



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

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CULTIVOS AXÉNICOS
PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS MEDIANTE CELDAS
DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: JOMAYRA KAROLINA RIVAS VELEZ

DIRECTORA: Ing. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Jomayra Karolina Rivas Vélez

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

Yo, JOMAYRA KAROLINA RIVAS VÉLEZ, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. 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, 26 de abril de 2022

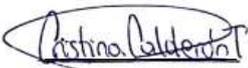


Jomayra Karolina Rivas Vélez

080460116-9

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Proyecto de Investigación, **CHARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CULTIVOS AXÉNICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS MEDIANTE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS**, realizado por la señorita: **JOMAYRA KAROLINA RIVAS VELEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Johanna Elizabeth Ayala Izurieta MSc. PRESIDENTA DEL TRIBUNAL		2022-04-26
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-04-26
Ing. Juan Carlos González García PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-04-26

DEDICATORIA

A mis padres Olinda y Néxar por su amor, apoyo, confianza y esfuerzo, por haberme forjado como la persona que soy, me formaron con reglas y algunas libertades, pero siempre motivándome a alcanzar mis anhelos. A mis hermanos, sobre todo a mi hermana Johana por estar siempre pendiente de mí. A mis primas por darme ánimos y buenos deseos. A ti Adri, por ser mi apoyo, por tu amor y cariño y brindarme tu compañía en los momentos más difíciles. A Eli por ser mi amiga y compañera, siempre presta a regalarme una sonrisa, animarme y compartir alegrías conmigo.

Jomayra

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su nivel académico, al grupo de investigación GIDAC por abrirme las puertas y darme la oportunidad de descubrir nuevas áreas para expandir mi conocimiento. A la Ing. Cristina Calderón y el Ing. Alex Guambo por su asesoramiento, paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo del trabajo de investigación realizado. A mi familia, pareja y amigos por su apoyo.

Jomayra

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Bacterias.....	5
1.2. Bacterias electrogénicas.....	5
1.3. Métodos de aislamiento e identificación bacteriana.....	5
1.3.1. Aislamiento bacteriano.....	5
1.3.2. Técnicas de aislamiento bacteriano.....	6
1.4. Identificación bacteriana.....	7
1.4.1. Métodos fenotípicos.....	7
1.4.2. Métodos proteómicos.....	7
1.4.3. Métodos moleculares.....	7
1.5. Etapas de la identificación molecular.....	8
1.5.1. Extracción de ADN bacteriano.....	8
1.5.2. Amplificación de ADN bacteriano.....	9
1.5.3. Secuenciación de ADN bacteriano.....	9
1.5.4. Análisis de la secuencia.....	10
1.6. Bioelectricidad.....	11
1.7. Celdas de combustible microbianas.....	11
1.7.1. Componentes de la MFC.....	11
1.7.2. Tipos de celda de combustible microbiana.....	13
1.7.3. Modo de operación de una MFC.....	14
1.7.4. Principio de las MFCs.....	16
1.8. Contaminación hídrica.....	17
1.8.1. Contaminación de aguas subterráneas.....	17
1.8.2. Contaminación hídrica causada por RSU.....	17

1.9.	Lixiviados	18
1.9.1.	<i>Lixiviados de vertederos</i>	18
1.9.2.	<i>Tipos de lixiviados de acuerdo con la composición fisicoquímica</i>	19
1.9.3.	<i>Tratamiento de lixiviados</i>	19

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1.	Localización del Estudio	21
2.2.	Tipo de investigación	21
2.3.	Población de estudio	21
2.4.	Tamaño de la muestra	22
2.5.	Obtención de bacterias electrogénicas	23
2.5.1.	<i>Obtención de bacterias aisladas</i>	23
2.5.2.	<i>Identificación molecular</i>	24
2.6.	Celdas microbianas con propósitos bioelectrogénicos	28
2.6.1.	<i>Pruebas de ensayo</i>	28
2.6.2.	<i>Diseño y construcción de las MFCs</i>	30
2.7.	Monitoreo y seguimiento de la investigación	32
2.7.1.	<i>Análisis de lixiviados</i>	32
2.7.2.	<i>Operacionalización de las MFCs</i>	33
2.8.	Materiales experimentales	34
2.9.	Planteamiento de hipótesis	35
2.9.1.	<i>Hipótesis Textual</i>	35
2.9.2.	<i>Hipótesis estadística</i>	35
2.9.2.1.	<i>Hipótesis estadística causal bivariada</i>	36
2.9.3.	<i>Variables</i>	36

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1.	Análisis y discusión de resultados	37
3.1.1.	<i>Obtención de bacterias electrogénicas</i>	37
3.1.2.	<i>Identificación molecular</i>	37
3.1.3.	<i>Celdas microbianas con propósitos bioelectrogénicos</i>	39
3.1.4.	<i>Monitoreo y seguimiento de la investigación</i>	41

3.1.5.	<i>Operacionalización de las MFCs</i>	43
3.1.6.	<i>Prueba de hipótesis</i>	46
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Características de los lixiviados de vertedero con diferentes periodos	19
Tabla 2-1:	Alternativas para el tratamiento de lixiviados	20
Tabla 1-2:	Preparación de Master Mix	26
Tabla 2-2:	Recursos utilizados en el desarrollo de la investigación	34
Tabla 1-3:	Identificación molecular de microorganismos aislados.....	38
Tabla 2-3:	Nomenclatura de los tratamientos aplicados	39
Tabla 3-3:	Fecha y hora de los muestreos de los residuos sólidos (frutas y verduras)	41
Tabla 4-3:	Resultados de análisis de lixiviados previo y al final de la experimentación.....	41
Tabla 5-3:	Porcentajes de remoción de contaminantes de diferentes tratamientos de lixiviados	43
Tabla 6-3:	Promedio de voltaje generado en milivoltios	43
Tabla 7-3:	pH medido diario de las MFCs durante la experimentación	45
Tabla 8-3:	Pruebas de normalidad	47
Tabla 9-3:	Rangos obtenidos con la prueba Mann-Whitney.....	47
Tabla 10-3:	Estadístico de prueba	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	10
Figura 2-1:	Esquema de una MFC en modo continuo	15
Figura 3-1:	Esquema básico de una MFC en modo Batch.....	15
Figura 4-1:	Construcción básica de una MFC	16
Figura 1-2:	Instalaciones de monitoreo de las MFCs	21
Figura 2-2:	Medición de la precipitación.....	22
Figura 3-2:	Siembra de cultivos axénicos.....	24
Figura 4-2:	Extracción de ADN bacteriano	25
Figura 5-2:	Cuantificación de ADN en nanodrop.....	26
Figura 6-2:	Termociclador	27
Figura 7-2:	Cámara de electroforesis	27
Figura 8-2:	Monitoreo de MFCs en pruebas de ensayo	28
Figura 9-2:	Esterilización de compartimentos en UV.....	29
Figura 10-2:	Tratamiento de membranas anódicas	30
Figura 11-2:	Diseño de las MFCs	30
Figura 12-2:	Adición del inóculo a las MFCs.....	31
Figura 13-2:	Esquema del ensamblaje de las MFCs.....	32
Figura 14-2:	Operacionalización de MFCs.....	34
Figura 1-3:	Visualización en gel de agarosa	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Variación de voltaje producido en la celda (DA+Lixiviado)	40
Gráfico 2-3:	Variación de voltaje producido en la celda (DA+Glucosa).....	40
Gráfico 3-3:	Voltaje generado por las MFCs.....	44
Gráfico 4-3:	Voltaje generado por las MFC C1CH	44
Gráfico 5-3:	pH de las MFCs durante la experimentación	45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS INICIAL DE LA MUESTRA DE LIXIVIADOS

ANEXO B: ANÁLISIS FINAL DE LAS MUESTRAS DE LIXIVIADOS TRATADAS

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar molecularmente cultivos axénicos provenientes de una biopelícula anódica formada por microorganismos de suelo de páramo para el tratamiento de lixiviados de frutas y verduras procedentes del Mercado Mayorista de la ciudad de Riobamba mediante celdas de combustible microbianas en flujo continuo. Para la experimentación, como inóculo se seleccionó la bacteria *Delftia acidovorans* obtenida por identificación molecular y una solución de suelo de páramo para la realización de dos tratamientos por triplicado. Se realizó un análisis de la muestra de lixiviados antes y después de la experimentación por métodos estándar. Se construyó celdas de configuración simple con volumen de operación de 510 mL, se empleó un sistema de adquisición de datos con un Arduino 1, y 3 conversores análogos ads1115 I2c para recolectar automáticamente datos de voltaje cada 60 segundos en un ordenador durante 15 días. Se realizó la medición de pH de las seis celdas cada día y el tiempo de retención hidráulico considerado fue de 24 horas para la recirculación del sustrato. El análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas en la producción de voltaje y remoción de contaminantes en ambos tratamientos. El voltaje promedio obtenido por el cultivo puro fue de 127.98 mV y el de suelo de páramo de 122.9 mV, ambos casos tuvieron porcentajes de remoción de materia orgánica medida en demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno y nitrógeno amoniacal similares, sin embargo, el tratamiento con suelo de páramo arrojó porcentajes de remoción mayores. Se concluye que los cultivos axénicos y heterótrofos empleados en la muestra de lixiviados con alimentación en flujo continuo favorecieron el aumento de pH, la producción de bioelectricidad y remoción de materia orgánica. Se recomienda realizar tratamientos empleando cultivos bacterianos mixtos para maximizar la obtención de voltaje y remoción de cargas contaminantes.

