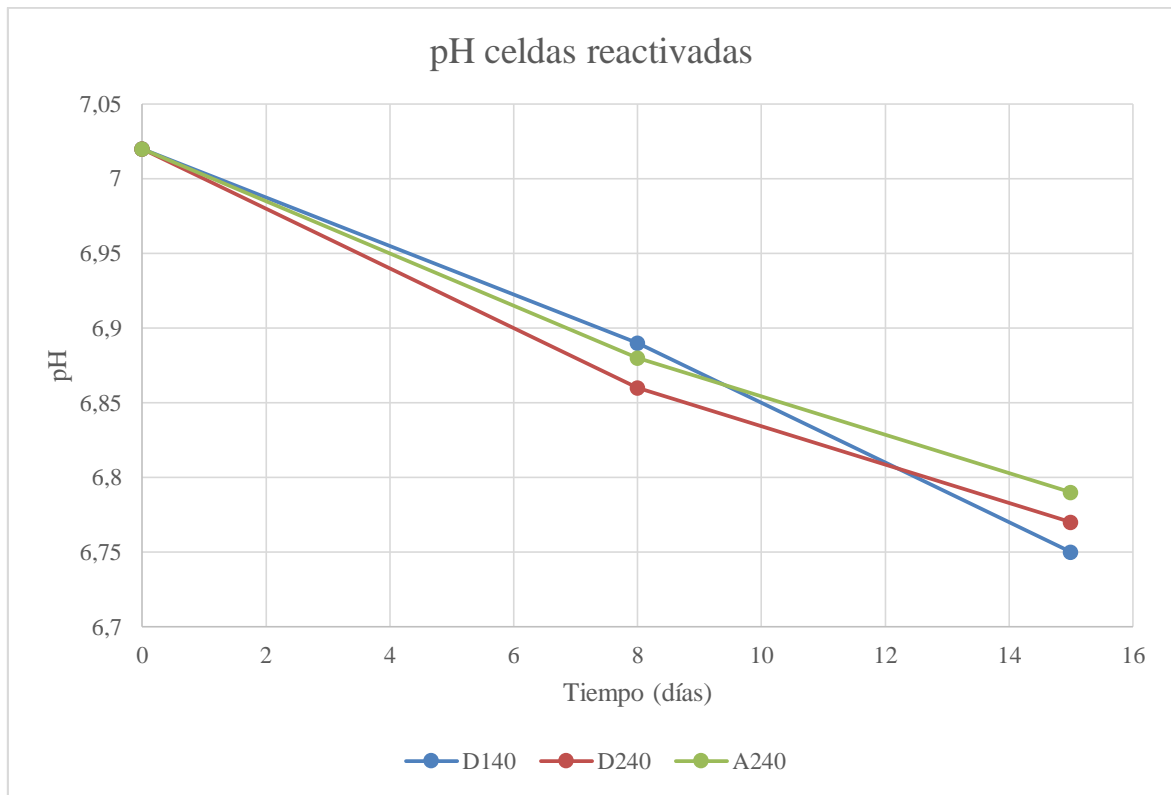


Grafico 3-3: pH de las celdas reactivadas.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

Los valores de voltaje y densidad de corriente máximos y mínimos de las celdas se muestran en la tabla 5-3:

Tabla 5-3: Voltaje y densidad de corriente obtenida en las celdas reactivadas.

D140						D240						A240					
MAX		MIN		X		MAX		MIN		X		MAX		MIN		X	
V*	dC**	V	dC	V	Dc	V	dC	V	dC	V	Dc	V	dC	V	dC	V	Dc
410	64	161	25	310	48	410	59	161	9	135	21	410	58	161	35	301	47
día 1		día 15				día 15	día 8					día 10	día 5				

*: voltaje medido en mV

** : densidad de corriente medida en mA/m²

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

La celda D140 que contenía la cepa *Rhodococcus erythropolis* inicia con el pico más alto de voltaje (410mV) y densidad de corriente (64mA/m²), y al día 15 generó el pico más bajo con 161 mV y 25 mA/m² a un pH ligeramente ácido (6.75), resultados que concuerdan con Huang et al. (2012, pp. 172-173)

donde se trabajó con dicha cepa en consorcio, generando 310 mV a un pH neutro y 70 mV a un pH de 6 en la degradación de pentaclorofenol.