Palabras clave: <BIOELECTRICIDAD>, <CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (MFC)>, <BACTERIAS ELECTROGÉNICAS>, <TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS>, <IDENTIFICACIÓN MOLECULAR>, <FLUJO CONTINUO>.

Leonardo Medina
13-05-2022



0924-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The aim of the current research was to characterize in a molecular way axenic cultures from an anodic biofilm formed by microorganisms found in moorland soil for the treatment of fruit and vegetable leachates generated by the Wholesale Market in Riobamba city by means of continuous flow microbial fuel cells. For the experimentation process, *Delftia acidovorans* bacterium which was obtained through a molecular identification was used as inoculum; in addition, a moorland soil solution for implementing two treatments in triplicate was also used. An analysis of the leachate sample before and after the experimentation was carried out through the application of standard methods. Simple configuration cells with 510 mL operating volume were built as well as a data acquisition system with Arduino 1, and 3. ads1115 I2c analog converters were used to automatically collect voltage data every 60 seconds on a computer for 15 days. The pH measurement of the six cells was performed every day and the hydraulic retention time considered was 24 hours for substrate recirculation. Statistical analysis showed that there were no significant differences in voltage production and contaminant removal in both treatments. The average voltage obtained by the pure culture was 127.98 mV and 122.9 mV by the moorland soil, both cases evidenced similar percentages of organic matter removal measured in the biochemical oxygen demand, chemical oxygen demand and ammonia nitrogen; however, the treatment with moorland soil evidenced higher removal percentages. It is concluded that the axenic and heterotrophic cultures used in the leachate sample with continuous flow feeding increased pH, bioelectricity production and organic matter removal. It is recommended to carry out treatments using mixed bacterial cultures to maximize the voltage and pollutant load removal.

Keywords: <BIOELECTRICITY >, <MICROBIAN FUEL CELL (MFC)>, <ELECTROGENIC BACTERIA>, <LEACH TREATMENT>, <MOLECULAR IDENTIFICATION>, <CONTINUOUS FLOW>.



Lic. Paul Rolando Armas Pesántez Mg.

0603289877

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de energía asociada al desarrollo económico y el crecimiento demográfico ha llevado a estrategias que priorizan la expansión de la producción de energía eléctrica. Esta producción y uso de energía suponen la principal causa junto con el transporte, de las emisiones de gases de efecto invernadero, gases responsables del cambio climático. Si bien existen fuentes de energía renovable como son; eólica, solar, hidroeléctrica y biomasa, entre otras. Karthick y Haribabu (2020, p. 275) en el Ecuador según la Agencia de regulación y control de electricidad en el año 2020 se reportó que el 60.75% de energía producida en el país proviene de fuentes renovables, donde el 58.45% de energía es producida por hidroeléctricas. Si bien la construcción de hidroeléctricas se ha constituido en uno de los principales mecanismos de producción energética en el país, se conoce también que está generando una fuerte controversia si verdaderamente corresponde a una fuente sostenible, esto debido a los impactos sociales y ambientales que implica su construcción, la modificación de regímenes hidrológicos y la retención de las aguas, lo cual a su vez afecta los procesos de escorrentía, de transporte de sedimentos, cambiando la geomorfología de los ríos antes y después de las estructuras. Adicional la descomposición de la materia orgánica en los embalses puede promover la generación de gases de efecto invernadero (GEI) como el metano (se estima que las represas son las responsables de 1.3% de las emisiones globales de GEI). Parece evidente que es perfectamente compatible el uso de energías renovables con prácticas insostenibles.

Otro problema recurrente en nuestro país es el manejo de residuos orgánicos, según INEC (2019, pp. 2-5) cada habitante del Ecuador produce en promedio alrededor de 0.84 kilogramos de residuos sólidos al día, en el área urbana, donde el 56.6% corresponde a residuos orgánicos. La mayoría de los desperdicios de alimentos generados a partir de comunidades, restaurantes, fábricas y especialmente mercados terminan en vertederos sin ningún tratamiento sostenible. Estos residuos por su alto contenido de agua generan lixiviados que de acuerdo con su constitución presenta una composición metanogénica, que al ser drenados hacia aguas superficiales y subterráneas debido a la compactación de residuos y la percolación de aguas lluvias podría ser considerado potencialmente peligrosos (Maldonado et al., 2017, p. 92). A la luz de todo esto, el problema radica en la búsqueda de fuentes asequibles que considere el acceso de energía para todos, que busque una generación sostenible no convencional y sobre todo inserte la idea de auto-sustentabilidad en el actual modelo energético.

Mediante la problemática planteada anteriormente, direcciona esta investigación a la siguiente pregunta: ¿El desarrollo de tecnologías autosustentables pueden disminuir la concentración de materia orgánica presente en los lixiviados y a su vez producir energía eléctrica?

Justificación

Las celdas de combustible microbiano por sus siglas en inglés (MFC) es un área emergente para la generación alternativa de energía renovable y ofrece oportunidades adicionales para la biorremediación ambiental. Según Jatoti et al. (2020, pp. 1-10) se ha visto que varios compuestos orgánicos provenientes de distintos tipos de aguas residuales han tenido éxito generando energía en las MFC, lo que demuestra viabilidad en la generación de energía y contaminantes degradados simultáneamente (Santoro, et al., 2017, pp. 226). Además, los residuos de alimentos tienen altas fracciones orgánicas, lo que les da un gran potencial para ser utilizado como una fuente alternativa de bioenergía disminuyendo la materia orgánica en ellos (Choi y Ahn, 2015, pp.53-60).

La caracterización de poblaciones microbianas que actúan en el compartimento anódico de la MFC permite obtener cultivos puros que de acuerdo con Jothinathan. y Wilson (2017, pp. 520–527) la utilización de bacterias identificadas permite la obtención de mejores voltajes de energía eléctrica registrando aún mayor producción de energía, empleando cultivos bacterianos mixtos. En consecuencia, esta investigación genera un aporte importante en el estudio de esta tecnología MFC, especialmente en su modo de operación (flujo continuo), así también como en la identificación de microorganismos y sustratos potenciales para la generación de energía eléctrica. Además, contó con el aval del Grupo de Investigación y desarrollo para el ambiente y Cambio Climático (GIDAC ESPOCH), por tanto, el principal beneficiario fue la comunidad científica ya que el presente tema de investigación proviene de un proyecto de investigación denominado: “Producción de bioelectricidad a partir de MFC como tecnología autosustentable en el tratamiento de aguas residuales”, lo que ayudó a dar un paso más, en la búsqueda de implementar en un futuro a escala real este tipo de tecnología emergente.

Antecedentes

A lo largo de los años se ha venido realizando diversas investigaciones a cerca de la producción de bioelectricidad usando celdas de combustible microbianas, las mismas tienen como finalidad la obtención de energía eléctrica a través de microorganismos que convierten la energía química encontrada en un sustrato, en energía eléctrica, las cuales están formadas por una cámara anódica y otra cámara catódica. La adición de organismos biológicos responsables de catalizar reacciones electroquímicas les da a estos sistemas un nivel de complejidad que quizás esté por encima de los sistemas electroquímicos ya complejos (baterías, pilas de combustible y supercondensadores). Con el tiempo las MFC se han convertido en dispositivos mucho más atractivos considerándose una tecnología prometedora para la producción de energía limpia (Góngora et al., 2017, p. 55). En el año 2014, en la ESPOCH empiezan los primeros trabajos de investigación sobre celdas de

combustible microbiana, comenzando con la bioconversión de residuos sólidos orgánicos con suelos de la región Amazónica y Alto Andina del Ecuador en MFC de cámara simple, donde se obtuvo un voltaje promedio de 317 mV en las MFCs con suelo Alto Andino, a comparación de las MFCs con suelos de la región Amazónica que produjeron 270 mV, obteniéndose que las MFCs compuestas con suelos de la región Alto Andina y Amazónica en conjunto con residuos orgánicos influyen en la producción de bioelectricidad (Logroño et al., 2014, pp. 61-68). El siguiente año Logroño et al. (2015, pp.2009-2014) llevaron a cabo el trabajo sobre la generación de bioenergía a partir de residuos de frutas y vegetales usando una MFC de cámara simple. Para el año 2016 se estableció otro modelo de celda de combustible con flujo ascendente como biosensor para el monitoreo de concentración de DBO de aguas residuales sintéticas del lavado de arroz (Logroño et al., 2016, p. 101). De acuerdo con Guambo et al. (2017: pp.23-27) se realizó mejoras en el diseño de configuración de las celdas de combustible microbiana teniendo como resultado MFCs más pequeñas y eficientes para la remoción de aguas residuales sintéticas de nitrato usando la cepa *Pseudomonas* sp., para la producción de energía eléctrica.