La celda A20 con la cepa *Serratiasp.* muestra el pico más bajo de generación de voltaje (161 mV) y densidad de corriente (35 mA/m²) al día 5 de monitoreo con un pH de 6.88, mientras que el día 10 de monitoreo, cuando el pH sigue disminuyendo (6.88), genera el pico más alto de generación de voltaje (410 mV) y una densidad de corriente (58 mA/m²), lo que concuerda con Huang et al. (2018, p. 62) que menciona que dicha cepa junto con *Stenotrophomonasmaltophilia* y *Achromobacterxylooxidans* genera voltaje a un pH ligeramente ácido en la degradación de cromo y cadmio donde se trabajó a un pH de 5-6 con una generación de 520 mV y 14,22 mA/m², aproximadamente.

La celda D240, *Citrobacterfreundii* inició con 242 mV (**ANEXO C**) a un pH neutro y generó su pico más bajo de voltaje y densidad de corriente el día 8, y el pico más alto el día 15 de monitoreo cuando el pH se torna ligeramente ácido; de acuerdo con Chen, Chen y Chung (2014, p. 6) la cepa en consorcio con *Ochrobactrumintermedium* y *Delftia acidovorans* generó 251 mV y 102 mA/m² a un pH neutro, resultados similares a los obtenidos los primeros días de monitoreo.

De acuerdo con You et al. (2015, p. 44) el trabajo en celdas de combustible microbiano con monocultivos limita la producción de bioelectricidad a comparación de consorcios, dos o más cepas bacterianas, resultados que se reflejan en este estudio, las primeras celdas reactivadas con un consorcio bacteriano no identificado generaron 845 mV como pico más alto y 118 mV como pico más bajo, en cambio cuando se trabajó con cepas aisladas el voltaje disminuyó casi a la mitad. Thamhesl et al. (2015, p. 3) concuerda con lo mencionado, pero explica que la identificación y aislamiento bacteriano es de vital importancia para entender las características propias de cada cepa y sugiere que para mayor generación de voltaje se debe trabajar con consorcios bacterianos previamente identificados.

2.24. Conservación de las especies bacterianas identificadas.

Las cepas identificadas fueron conservadas en glicerol 1:1 a 4°C (Figura 8-3).



Figura 8-3: Cepas bacterianas conservadas en glicerol.

Realizado por: Mazo, Marjorie, 2020

2.25. Comprobación de hipótesis

2.25.1. Ley de probabilidad de los datos

Se determina si los datos cuentan con una ley de probabilidad normal mediante la prueba de Anderson Darling (tabla 6-3):

Tabla 6-3: Prueba de Anderson Darling.

Anderson-Darling normality test

data: datos_imp\$voltaje

A = 10.298, p-value < 2.2e-16

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

Debido a que el p – valor del estadístico de Anderson-Darling es prácticamente 0, menor que cualquier nivel de significancia común, se rechaza la hipótesis nula de la prueba, concluyendo en que los datos de Voltaje no poseen una ley de probabilidad normal en su distribución, razón por la cual se debe proceder con pruebas no paramétricas para su comparación.

2.25.2. *Prueba de Friedman para Comparación de Tratamientos*

Tabla 7-3: Estadístico Chi cuadrado de Friedman

Friedman rank sum test	
data: voltaje, Tipo_bact and Tiempo	
Friedman chi-squared = 6, df = 2, p-value = 0.04979	
Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.	

De acuerdo con el p – valor = 0.0497 obtenido en la tabla 7-3 mediante el estadístico Chi cuadrado de Friedman, este resulta ser apenas menor que un nivel de significancia de 0.05, entonces la hipótesis nula de la prueba se rechaza, determinándose una diferencia en alguno de los tratamientos en estudio con el factor de interés como el Tipo de Bacteria y factor de bloque como el Momento de Muestreo, con lo que se procede a realizar las pruebas de comparación individuales para definir los tratamientos que producen cambios en el Voltaje.

2.25.3. *Pruebade Wilcoxon para Comparación de Pares de Muestras*

Los siguientes cuadros resumen los p – valores de las comparaciones individuales dos a dos de la prueba de comparación de medianas de Wilcoxon (tabla 8-3).

Tabla 8-3: Comparación del Voltaje según el Tipo de bacteria

Pairwise comparisons using wilcoxon rank sum test		
data: voltaje and Tipo_Bact		
A240	D140	
D140	0.54	-
D240	5.2e-12	1.7e-08
P value adjustment method:holm		
Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.		

Según los resultados de la tabla 8-3, se definen p – valores menores a 0.05, resultando en el rechazo de la hipótesis nula en la comparación del Voltaje producido por las bacterias de tipo A240 con la D240 y en las bacterias de tipo D140 con D240, esto significa que se producen cambios

estadísticamente significativos entre los pares de bacterias mencionados, no obstante, en la comparación de las bacterias de tipo A240 y D240, la hipótesis nula no se rechaza, por lo que no existe evidencia suficiente para afirmar que se producen cambios entre los Voltajes producidos por estos dos tipos de bacterias.

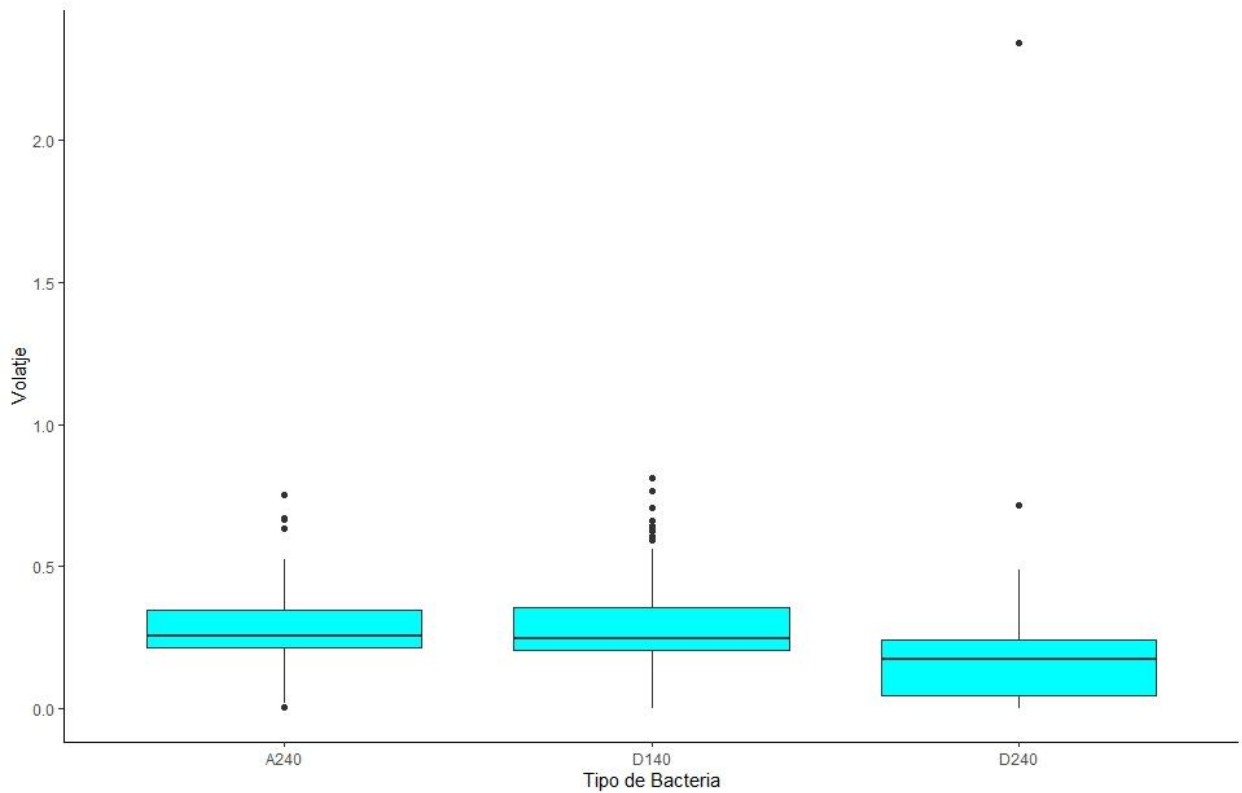


Gráfico 4-3: Comparación del voltaje generado de acuerdo al tipo de bacteria.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

Las diferencias significativas antes mencionadas, mostraban a la bacteria de Tipo D240 con valores que difieren de las bacterias de tipo A240 y la D140, siendo estas dos las que producen mayor Voltaje en comparación con la D240, la cual, a pesar de tener el voltaje más alto en todo el experimento realizado, en general, produce valores de voltaje menores en comparación con los otros tipos de bacteria (gráfico 4-3).