Se han probado varios géneros de bacterias en MFC para evaluar su capacidad electrogénica, uno de los primeros grupos estudiados fue el de las α -proteobacterias, más concretamente los integrantes de la familia *Geobacteraceae*, sin embargo con el pasar de los años se logró evaluar la capacidad electrogénica de varias especies de bacterias que han demostrado un buen rendimiento en la producción de energía y remoción de contaminantes, *D. acidovorans*, *A. butzleri*, y *C. freundii*, trabajando en cultivo mixto generaron un voltaje máximo de 340.75 mV (Chen, et al., 2013, pp.286-293). El género *Serratia* sp y *Stenotrophomonas* sp para degradación de metales pesados en MFC (Peiravi et al., 2017, pp. 329–338; Shen et al., 2017, pp.1-7). También el género *Staphylococcus* en consorcio con bacterias del género *Bacillus* sp presentes en agua residual de una industria petroquímica dentro de una MFC tuvieron la capacidad de generar un voltaje de circuito cerrado de 745 mV mientras que los géneros correspondientes a *Arcobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Cloacibacterium* y *Shewanella* sp., en aguas residuales domesticas resultaron ser bacterias importantes para la degradación del 2.4 diclorofenol en MFCs. (Hassan et al., 2017, pp. 647–657).

Tanto los cultivos puros como los cultivos mixtos se han utilizado en celdas de combustible microbianas, donde la producción de energía se ha monitorizado mediante un multímetro. Los microorganismos más estudiados en este campo son *Geobacteria* y *Shewenella*, que dieron mejores resultados cuando se inocularon como cultivos puros. En un estudio de análisis comparativo de la producción de energía con cultivos puros, cocultivos y mixtos en una celda de combustible microbiana realizado por Jothinathan y Wilson (2017, pp. 520–527) se determinó que *Bacillus thuringiensis* DRR-1 y *Paracoccus homiensis* DRR-3 produjeron 180 mV y 300 mV, respectivamente, como cultivos puros, sin embargo, cuando las dos bacterias se inoculan en un mismo MFC, dieron 300 mV y 0.010 mA y cuando se combinaron cinco cepas bacterianas

aisladas de fluido ruminal en un solo MFC produjo una cantidad significativa de voltaje (500 mV) lo que indica que las bacterias electrogénicas generan mayor energía eléctrica en cultivos mixtos. Los residuos de alimentos tienen altas fracciones orgánicas, siendo un gran potencial para ser utilizado como una fuente alternativa de bioenergía y disminuir la materia orgánica en ellos. La generación de bioelectricidad, la eliminación orgánica y la reducción de la biomasa se pueden lograr cuando la materia orgánica se utiliza en las MFCs. Pero al usar residuos de tipo sólido se limita la producción de energía debido a su heterogeneidad y baja hidrólisis, lo que indica dificultad para los microorganismos a metabolizar. Para superar estas limitaciones, los investigadores han estudiado los procesos integrados entre la pre-fermentación y los MFCs usando lixiviados ya que proporcionan una afinidad de sustrato favorable y una alta generación de energía (Choi y Ahn, 2015, pp.53-60).

Se ha usado lixiviados de residuos alimenticios usando MFC de doble cámara con un sistema aireado y otro no aireado donde se obtuvo que para MFC no aireado el crecimiento microbiano ocurre al primer día de operación y produce una corriente eléctrica máxima de 373 mV, para el caso de MFC aireados el crecimiento microbiano se da en el séptimo día produciendo una corriente eléctrica máxima de 404 mV, por lo tanto el MFC aireado mostró mayor rendimiento de voltaje máximo y densidad de potencia que el MFC no aireado, lo que demuestra que el suministro de oxígeno disuelto en la cámara del cátodo fue capaz de aumentar la producción de energía de la MFC. Por otro lado, se ha investigado el efecto de NaCl y pH (Li et al., 2013, pp. 452–458) y de los inóculos microbianos empleados, comprobando que esta tecnología es efectiva para generar energía y disminuir la materia orgánica presente en los lixiviados (Li et al., 2012: pp. 283–288).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Caracterizar molecularmente cultivos axénicos para el tratamiento de lixiviados mediante celdas de combustible microbianas.

Objetivos Específicos

- Identificar bacterias provenientes de cultivos axénicos, mediante técnicas moleculares.
- Construir celdas de combustible microbianas de flujo continuo con propósitos bioelectrogénicos.
- Aplicar y monitorear las bacterias identificadas para disminuir la concentración de materia orgánica presente en los lixiviados, a partir de Celdas de Combustible Microbianas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Bacterias

Organismos unicelulares carentes de un núcleo verdadero, estos varían en sus características algunos pueden o no poseer flagelos siendo móviles o inmóviles, su tamaño puede ser de hasta 4 micras de largo. Se reproducen de forma rápida por fisión binaria, tienen la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes de estrés ambiental. Su capacidad y eficiencia metabólica les permite colonizar la superficie terrestre, el aire, los lagos salados y prácticamente todas las regiones geográficas del planeta., por tanto, pueden encontrarse en todos los lugares. Entre las formas de clasificación se encuentra la tinción en Gram positivas y Gram negativas (Rosselló y Amann, 2015, pp. 209–216).

1.2. Bacterias electrogénicas

Son microorganismos con la capacidad de generar energía de forma alternativa por diferentes técnicas, como la biorremediación y la bioelectrogénesis; por ello los organismos que habitan en ambientes extremos de temperatura o pH se están tomando en cuenta para reducir sustancias contaminantes usadas en la industria en diversos procesos y que generan residuos, que en algunas ocasiones son complicados de remediar. Ejemplos de estos microorganismos son los del género *Shewanella*, destacando las especies *Shewanella oneidensis* y *Shewanella loihica* que reducen iones Fe^{+3} (férrico) a Fe^{+2} (ferroso) (Hernández y Sánchez, 2017, pp. 3-5).

Las bacterias electrogénicas o también conocidas como bacterias electroquímicamente activas, bacterias que respiran ánodo o electrógenos se distinguen de otros microorganismos por su capacidad de transportar directamente electrones fuera de la célula, es decir que son capaces de realizar transferencias de electrones exocelulares lo que les permite funcionar en una MFC (Zaini y Murugan, 2019, pp. 1-9).

1.3. Métodos de aislamiento e identificación bacteriana

1.3.1. Aislamiento bacteriano

Es la separación de un microorganismo de interés del resto de microorganismos que coexistían en una muestra original. Para estudiar las características físicas, químicas, fisiológicas, etc., de una bacteria, se necesita que ésta sea aislada en cultivo puro y el aislamiento bacteriano puede

darse en diferentes medios de cultivos y a partir de distintas técnicas de siembra. El método más usado es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido en una placa Petri. Si se incuba en condiciones adecuadas se obtendrá un cultivo puro, donde cada colonia aislada está constituida de un solo tipo de bacterias, ya que se supone que es la descendencia de una sola célula y, por tanto, un cultivo axénico (Castañeda, 2004, p. 65).

1.3.2. Técnicas de aislamiento bacteriano

Existen diferentes técnicas de aislamiento bacteriano que pueden utilizarse por ejemplo la separación física de los microorganismos se la puede realizar a través de diluciones seriadas, siembra por vertido en placa y siembra por agotamiento.

Para la siembra de las bacterias se utilizan medios de cultivo selectivos y diferenciales de acuerdo con los requerimientos nutricionales de las bacterias en estudio. También se puede aprovechar de las características particulares que poseen los microorganismos, tales como la formación de esporas, el metabolismo anaerobio y/ o facultativo, la capacidad para utilizar sustratos poco comunes, etc., (Sanz, 2011, pp. 20-24).

- *Técnica de aislamiento por agotamiento por estría*

Es un método simple y rápido donde se realiza un agotamiento progresivo y continuo del inóculo en un medio sólido en una placa Petri. Tiene la finalidad de obtener un número reducido de bacterias a partir de un gran número de ellas. Cuando se las incuba, cada una de las bacterias da origen a una colonia, y estas colonias individuales constituyen un cultivo puro. Para mantener los cultivos puros que se obtengan por los diferentes métodos de aislamiento es necesario mantenerlos bajo refrigeración y cada cierto tiempo moverlos para evitar la contaminación de los cultivos (Sanz, 2011, pp. 20-24).

- *Técnica de aislamiento en placa por diluciones sucesivas*

Se basa en realizar diluciones sucesivas de la muestra de interés, se debe mantener el área de trabajo estéril para sembrar cantidades conocidas de las bacterias en placas Petri. Se pueden llevar a cabo varias diluciones en orden 10^{-1} , al final alguna de las diluciones originará colonias separadas, lo que permite evaluar el número de bacterias viables en la muestra original (Sanz, 2011, pp.20-24).

1.4. Identificación bacteriana

1.4.1. Métodos fenotípicos

Se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas de la bacteria a identificar, es un método muy utilizado por su aplicación y precio asequibles, y dentro de estos se encuentran las pruebas bioquímicas con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; con lectura en menos de seis horas como la hidrólisis del hipurato, la -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol; pruebas lentas como la oxido-fermentación, reducción de nitratos, entre otras con lecturas de 18 a 48 horas y aquellas pruebas que se basan en caracteres de resistencia a algunas sustancias como la optoquina, la bacitracina, la solubilidad en bilis, y el crecimiento en caldo hipersalino (Bou et al., 2011, p. 602).

Además, este método también usa sistemas comerciales manuales y automatizados. Las primeras conocidas como galerías multipuebas que permiten realizar entre 10 a 50 pruebas bioquímicas a la vez, que consisten en celdillas inoculadas con un sustrato liofilizado. Estas mismas galerías pueden ser mejoradas en el caso de sistemas automatizados donde la inoculación, incubación y lectura de resultados puede hacerse de manera automática, también está la existencia de varios tipos de paneles que brindan la oportunidad de registrar datos en un ordenador obteniéndose un índice alto de fiabilidad para la identificación del microorganismo (Bou et al., 2011, p. 602).

1.4.2. Métodos proteómicos

Técnica que emplea el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma) y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas, esta última permite el análisis de distintos componentes químicos de forma precisa al medir iones derivados de moléculas separándolos en función de la relación masa/carga (Bou et al., 2011, p. 606)

La espectrofotometría de masas MALDITOF es de gran interés para la identificación de bacterias grampositivas y gramnegativas. Esta técnica emplea un láser como fuente de ionización lo que genera iones tras bombardear con fotones la muestra, se producen rayos UV de 337 nm, el tiempo de obtención del espectro es aproximadamente de un minuto para 10–12 g de un compuesto de masa/carga (m/z) de 1.000 daltons (Bou et al., 2011, p. 606).

1.4.3. Métodos moleculares

Son procedimientos complementarios cuando la identificación fenotípica no es suficiente ya que no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica. El análisis del gen ARNr 16s es el más utilizado para la identificación precisa de las bacterias. Los análisis de

genes más utilizados en la identificación molecular son:

- **Análisis del ARNr 16S (rrs):** Se encuentra codificado por el gen rrs o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, al tener un alto grado de conservación procede como un cronometro molecular, tiene una forma aproximada 1.500 pb lo que proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para la identificación bacteriana.
- **Análisis del ARNr 23s:** Sirve como una alternativa cuando la fracción 16s no proporciona datos suficientes. Su uso puede llegar a limitarse debido a su coste y dificultad técnica que puede llegar a presentarse en la amplificación de fragmentos más grandes.
- **Análisis de rpoB (subunidad de la ARN polimerasa):** estas secuencias generan mayor calidad en la identificación bacteriana que las 16s, hay una mayor correlación en la similitud de la secuencia del rpoB con el criterio de inclusión en la misma especie de la hibridación ADN-ADN (DDH < 70%) y puede ser empleado como instrumento de genotipificación y de filogenia. Para este análisis se recomienda usar un fragmento hipervariable de 2.300-3.300 pb. Según el tamaño del fragmento secuenciado el porcentaje de similitud será variado, fragmentos de 600-825 pb tendrán una similitud mayor o igual al 96% (Bou et al., 2011, pp. 602-603).
- **Análisis de gyrB (subunidad β de la ADN girasa):** Es el gen que codifica la subunidad de la ADN girasa o topoisomerasa II y está involucrado en la replicación del ADN bacteriano. Posee una tasa de sustituciones sinónimas que se estima en al menos cuatro veces mayor que la del ARNr 16S. Permite la identificación de bacterias pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, enterobacterias, micobacterias y bacterias del ácido láctico (Bou et al., 2011, pp. 602-603).

1.5. Etapas de la identificación molecular

1.5.1. Extracción de ADN bacteriano

La extracción de ADN bacteriano se basa en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN de una muestra basándose en las características fisicoquímicas de la molécula. Cuando se aplican técnicas moleculares es necesario iniciar con una extracción de ADN y para obtener datos confiables y reproducibles es importante la extracción de ADN íntegro y puro (Polo, 2018, pp. 1-5). La extracción y purificación de moléculas de DNA y/o RNA es importante para el estudio y experimentación en biología molecular. Por lo tanto, se tiene de diferentes metodologías como la centrifugación y el uso de kits comerciales que se emplean según el origen del DNA y la finalidad del estudio, así se han diseñado distintos protocolos para obtener cantidades de ADN adecuadas y de alta calidad (Polo, 2018, pp. 1-5).

1.5.2. Amplificación de ADN bacteriano

Es un incremento en el número de copias de una secuencia génica. El método más empleado por ser altamente sensible, reproducible y eficiente es la PCR o reacción en cadena de la polimerasa, en donde una secuencia de ADN específica se amplifica o se copia varias veces por varios ciclos de PCR. Esta técnica amplifica una sola región elegida de una muestra de ADN compleja que está definida por dos secuencias de ADN monocatenario, conocidos como cebadores de PCR, los cuales son clave en el proceso de amplificación. La secuencia de los cebadores debe ser complementaria al punto inicial y de la secuencia objetivo, por ello es importante conocer la secuencia de la plantilla de ADN. La manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (Serrato et al., 2014, pp. 53-73).

El proceso de la PCR como se muestra en la figura 1-1, inicia con la desnaturalización de la molécula de ADN bicatenario a monocatenario a 95°C de 15 a 30 segundos. A continuación, la temperatura se reduce a 60°C en el proceso de annealing o hibridación donde se forman enlaces de hidrógeno entre el cebador y el ADN diana complementario. En la tercera fase llamada alargamiento o extensión la temperatura aumenta a 72°C que es óptima para la ADN polimerasa empleada, la misma que se encarga de crear una nueva hebra de ADN complementaria incorporando nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores, por tanto, la síntesis de ADN va de 5' a 3' para las nuevas hebras (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2017, párr. 1-3).

1.5.3. Secuenciación de ADN bacteriano

Consiste en la identificación de la secuencia de bases de los nucleótidos (A, T, C y G) de un determinado fragmento de ADN. Existen varias técnicas de secuenciación por ejemplo la secuenciación masiva se encarga de secuenciar pequeños fragmentos de ADN o amplicones previamente amplificados (Hernández et al., 2019, pp. 150-161). Una forma para poder asignar una bacteria a un grupo taxonómico es mediante el estudio de la secuencia del gen del ARN 16S, donde se secuencian total o parcialmente dicho gen. El mismo que debe ser amplificado completamente por PCR, mediante el uso de cebadores universales y se secuencian para luego comparar con las bases de datos (Peña et al., 2013, pp. 237-246).

Existen varios métodos de secuenciación de ácidos nucleicos, entre ellos los que registran mayor éxito conocidos como de primera generación son el método de modificación y escisión química ideado por Allan Maxam y Walter Gilbert, así como el método de secuenciación por síntesis diseñado por Frederick Sanger, siendo este último ampliamente establecido como un estándar. Estos implican el marcado de las moléculas a secuenciar radiactiva o fluorescentemente, generan

una serie de cadenas sencillas de ADN marcadas de distintas longitudes que se diferencian en una única base y pueden separarse por electroforesis, donde aparecen como una escalera de bandas cuya longitud varía en un único nucleótido. También se puede marcar el oligo cebador o los terminadores con un compuesto fluorescente y activar la reacción de secuencia. Los productos de la misma se detectan mediante la electroforesis cuando pasan por un láser permitiendo detectar la fluorescencia emitida al excitar los fluoróforos (Valderrama et al., 2020, pp. 19-24).

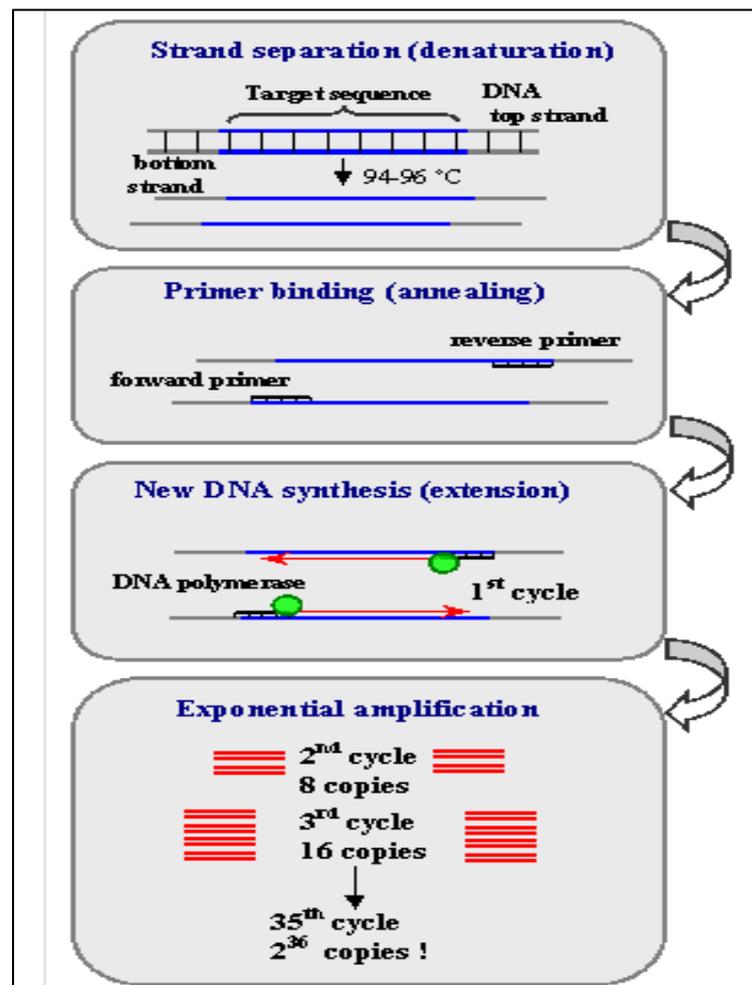


Figura 1-1: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica (2017, párr. 2-3).