Tabla 9-3: Comparación del Voltaje

Pairwise comparisons using wilcoxon rank sum test	
data:	voltaje and Tiempo
	Mañana Noche

Noche	0.25	-
Tarde	0.66	0.31

P value adjustment method: holm

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

En la tabla 9-3 se observan p – valores por sobre un nivel de significancia de 0.05, por lo que la hipótesis nula no se rechaza, es decir, que los Voltajes medidos no presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el momento en el que se tomó la muestra.

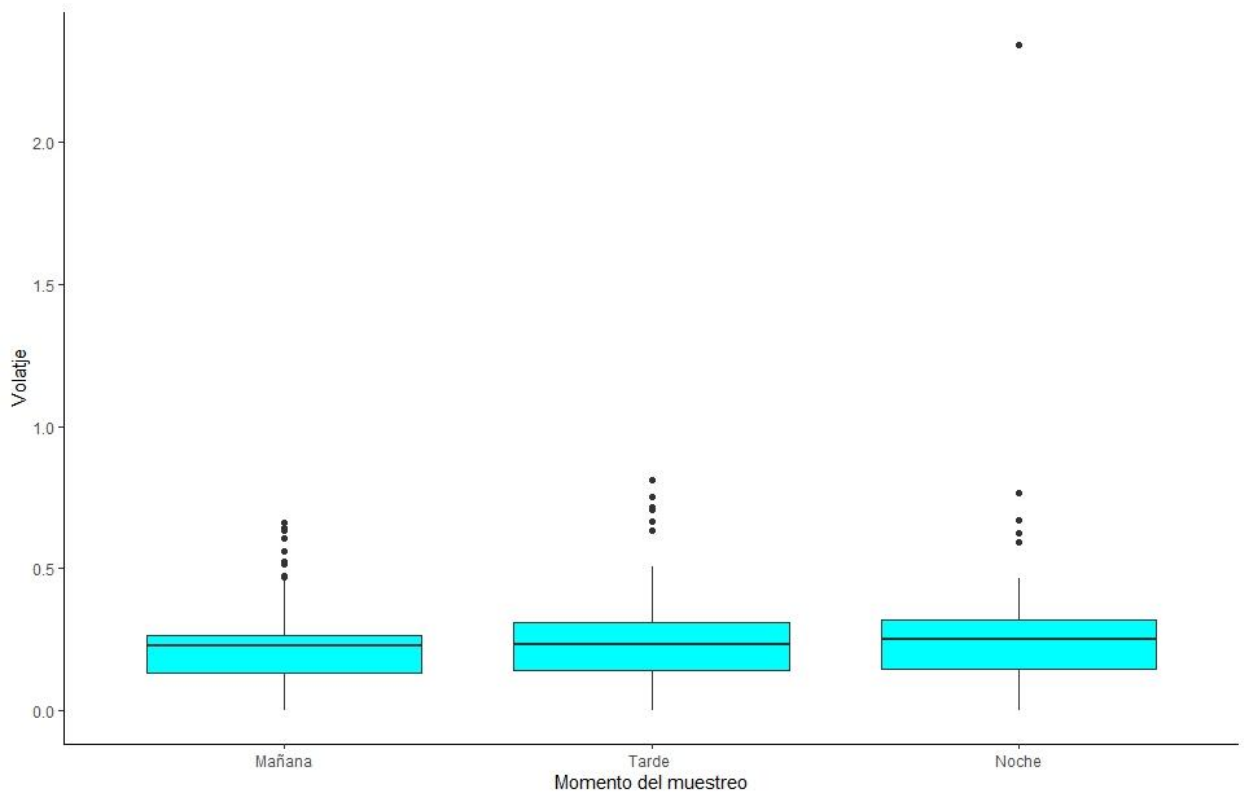


Gráfico 5-3: Comparación del voltaje generado de acuerdo al momento de muestreo.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

En el gráfico 5-3 se determina lo mencionado por la prueba de hipótesis de Wilcoxon, observándose que los Voltajes son similares para los tres instantes en los que se tomó la muestra, a pesar de que en la noche se cuenta con un valor mayor extremo y, en general, con valores ligeramente más altos, en comparación con la mañana y la tarde.