1.5.4. Análisis de la secuencia

Las comprobaciones de calidad de los datos de secuencia deben comenzar alineando y ensamblando todos los fragmentos de secuencia de un aislado para generar un contig y una secuencia de consenso; esto se puede lograr utilizando un software ensamblador, que realizará la alineación contra una secuencia de referencia seleccionada automática o manualmente. Cuando se ha identificado la secuencia de ADN de interés se puede utilizar las distintas bases de datos

que existe hoy en día para su comparación, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), que filtra datos para obtener una lista clasificada de las secuencias coincidentes más cercanas, así como alineaciones por pares de la secuencia aislada con secuencias de referencia seleccionadas (Church et al., 2020, p. 12).

1.6. Bioelectricidad

La bioenergía es energía generada a partir de materia orgánica de origen vegetal y animal como residuos agrícolas y forestales, cultivos energéticos, madera o desechos orgánicos. La obtención de bioelectricidad brinda sistemas de energía renovable con bajas emisiones de carbono y ofrece numerosos beneficios ambientales y socioeconómicos y, por lo tanto, respalda los objetivos de cambio climático global y objetivos ambientales, sociales, económicos y sostenibles más amplios (Röder y Welfle, 2019, pp. 379-398).

Es aquella energía que se obtiene de la biomasa, existen tecnologías que la aprovechan por su gran potencial para satisfacer las necesidades energéticas humanas y sustituir las fuentes energéticas fósiles y nucleares. Se requiere que su explotación se haga en términos sustentables, aprovechando su carácter renovable reduciendo las emisiones de contaminantes a la atmósfera (Reid et al., 2020, pp. 274–286).

1.7. Celdas de combustible microbianas

Las MFCs son una tecnología bioelectroquímica derivada de pilas de combustible químicas. El diseño y la construcción de los MFC dependen de los conceptos científicos y de ingeniería que incluyen microbiología, electroquímica e ingeniería ambiental (Utomo et al., 2017, p. 425).

Una celda de combustible microbiana es un dispositivo que tiene como finalidad la obtención de energía eléctrica a través de microorganismos que convierten la energía química encontrada en un sustrato, en energía eléctrica. Este proceso es posible ya que algunos microorganismos transfieren los electrones que producen en su actividad metabólica a un electrodo (ánodo) en lugar de un aceptor natural de electrones (como oxígeno) (Góngora et al., 2017, p. 55).

1.7.1. Componentes de la MFC

- *Ánodo*

También conocido como terminal negativo se ubica en el compartimento anaerobio de la celda y los materiales comúnmente que forman parte del ánodo se tiene: placas y las barras de grafito. Estos materiales son los más recomendados porque su costo es relativamente económico y poseen

gran facilidad para manejarlos. Se usan diversos tipos de productos de carbón como son el papel, la fibra, entre otros y son utilizados como electrodos (Revelo et al., 2013, pp. 17-28).

Todas las condiciones imprescindibles para degradar la biomasa se proporcionan en la cámara del ánodo. Este compartimento está lleno de sustrato, un mediador que es opcional, microorganismos y el electrodo de ánodo como aceptor de electrones. Al ser una parte principal de la MFC en ella los microorganismos juegan un papel importante para la generación de electrones (Rahimnejad, et al., 2015, pp. 747).

- *Biofilm*

También conocido como biopelícula son microorganismos que se adhieren a las superficies a través de la excreción de sustancia polimérica extracelular (SPE) formando biopelículas. Las SPE son de naturaleza polisacáridica, con un elevado contenido de agua (aprox. 95 % de la masa), exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, fosfolípidos (Guamet, 2019, pp. 178). Las biopelículas son comunidades multicelulares unidas por una matriz extracelular autoproducida. Los mecanismos que emplean las diferentes bacterias para formar biopelículas varían, dependiendo con frecuencia de las condiciones ambientales y los atributos específicos de la cepa (Guamet, 2019, pp. 176-180).

- *Cátodo*

Es el compartimento aeróbico de la celda, puede estar expuesto al aire o en caso contrario se puede suministrar oxígeno necesario para la reacción electroquímica en la celda, donde los electrones al ser captados por el ánodo después son transferidos hacia el cátodo mediante un circuito externo, y al mismo tiempo en la cámara anódica se generan protones que se dirigen hacia la cámara catódica a través del separador, combinándose con el oxígeno del aire y reducirse a agua con los electrones captados directamente por el cátodo (Santoro, et al., 2017, pp. 226-233).

La cámara del cátodo sirve como terminal positivo, que almacena la solución tampón de pH o la solución de NaCl. La solución debe ser un buen aceptor de electrones ya que el medio acuoso proporciona una plataforma para que los protones que pasan a través del PEM acepten electrones en movimiento y reaccionen con el oxígeno (oxidante) formando agua (Utomo et al., 2017, p. 425).

- *Membrana de intercambio protónico*

Es un separador en la MFC que permite el paso de los protones a la cámara catódica dentro de la celda, a través de ella los protones pasan del ánodo al cátodo, puede ser de diversos materiales, tales como ultrex, Nafión, membranas bipolares, poliestireno y divinilbenceno con ácido

sulfúrico, lana de vidrio, filtros nano-porosos, entre ellos los más usados son los de fibra de carbono ya que son más económicos a comparación de otros materiales como el Nafión que, aunque muestra alta conductividad y permeabilidad a los protones y su uso es muy común en algunos países; sin embargo, su precio no es asequible en todas partes (Rahimnejad, et al., 2015, pp. 746-750).

El papel de la membrana es separar dos ambientes diferentes, el óxido y anódico, que sirven como el ambiente del cátodo y del ánodo, respectivamente. Las membranas ayudan a transmitir H^+ para completar el circuito eléctrico en la MFC (Zaini y Murugan, 2019, pp. 1-9).

- *Sustrato*

Es importante tener en cuenta que la composición de muchos tipos de las aguas residuales es especialmente adecuada para su uso como combustible y por ello el concepto de MFC se ha unido a las tecnologías de tratamiento de aguas residuales. En cuanto a los diferentes tipos de residuos aptos para MFCs como sustrato, existe una gran variedad de aguas residuales que pueden utilizarse como alimento para bacterias electrogénicas. Lo que permite que se utilicen MFCs no solo para tratar aguas residuales domésticas sino también aguas residuales industriales como cervecería, procesamiento de alimentos, reciclaje de papel, aguas residuales, arroyos sanitarios y porcinos, extracto de levadura, refinería, almidón, sedimentos marinos, ácidos orgánicos, alcohol, sulfuros y algas (Mateo et al., 2018, pp. 4183-4192).

En una MFC se puede usar como sustrato materiales sintéticos principalmente glucosa y acetato, aguas residuales sintéticas, aguas residuales municipales e industriales reales, sustratos naturales, aguas residuales domésticas crudas, sedimentos marinos y lodos de depuradora. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, independientemente del tipo de compuestos orgánicos contenidos en el combustible, debe estar dotado de una concentración adecuada de nutrientes, pH y conductividad adecuados para formular el combustible previsto para bacterias electrogénicas (Mateo et al., 2018, pp. 4183-4192).

1.7.2. Tipos de celda de combustible microbiana

- MFC tubulares: Son cámaras con diseños cilíndricos, donde los electrodos se encuentran en posición vertical, usado frecuentemente para la generación de electricidad y el tratamiento de aguas residuales. Los módulos tubulares individuales se pueden conectar para una mayor ampliación. Además, este diseño permite dimensiones casi óptimas de la sección transversal que se pueden mantener durante la ampliación, lo que da como resultado un espacio muerto mínimo (Mateo et al., 2018, pp. 4183-4192).
- MFC tipo H o tipo puente: Es una de las configuraciones más comunes, consiste en dos

cámaras separadas por una membrana de intercambio de protones dando la forma de una H, se han usado para volúmenes de 100 mL hasta los 1000 mL, sin embargo, en cámaras de volumen mayor se ha observado que la concentración más alta de sustrato está alejada de la zona del electrodo y la concentración menor se encuentra más cercana al mismo, lo que genera una menor generación de corriente eléctrica, además que a mayor volumen de la cámara aumenta la distancia entre los electrodos lo que dificulta el paso de protones en la celda (Arbianti et al., 2013, p.33).

- **MFC de retroalimentación:** La recirculación es una de las técnicas efectivas para aumentar la producción en reactores anaeróbicos, permite el contacto entre el sustrato y los microorganismos dentro de la MFC y reduce la variación de temperatura en la cámara. Según (Moharir y Tembhurkar, 2018, p. 10063) en su investigación del efecto de recirculación en MFC usando como sustratos lixiviados de residuos alimenticios indica que la recirculación mejora la producción de bioelectricidad en las MFC ya que mejora las actividades microbianas en la cámara del ánodo, dando lugar a una mayor eliminación de DQO.