Si bien se observan datos atípicos en las gráficas, al realizar la comparación mediante pruebas no paramétricas, se establecen a las medianas como medidas de tendencia central (no los promedios como suele hacerse en las pruebas paramétricas), las cuales son estimadores robustos, lo que significa que estos no se ven afectados por valores extremos en las pruebas comparación usadas (Ramalle-Gómara & Andrés de Llano, 2003).

CONCLUSIONES

Las celdas de combustible microbianas fueron reactivadas empleando un sustrato sintético análogo al utilizado en investigaciones anteriores, mostrando una fluctuación de voltaje entre 845 mV y un 118 mV, característica que fue de interés para proceder al aislamiento bacteriano a partir de la biopelícula formada en la membrana anódica, de donde se obtuvieron trece colonias representativas en base a sus características morfológicas.

A partir de las colonias caracterizadas, se realizó identificación molecular de las siguientes cepas: *Delftia acidovorans*, *Providencia alcalifaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus erythropolis* y *Citrobacter freundii* y a nivel de género *Serratia sp.*; una cepa presentó 100% de identidad para tres especies *Rhodococcus erythropolis*/ *Rhodococcus qingshengii*/ *Rhodococcus degradans*.

Se realizó la reactivación de tres celdas independientes utilizando las bacterias identificadas como *Serratia sp.*, *Rhodococcus erythropolis* y *Citrobacter freundii*., considerando que éstas corresponden a cepas no patógenas, anaerobias facultativas, degradadoras y buenas productoras de bioelectricidad según referencias bibliográficas. Los resultados de las pruebas de generación de bioelectricidad muestran una producción promedio de 310mV por parte de *Serratia sp.* y *Rhodococcus erythropolis*, mientras que *Citrobacter freundii* generó una media de 133mV.

RECOMENDACIONES

Se propone seguir con investigaciones sobre el uso de estas bacterias en celdas de combustible microbiana con el control de pH.

Se sugiere continuar con estudios sobre el uso de estas celdas de combustible microbianas en procesos de degradación de contaminantes ácidos.

Proponer ensayos de generación de bioelectricidad a partir de consorcios bacterianos formulados con las cepas aisladas.

BIBLIOGRAFÍA

BEEGLE, J.R. y BOROLE, A.P. Exoelectrogens for Microbial Fuel Cells ☆ [en línea]. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640178. 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64017-8.00011-7>.

BHUNIA, P. y DUTTA, K. Biochemistry and Electrochemistry at the Electrodes of Microbial Fuel Cells [en línea]. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640178. 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64017-8.00016-6>.

BILGIN, H., et. al. Delftia acidovorans: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, vol. 26, no. 5, pp. 277–279. ISSN 19181493. 2015. DOI 10.1155/2015/973284.

BOU, G., et. al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 29, no. 8, pp. 601–608. ISSN 0213005X. 2011. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012.

CHEN, C.Y., CHEN, T.Y. y CHUNG, Y.C. A comparison of bioelectricity in microbial fuel cells with aerobic and anaerobic anodes. *Environmental Technology (United Kingdom)*, vol. 35, no. 3, pp. 286–293. ISSN 09593330. 2014. DOI 10.1080/09593330.2013.826254.

DUTTA, K. y KUNDU, P.P. A review on aromatic conducting polymers-based catalyst supporting matrices for application in microbial fuel cells. *Polymer Reviews*, vol. 54, no. 3, pp. 401–435. ISSN 15583716. 2014. DOI 10.1080/15583724.2014.881372.

DUTTA, K. y KUNDU, P.P. Introduction to Microbial Fuel Cells [en línea]. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640178. 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64017-8.00001-4>.

FARIAS, I.P.N.G. Análisis técnico-económico de la tecnología de celdas bioelectroquímicas microbianas para la producción de energías alternas. 2016.

FIERRO, F.F. Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, pp. 27–52. 2014.

GRIMNES, S. y MARTINSEN, Ø.G. Introduction. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*, pp. 1–2. 2007. DOI 10.1016/b978-012303260-7/50001-0.

GUNASEKARAN, G., et. al. Microbial fuel cell constructed with micro-organisms isolated from industry effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* [en línea], vol. 36, no. 22, pp. 14914–14922. ISSN 03603199. 2011. DOI 10.1016/j.ijhydene.2011.03.031. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.031>.

HASSAN, H., et. al. Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: Microbial consortia could make differences. *Chemical Engineering Journal* [en línea], vol. 332, pp. 647–657. ISSN 13858947. 2018. DOI 10.1016/j.cej.2017.09.114. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.114>.

HERNÁNDEZ, A. y OLVERA, A. Bacterias Electrogénicas. [en línea], pp. 4–10. 2017. Disponible en: <http://news.wisc.edu>.

HUANG, L., et. al. Reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol in biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology* [en línea], vol. 111, pp. 167–174. ISSN 18732976. 2012. DOI 10.1016/j.biortech.2012.01.171. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.171>.

HUANG, L., et. al. Removal of binary Cr(VI) and Cd(II) from the catholyte of MFCs and determining their fate in EAB using fluorescence probes. *Bioelectrochemistry* [en línea], vol. 122, pp. 61–68. ISSN 1878562X. 2018. DOI 10.1016/j.bioelechem.2018.02.010. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.010>.

ILAMATHI, R., MERLINE SHEELA, A. y NAGENDRA GANDHI, N. Comparative evaluation of *Pseudomonas* species in single chamber microbial fuel cell with manganese coated cathode for reactive azo dye removal. *International Biodeterioration and Biodegradation* [en línea], vol. 144, no. July, pp. 104744. ISSN 09648305. 2019. DOI 10.1016/j.ibiod.2019.104744. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104744>.

JAYASHREE, C., et. al. Treatment of seafood processing wastewater using up flow microbial fuel cell for power generation and identification of bacterial community in anodic biofilm. *Journal of Environmental Management* [en línea], vol. 180, pp. 351–358. ISSN 0301-4797. 2016. DOI 10.1016/j.jenvman.2016.05.050. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.050>.

KARP, G. Biología celular y molecular, séptima edición: Conceptos y experimentos. *S.l.: McGraw-Hill*. ISBN 9781456239503. 2014.

KHAIRY, H., WÜBBELER, J.H. y STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of the Organic Disulfide 4, 4 = -Dithiodibutyric Acid by. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 24, pp. 8294–8306. 2015. DOI 10.1128/AEM.02059-15.Editor.

KORTE-BERWANGER, M., et. al. Significance of the d-serine-deaminase and d-serine metabolism of staphylococcus saprophyticus for virulence. *Infection and Immunity*, vol. 81, no. 12, pp. 4525–4533. ISSN 00199567. 2013. DOI 10.1128/IAI.00599-13.

LEIVA-ARAVENA, E., et. al. Organotrophic acid-tolerant microorganisms enriched from an acid mine drainage affected environment as inoculum for microbial fuel cells. *Science of the Total Environment* [en línea], vol. 678, pp. 639–646. ISSN 18791026. 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.05.003. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.003>.

LI, M., et. al. Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity. *Biotechnology Advances* [en línea], vol. 36, no. 4, pp. 1316–1327. ISSN 07349750. 2018. DOI 10.1016/j.biotechadv.2018.04.010. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.010>.

LI, X., et. al. Carbon fiber enhanced bioelectricity generation in soil microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics* [en línea], vol. 85, no. May, pp. 135–141. ISSN 18734235. 2016. DOI 10.1016/j.bios.2016.05.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.001>.

LIFE TECHNOLOGIES. PureLink ® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. *PureLink Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA*, no. 25, pp. 1–48. 2013.

LIGHT, S.H., et. al. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature* [en línea], vol. 562, no. 7725, pp. 140–157. ISSN 14764687. 2018. DOI 10.1038/s41586-018-0498-z. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>.

MOHAN, S.V., et. al. Microbial Electrochemical Technology. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640529. 2018.

MUKHERJEE, P. y ROY, P. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Frontiers in*

Microbiology, vol. 7, no. JUN, pp. 1–14. ISSN 1664302X. 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.00967.

NANDY, A. y KUNDU, P.P. Configurations of Microbial Fuel Cells [en línea]. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640178. 2018. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640178000038>.

NING JIANG, YI-LONG LUO, S.T. Convergence from two-fluid incompressible Navier-Stokes-Maxwell system with Ohm's law to solenoidal Ohm's law: classical solutions. *Journal of Differential Equations* [en línea], vol. 1, pp. 1–28. ISSN 0022-0396. 2019. DOI 10.1016/j.jde.2019.12.006. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jde.2019.12.006>.