1.7.3. Modo de operación de una MFC

Es importante considerar la forma más adecuada para la circulación de los contaminantes a tratar a través de la cámara de combustible microbiana, porque puede tener un efecto importante en la eficiencia del tratamiento de aguas residuales lo que ayuda a determinar qué modo de operación es el óptimo para la obtención de energía y remoción de contaminantes en la MFC (Mateo et al., 2018, pp. 4183-4192).

- ***MFC en modo de operación continuo***

El flujo de entrada del sustrato al sistema es constante mientras dura el proceso de producción de energía, siendo la salida de producto también constante. En MFC se ha probado varios tiempos de retención hidráulica (TRH) para evaluar la capacidad de generación de energía en este modo, donde TRH mayores han dado valores de voltaje más altos en comparación a TRH más bajos, debido a que si el tiempo de residencia es óptimo para el sustrato en la cámara del ánodo permite el tiempo de reacción necesario para que las bacterias electrogénicas con el sustrato incrementarán el flujo de electrones en el circuito. Además, este modo de operación tiene mayor potencial en la aplicación de campo real ya que brinda la posibilidad de escalar el proceso con aguas residuales de diferentes industrias en grandes volúmenes (Srikanth et al., 2016, pp.70-77).

La estructura se muestra en la figura 2-1.

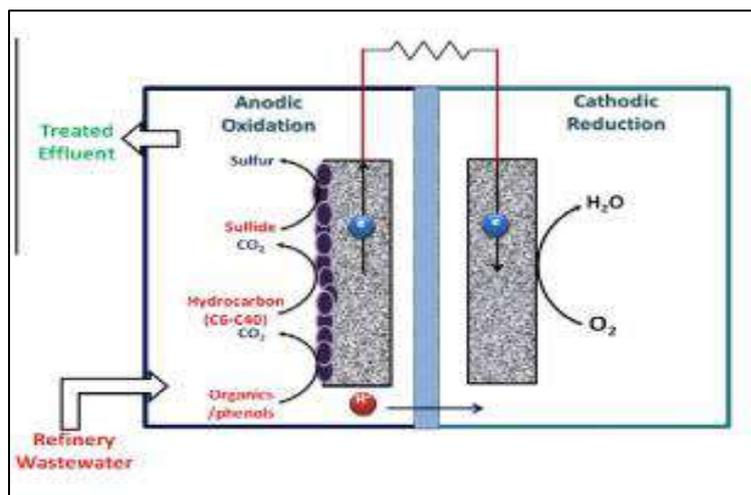


Figura 2-1: Esquema de una MFC en modo continuo

Fuente: Srikanth et al. (2016, pp.70-77).

- *MFC en modo de operación Batch*

La cantidad total de sustrato (contaminante) en la MFC se introduce al sistema al comienzo del proceso, obteniéndose la cantidad total de producto transcurrido en un determinado tiempo (figura 3-1). En las MFC se ha demostrado que la operación por lotes en las celdas puede dar resultados de voltajes aceptables, sin embargo, genera una menor cantidad de energía eléctrica a comparación del modo de operación continuo a pesar de que puede reducir mayor cantidad de DQO para el caso de aguas residuales de refinería de petróleo ya que el tiempo de residencia es bueno y suficiente para la degradación del sustrato, pero va un ritmo muy lento (Srikanth, et al., 2016, pp. 70-77).

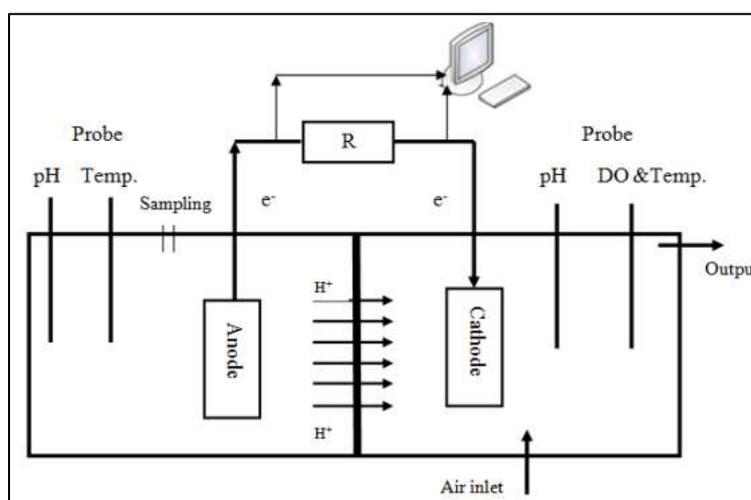


Figura 3-1: Esquema básico de una MFC en modo Batch

Fuente: Esfandyari (2017, pp. 34-42).

1.7.4. Principio de las MFCs

El principio de funcionamiento de las MFCs se basa en la respiración celular anaeróbica de microorganismos, los mismos que actúan como catalizadores para oxidar y descomponer las sustancias orgánicas para generar protones (H^+) y corriente eléctrica como la de movimiento libre electrones. Los electrones que se mueven libremente se transfieren al terminal negativo (ánodo) para pasar al terminal positivo (cátodo) a través de un enlace conductor con una resistencia conectada (Utomo et al., 2017, p. 425).

Una MFC está compuesta por dos cámaras (Figura 4-1), una anaeróbica y otra aeróbica separadas por una membrana de intercambio. La cámara anaeróbica es la que contiene los sustratos orgánicos que se oxidan por acción de microorganismos, generando electrones, protones y CO_2 . En cada cámara hay un electrodo, el ánodo en la cámara anaeróbica y el cátodo en la cámara aeróbica, una vez los electrones se liberan en la cámara anódica, son captados por el ánodo y transferidos hacia el cátodo mediante un circuito externo (Revelo et al., 2013, pp. 17-28).

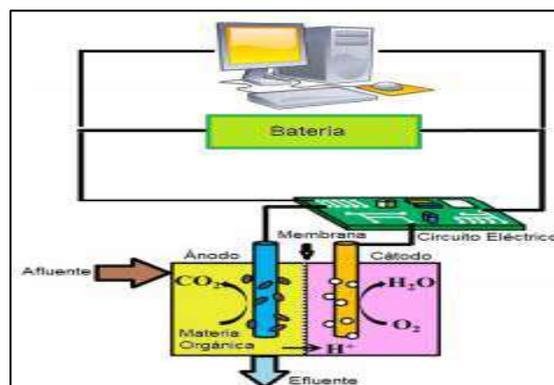


Figura 4-1: Construcción básica de una MFC

Fuente: Nava y Castillo (2018, p. 26).

- *Sistema de adquisición de datos*

Son dispositivos electrónicos que permiten la recopilación de datos para documentar o analizar un fenómeno de interés, hacen que el trabajo de un técnico sea más simplificado, preciso, versátil y confiable. Entre estos dispositivos se tienen sensores para la medición de temperatura, caudal, presión, entre otros, (Vega et al, 2014, pp. 24-41). Además, que existe una amplia gama de ellos como: DAQ: Es uno de los sistemas de adquisición de datos que se ha establecido dentro del estándar de precisión y rendimiento, permite medir un fenómeno eléctrico o físico como voltaje, corriente, temperatura, presión o sonido con una computadora. Entre sus componentes tenemos los sensores, hardware de medición DAQ y una computadora con software programable (Sugiarto, 2016, pp. 1-38). Arduino mega 2560: Es una actualización de la placa electrónica Arduino mega, se puede conectar

de manera sencilla a un ordenador con un cable USB, con un adaptador de voltaje CA a CC o una batería, permite la recopilación de datos de un fenómeno determinado configurando la placa a través del conector ICSP (Programación en serie en circuito) usando Arduino ISP (Arduino, 2021, párr. 1-7).

1.8. Contaminación hídrica

Es la alteración de la calidad natural de las aguas haciéndolas parcial o totalmente inadecuadas para su uso cuando los contaminantes presentes en ella han superado los límites permisibles establecidas en la legislación vigente. Las diferentes actividades que se desarrollan con el uso del agua pueden llegar a generar un cambio en el ciclo hidrológico y modificar las características de las cuencas hidrográficas alterando su calidad (Agencia de regulación y control del Agua, 2016, pp. 11-81). En Ecuador, la contaminación proviene principalmente de la descarga de aguas residuales de las ciudades, actividad minera artesanal, actividades hidrocarburíferas, de agricultura y el mal manejo de residuos sólidos. La disminución del caudal, el cambio climático y la sobreexplotación de los recursos hídricos son alteraciones de los ecosistemas relacionados al agua e influyen en las características de la fuente que derivan en una mala calidad del agua (Agencia de regulación y control del Agua, 2016, pp. 12-81).

1.8.1. Contaminación de aguas subterráneas

Es cualquier alteración de las propiedades físico, química, biológicas del recurso agua, que pueda ocasionar el deterioro de la salud, la seguridad y el bienestar de la población, comprometiendo su uso para distintos fines como el del consumo humano, agropecuario, industrial, comercial o recreativo, y/o causar daños a la flora, a la fauna o al ambiente en general.

El agua subterránea es un recurso hídrico importante para usos domésticos, potable, riego agrícola e industrialización, las principales fuentes de contaminación de las aguas subterráneas son las aguas residuales domésticas y las aguas residuales industriales. El agua subterránea puede contaminarse por grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados en las actividades agrícolas, las actividades mineras y los lixiviados de vertederos han acelerado la gravedad y la propagación de la contaminación en aguas subterráneas (Feng et al., 2020, pp. 1-14)

1.8.2. Contaminación hídrica causada por RSU

La producción del lixiviado es altamente contaminante, ya que los residuos orgánicos se mezclan con los inorgánicos que, al humedecerse, se convierten en sustancias tóxicas, que pueden generar un gran impacto ambiental relacionado con la contaminación de fuentes de agua superficial y

subterránea ya que los mismos son drenados hacia estos cuerpos receptores como consecuencia de la compactación de residuos y percolación de aguas lluvias (Álvarez, 2014, pp. 5-15).

Según estudios en aguas subterráneas el límite de la pluma de contaminación por lixiviados puede llegar a los 190 m aguas abajo del relleno sanitario. Los patrones de migración y atenuación de sales inorgánicas (como SO_4^{2-}) y los metales pesados (como Fe y Mn) en las zonas de oxidación y reducción pueden diferir según la época de lluvia. Los contaminantes orgánicos en el lixiviado se reducen y se descomponen en ácidos orgánicos, lo que ocasiona que el agua subterránea 80 m aguas abajo del vertedero se vuelva débilmente ácida (el pH puede variar de 6,51 a 6,83) y promueve la reentrada de metales pesados adsorbidos como el plomo en el agua subterránea (Wang et al., 2021, pp. 1-19)

1.9. Lixiviados

El lixiviado es un efluente acuoso generado a partir de residuos sólidos por su alteración física, química y biológica y es considerado como una sopa química de materia orgánica disuelta (DOM). Este líquido contiene concentraciones excesivas de productos biodegradables y no biodegradables como son la materia orgánica, fenoles, nitrógeno amoniacal, fosfato, metales pesados y sulfuro (Parvin y Tareq, 2021, pp. 1-17).

La cantidad de lixiviados es mayor en la temporada de lluvias y contiene mayor contenido orgánico; mientras que, se reduce mucho en época seca y contiene altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, las concentraciones de materia orgánica, nitrógeno amoniacal y metales pesados son muy altas, pero el contenido de fósforo es muy bajo (Parvin y Tareq, 2021, pp. 1-17).

Si no pasan por un tratamiento adecuado y se eliminan de forma segura, puede contaminar con sustancias químicas, físicas y biológicas las aguas superficiales y subterráneas, ya que puede filtrarse a través de los suelos y subsuelos, causando impactos adversos en las aguas receptoras e interrumpiendo los ciclos biogeoquímicos (Álvarez, 2014, pp. 5-15).

1.9.1. Lixiviados de vertederos

Es un líquido que, al entrar en contacto con los residuos de rellenos sanitarios, vertederos, botaderos, entre otros, se produce por la disolución de uno o más compuestos de los residuos sólidos urbanos RSU en contacto con el agua, o por la propia dinámica de descomposición de los residuos, dando origen al mal olor y gases tóxicos y que contienen una gran variedad de contaminantes. Los lixiviados producidos en vertederos son el producto de varios factores como: composición de la basura, edad del relleno, balance de agua, diseño y operación del relleno sanitario, solubilidad de los desechos, procesos de conversión microbiológica y química y la interacción del lixiviado con el medio ambiente (Álvarez, 2014, pp. 5-15).

El lixiviado de vertedero es un líquido negro o marrón maloliente. Contiene grandes cantidades de material orgánico e inorgánico, incluidos varios orgánicos refractarios como compuestos aromáticos y humus; sales inorgánicas tales como nitrógeno amoniacal, carbonato y sulfato; e iones metálicos como cromo, plomo y cobre. Debido a la compleja composición de los desechos, una característica de la calidad del agua lixiviada es que contiene altos niveles de contaminantes y, a menudo, toxicidad biológica (Wang et al., 2018, pp. 1-10).

1.9.2. Tipos de lixiviados de acuerdo con la composición fisicoquímica

Lixiviado joven: Tienen una edad menor a 5 años, más biodegradables, la mayoría de las mediciones están asociadas con las variables indicadoras de materia orgánica y sólidos, se encuentran en la fase acidogénica del proceso anaerobio, que conduce a la liberación de grandes cantidades de ácidos grasos volátiles, que pueden representar hasta el 95% de la materia orgánica (Torres et al, 2014, pp.245-253).

Lixiviado intermedio: Se encuentran entre los 5 a 10 años, al igual que los lixiviados maduros se debe considerar mayor número de variables para obtener una caracterización más precisa del mismo debido a que presentan bajas concentraciones de las variables fisicoquímicas (Torres et al, 2014, pp. 245-253).

Lixiviado maduro: Son aquellos mayores a 10 años, son menos biodegradables, se encuentran o inician su fase metanogénica, donde los AGV (ácidos grasos volátiles) se transforman en metano y en dióxido de carbono. Al ser de mayor edad se debe caracterizar un número mayor de variables porque las concentraciones medidas y la relación entre ellas disminuye (Torres et al, 2014, pp. 245-253).

Las características de los lixiviados de vertedero a diferentes edades se muestran la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Características de los lixiviados de vertedero con diferentes periodos

Tipo de lixiviado	Joven	Intermedio	Maduro
Vida útil (años)	<5	5-10	>10
pH	6.5–7.5 (7.0)	7.0–8.0 (7.5)	7.5–8.5 (8)
DQO (mg/l)	10–30 (15)	3–10 (5)	<3 (2)
DBO/DQO	0.5–0.7 (0.6)	0.3–0.5 (0.4)	<0.3 (0.2)
N-NH4 (mg/l)	500–1000 (700)	800–2000 (1000)	1000–3000 (2000)
DQO/N-NH4	5–10 (6)	3-4 (3)	<3 (1.5)

Fuente : Wang et al. (2018, pp. 1-10).

1.9.3. Tratamiento de lixiviados

La eficiencia de remoción de contaminantes de los lixiviados dependerá de su composición química y de los parámetros como la DBO, DQO, biodegradación, nitrógeno total, metales pesados y pH. Además de su relación con las características y grado de estabilización de los

residuos sólidos (Mejía y Romero, 2018, p.128). Dado que el lixiviado contiene grandes cantidades de materia orgánica y nitrógeno amoniacal, los métodos generales de eliminación han incluido el pretratamiento físico y químico seguido de procesos bioquímicos aeróbicos y anaeróbicos, concluyendo con otros métodos físicos y químicos para el tratamiento final en profundidad (Wang et al., 2018, pp. 1-10).

Las tecnologías habitualmente reportadas por las investigaciones se muestran en la tabla 2-1 a continuación.

Tabla 2-1: Alternativas para el tratamiento de lixiviados

Tipo de Tratamiento	Proceso	Características
Transferencia de lixiviados	Recirculación y tratamiento combinado con aguas residuales domésticas	Se trata a los lixiviados en conjunto con las PTAR
Biodegradación	Aerobios	Se da en presencia de oxígeno usando biomasa en suspensión como en lagunas aireadas, lodos activados y varios tipos de biorreactores.
	Anaerobios	Se da en ausencia de oxígeno por bacterias fermentativas formando biogás. El proceso más común es la digestión anaerobia.
Procesos fisicoquímicos	Oxidación química	Emplean ozono para mejorar la biodegradabilidad de la materia orgánica.
	Adsorción	Emplean columnas de carbón activado, útil para reducir los niveles de DQO.
	Precipitación química	Elimina altas concentraciones de nitrógeno amoniacal.
	Coagulación / floculación:	Se emplea como pretratamiento de lixiviados jóvenes.
	Flotación con aire disuelto	Elimina altas concentraciones de nitrógeno amoniacal contenido en el lixiviado.
Procesos tecnológicos	Microfiltración	Elimina coloides y material suspendido.
	Ultrafiltración	Tratamiento previo a la osmosis inversa, elimina macromoléculas y partículas según la membrana que se utilice.
	Osmosis inversa	Alto rendimiento en separación de contaminantes

Fuente: Manejo y Tratamiento de Lixiviados en Rellenos Sanitarios (2018, pp. 15-28).

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización del Estudio

La caracterización de las bacterias en base a técnicas moleculares se llevó a cabo en el laboratorio IDgen ubicado en la Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro, Quito Ecuador.

La elaboración, configuración y operacionalización de las MFC sobre lixiviados de residuos orgánicos provenientes del mercado Mayorista de la ciudad de Riobamba, así también como su respectivo monitoreo se realizó en circunstancias óptimas, considerando condiciones climáticas de temperatura y pH. La figura 1-2 muestra el lugar de monitoreo de las MFCs con coordenadas 758090,6S - 9816675,5O.



Figura 1-2: Instalaciones de monitoreo de las MFCs

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

2.2. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental ya que se introdujo una variable dependiente (lixiviados) para analizar los efectos que produce en la variable independiente (MFC con inóculos axénicos). Se realizó una medición de DBO de los lixiviados, siendo uno de los principales indicadores de la presencia de materia orgánica, antes (preprueba) y después (posprueba), adicional se analizaron parámetros como pH, conductividad, DQO y Nitrógeno amoniacal.