PANT, D., et. al. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource technology* [en línea], vol. 101, no. 6, pp. 1533–43. ISSN 1873-2976. 2010. DOI 10.1016/j.biortech.2009.10.017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892549>.

RAHIMNEJAD, M., et. al. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering Journal* [en línea], vol. 54, no. 3, pp. 745–756. ISSN 11100168. 2015. DOI 10.1016/j.aej.2015.03.031. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031>.

REVELO, D.M. y HURTADO, N.H. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica Microbial Fuel Cells (MFCs): A Challenge for the Removal of Organic Matter and Electricity Generation. *Información Tecnológica*, vol. 24, no. 6, pp. 17–28. ISSN 0718-0764. 2013. DOI 10.4067/S0718-07642013000600004.

SACCO, N.J., BONETTO, M.C. y CORTÓN, E. Isolation and characterization of a novel electrogenic bacterium, *Dietzia* sp. RNV-4. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 2, pp. 1–20. ISSN 19326203. 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0169955.

SHAH, M.M., et. al. First report of a foodborne *Providencia alcalifaciens* outbreak in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 93, no. 3, pp. 497–500. ISSN 00029637. 2015. DOI 10.4269/ajtmh.15-0126.

SHEN, J., et. al. Correlation between circuit current, Cu(II) reduction and cellular electron transfer in EAB isolated from Cu(II)-reduced biocathodes of microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* [en línea], vol. 114, pp. 1–7. ISSN 1878562X. 2017. DOI

10.1016/j.bioelechem.2016.11.002. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.11.002>.

STEFANOVA, A., et. al. Influence of electrical conductivity and temperature in a microbial fuel cell for treatment of mining waste water. *Annals of the Constantin Brancusi University of Targu Jiu-Letters & Social Sciences Series*, vol. 3, pp. 18–24. 2018.

SUN, M., et. al. Microbial communities involved in electricity generation from sulfide oxidation in a microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* [en línea], vol. 26, no. 2, pp. 470–476. ISSN 09565663. 2010. DOI 10.1016/j.bios.2010.07.074. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.074>.

TAO, Y., et. al. Fluorescent probe based subcellular distribution of Cu(II) ions in living electrotophs isolated from Cu(II)-reduced biocathodes of microbial fuel cells. *Bioresource Technology* [en línea], vol. 225, pp. 316–325. ISSN 18732976. 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2016.11.084. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.084>.

THAMHESL, M., et. al. Rhodococcus erythropolis MTHt3 biotransforms ergopeptines to lysergic acid Microbial biochemistry, physiology and metabolism. *BMC Microbiology* [en línea], vol. 15, no. 1, pp. 1–13. ISSN 14712180. 2015. DOI 10.1186/s12866-015-0407-7.

VEERUBHOTLA, R., VARANASI, J.L. y DAS, D. Biofilm Formation Within Microbial Fuel Cells [en línea]. *S.l.: Elsevier B.V.* ISBN 9780444640178. 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64017-8.00012-9>.

VICENTE, C.S.L., et. al. The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC Genomics* [en línea], vol. 17, no. 1, pp. 1–15. ISSN 14712164. 2016. DOI 10.1186/s12864-016-2626-1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2626-1>.

WATSON, J., et. al. *Biologia Molecular del Gen*. S.l.: s.n. ISBN 8479035056. 2006.

XIA, C., et. al. Models for Microbial Fuel Cells: A critical review. *Journal of Power Sources* [en línea], vol. 373, no. October 2017, pp. 119–131. ISSN 03787753. 2018. DOI 10.1016/j.jpowsour.2017.11.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.11.001>.

YOU, J., et. al. Stability and reliability of anodic biofilms under different feedstock conditions:

Towards microbial fuel cell sensors. *Sensing and Bio-Sensing Research*, ISSN 22141804. 2015. DOI 10.1016/j.sbsr.2015.11.007.

ZHI, W., et. al. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresource Technology* [en línea], vol. 171, pp. 461–468. ISSN 18732976. 2014. DOI 10.1016/j.biortech.2014.08.096. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.096>.

ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO PURELINK® GENOMIC DNA KITS

Gram Negative Bacterial Cell Lysate	Use the following protocol to prepare Gram negative bacterial cell lysate.	
	1.	Set a water bath or heat block at 55°C.
	2.	Harvest up to 2×10^9 Gram negative (~1 mL of overnight <i>E. coli</i> culture) by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
	3.	Resuspend the cell pellet in 180 μ L PureLink® Genomic Digestion Buffer. Add 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit) to lyse the cells. Mix well by brief vortexing.
	4.	Incubate the tube at 55°C with occasional vortexing until lysis is complete (30 minutes to up to 4 hours).
	5.	Add 20 μ L RNase A (supplied with the kit) to the lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
	6.	Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
	7.	Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution. Note: When processing multiple samples, you may prepare a master Buffer/ ethanol Mix by mixing 200 μ L Lysis/Binding Buffer and 200 μ L 96–100% ethanol for each sample.
8.	Proceed to Binding DNA (page 23).	
Gram Positive Bacterial Cell Lysate	Use the following protocol to prepare Gram positive bacterial cell lysate.	
	1.	Set two water baths or heat blocks at 37°C and 55°C, respectively.
	2.	Prepare Lysozyme Digestion Buffer (see recipe on page 15). To ~200 μ L Lysozyme Digestion Buffer/sample, add fresh Lysozyme to obtain a final Lysozyme concentration of 20 mg/mL.
	3.	Harvest up to 2×10^9 Gram positive cells by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
	4.	Resuspend the cell pellet in 180 μ L Lysozyme Digestion Buffer containing Lysozyme from Step 2. Mix well by brief vortexing.
	5.	Incubate at 37°C for 30 minutes.
	6.	Add 20 μ L Proteinase K (supplied with the kit). Mix well by brief vortexing.
	7.	Add 200 μ L PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by brief vortexing.
	8.	Incubate at 55°C for 30 minutes.
	9.	Add 200 μ L 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
10.	Proceed to Binding DNA (page 23).	
Washing DNA	Add 500 μ L Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.	
	1.	
	2.	Centrifuge column at room temperature at $10,000 \times g$ for 1 minute.

	3.	Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® collection tube supplied with the kit.
	4.	Add 500 µL Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.
	5.	Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
	6.	Proceed to Eluting DNA .
Eluting DNA	1.	Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.
	2.	Add 25–200 µL of PureLink® Genomic Elution Buffer to the column. See Elution Parameters (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.
	3.	Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. <i>The tube contains purified genomic DNA.</i>
	4.	To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.
	5.	Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature. <i>The tube contains purified DNA.</i> Remove and discard the column.
Storing DNA	1.	Store the purified DNA at –20°C or use DNA for the desired downstream application.
	2.	For long-term storage, store the purified DNA in PureLink® Genomic Elution Buffer at –20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.
	3.	To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at –20°C for long-term storage.

Fuente: Life technologies 2013. PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA

ANEXO B: REACTIVOS EMPLEADOS EN LA MASTER MIX PARA LA PCR

Reactivo (s)	Cantidad uL
Agua ultrapura para PCR	7
kit GoTaq® Green Master Mix	13
BSA	0,5
ADN bacteriano	Muy intenso 1 Intenso 2 Poco intenso 3
Primer 27F	1,5
Primer 1492R	1,5

Fuente: Jayashree et al. 2016. Treatment of seafood processing wastewater using up flow microbial fuel cell for power generation and identification of bacterial community in anodic biofilm.

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.

ANEXO C: MEDICIÓN DE VOLTAJE DE LAS CELDAS REACTIVADAS

TIEMPO (días)	D140 (mV)	A240 (mV)	D240 (mV)
1	410.833333	356.5	242.333333
2	334.555556	325.777778	145.555556
3	297.666667	279.444444	137.222222
4	280.522222	262.333333	94.755556
5	184.866667	228.644444	96.222222
6	354.544444	316.777778	106.988889
7	353.966667	319.311111	103.988889
8	320.366667	337.122222	63.555556
9	350.844444	233.1	109.011111
10	317.311111	371.888889	120.655556
11	350.844444	233.1	109.011111
12	233	263.644444	127.477778
13	355.055556	317.077778	102.611111
14	349.666667	316.522222	101.011111
15	161.477778	362.522222	378.466667

Realizado por: Marjorie Mazo, 2020.