2.3. Población de estudio

Los lixiviados fueron originarios de los residuos sólidos (frutas y vegetales) recolectados de uno de los principales mercados de la ciudad de Riobamba, Mercado Mayorista (EP-EMMPA), debido

a que es uno de los más grandes y con mayor influencia comercial de la ciudad de Riobamba. Los cultivos axénicos (bacterias electrogénicas) se obtuvieron de suelos altoandinos de la Provincia de Chimborazo, debido a las propiedades óxido-reductoras que dentro de sus características posee este tipo de lugares, condicionando la actividad microbiana que evidencia la producción de bioelectricidad, según investigaciones realizadas por el Grupo de investigación GIDAC (Logroño et al., 2014, pp.61-68).

2.4. Tamaño de la muestra

El método de muestreo para los residuos sólidos fue probabilístico y estratificado, se seleccionó las naves de verduras como un estrato y la nave de frutas como otro estrato y de cada una se recolectó por día, 4 diferentes residuos, ya que visitas previas permitieron evidenciar que generalmente por día la cantidad antes mencionada de residuos era la que más se generaba.

Se obtuvo una muestra compuesta en una proporción 50:50 de residuos sólidos (frutas y verduras) (Pérez, 2019, p. 22), donde se recolectó muestras puntuales de 0.5 kg de residuos del Mercado Mayorista (EP-EMMPA) que más se generaron durante 7 días de los tachos recolectores antes de las (14:00 pm) hora, donde los residuos son llevados por el carro recolector, así se obtuvo una mezcla de muestras similares (homogeneidad). Cada día se homogenizó las muestras recolectadas para obtener 2 kg de residuos diarios, de los cuales por observación producen 600 mL de lixiviado puro, obteniéndose una muestra final de lixiviados de 4.237 L para la experimentación.

- *Cálculos para la obtención de lixiviados*

Según datos de la estación meteorológica de la ESPOCH en los meses de enero a octubre 2021 se tuvo una media de precipitación de 2.04 mm en la ciudad de Riobamba, por tanto, en ese año, por cada m² existió 1 L de agua lluvia ya que por bibliografía se conoce que 1 mm de agua lluvia equivale a que en 1 m² hay 1 L de agua (figura 2-2.) (FAO, 2013, p. 272).

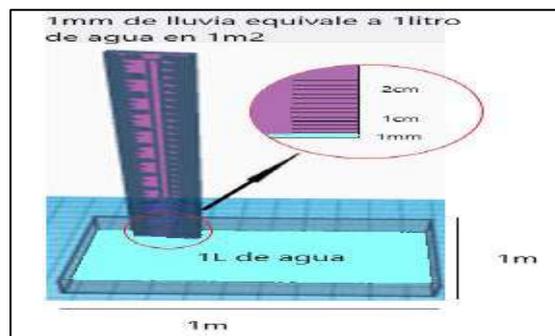


Figura 2-2: Medición de la precipitación

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- ***Cálculo adición de agua al lixiviado***

Área del contenedor: 0.171 m²

Capacidad del contenedor: 65 kg

Entonces:

área → *agua lluvia*
por cada 1 m² hay → *1L agua lluvia*
 0.171 m² → $x = 0.171 \text{ L de agua lluvia}$

Capacidad del tacho → *agua lluvia*
 65 kg residuos → *se mezclan con 0.171 L de agua lluvia*
por cada 2 kg de residuos se necesita añadir → $x = 5,26 \times 10^{-3} \text{ L de agua lluvia}$
 Al final se obtuvo 4.2 L de lixiviado puro + 36,82 mL de agua comercial (tesalia)

- ***Cálculo de la adición de inóculo bacteriano***

El método de muestreo para la incorporación de bacterias fue no probabilístico debido a que la elección de estas no depende de la probabilidad si no de causas relacionadas a las características de la investigación, las unidades que se seleccionaron presentaron un mismo perfil y características por lo tanto el inóculo fue de 2 mL por cada 125 mL de volumen de la MFC.

Entonces:

volumen celda → *volumen inóculo*
por cada 125 mL → *2 mL de inóculo*
 510 mL (*volumen propuesto para la investigación*) → $x = 8.2 \text{ mL de inóculo}$

2.5. Obtención de bacterias electrogénicas

2.5.1. Obtención de bacterias aisladas

- ***Aislamiento bacteriano***

El contexto de esta investigación parte del trabajo de titulación denominado “Identificación molecular de bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad” realizada por Mazo (2020, pp. 24-37), en el cual describe que 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 en las

cuales se trabajó con el sustrato sintético y caldo nutritivo. La suspensión obtenida resultó una dilución 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 °C para su posterior identificación molecular.

- *Resiembra de cultivos axénicos procedentes del biofilm de una MFC*

A partir del aislamiento bacteriano mencionado en la sección anterior se procedió a preparar 6,25 g de Agar nutritivo para 250 mL de agua destilada, se homogenizó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C. Los componentes del agar nutritivo empleado fueron los siguientes: 3 g de extracto de res, 5 g de peptona y 15 g de agar.

Posteriormente como se visualiza en la figura 3-2, se realizó la resiembra de los 8 cultivos axénicos disponibles mediante la técnica de siembra en superficie, donde se colocó sobre cada una de las cajas Petri con el medio solidificado 0.1 mL de inóculo y con ayuda de una espátula Drigalsky se extendió el mismo por todo el medio de cultivo. Después las muestras fueron incubadas a 28°C por 48 horas, transcurrido ese tiempo finalmente fueron transportadas en un cooler al laboratorio de IDgen en Quito para su análisis molecular.



Figura 3-2: Siembra de cultivos axénicos

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

2.5.2. *Identificación molecular*

- *Extracción de ADN bacteriano*

La identificación molecular comenzó con una extracción de ADN bacteriano, para ello se tomaron 8 tubos de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio estériles cada uno y se los etiquetó con los códigos de

los cultivos axénicos anteriormente aislados para identificarlos, en cada tubo se colocó 500 uL de buffer de extracción y 2 uL de B-mercaptoetanol, después con ayuda de un asa esterilizada se tomó una muestra de cada una de las cajas con las bacterias y se colocaron en los tubos y a continuación se agitó cada tubo 2 veces con ayuda del BeadBeater a velocidad máxima, hasta que el tejido quedó pulverizado.

Las muestras se incubaron a baño maría por 30 min a 60 °C, cada 10 minutos se homogenizaron las muestras, luego se añadió 500 uL de cloroformo congelado, se agitó en el vortex por 30 segundos y se colocó las muestras en la centrifugadora a 14,500 RCF por 10 min (figura 4-2). De los tubos centrifugados se extrajo 400 uL de ácidos nucleicos de la fase polar de cada muestra tratando de no mezclar las fases para evitar contaminación y se los colocó en nuevos tubos de 1.5 mL. Al sobrenadante se le añadieron 400 uL de etanol frío, 150 uL de acetato de sodio 3M y 300 uL de etanol 70% filtrado para precipitar el ADN. Finalmente se llevó las muestras al refrigerador a -20° C por una noche.



Figura 4-2: Extracción de ADN bacteriano. **A:** Toma de las muestras bacterianas. **B:** Agitación en vortex. **C:** Centrifugado de las muestras.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Amplificación del ADN*

Se realizó una amplificación de ADN mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), para ello se tomaron las muestras de ADN extraídas anteriormente y se centrifugaron a 14,500 RCF por 17 min y se señaló el pellet en cada tubo. Usando la cámara de flujo laminar, se vació el sobrenadante dejando únicamente el pellet en el tubo, después se realizó un lavado con 200 uL de etanol 70% filtrado y se centrifugó nuevamente las muestras por 10 min, transcurrido ese tiempo se vació nuevamente el sobrenadante y se dejó secar los pellets por 20 min en la cámara de flujo laminar.

Cuando los pellets se encontraban secos se añadió 25 uL de Agua filtrada ultrapura y 1 uL de RNAsa en cada uno de los tubos y se incubaron a 37 °C a baño María. De cada tubo se tomó una

muestra de 2 uL y con ayuda de un nanodrop se cuantificó el ADN como se muestra en la figura 5-2 (primero se blanqueó con 2 uL de agua filtrada ultrapura) se diluyó las muestras para obtener concentraciones de ácidos nucleicos entre 100-300 ng/uL.



Figura 5-2: Cuantificación de ADN en nanodrop. **A:** Adición de la muestra. **B:** Lectura de la muestra.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

Para la preparación de la Master Mix de 8 muestras de bacterias, se tomaron alícuotas de la solución madre de los primers y se hizo un negativo para control. La master mix contenía 2 uL de ADN, 8,5 uL de agua, 1 uL de primer forward, 1 uL de primer reverse para cada tubo y 12,5 uL de taq polimerasa pure Link que contiene ADN polimerasa Taq derivada de bacterias, dNTP, MgCl₂ y tampones de reacción en concentraciones óptimas para la amplificación eficiente de las plantillas de ADN mediante PCR. El negativo contenía 2 uL de agua ultrapura en lugar de 2 uL de ADN. Las cantidades de los componentes de la Master Mix se detallan en la tabla 1-2.

Tabla 1-2: Preparación de Master Mix

Componente	Volumen por muestra (uL)	Número de muestras en total	Volumen total (uL)
H ₂ O	8,5	9	76,5
Taq polimerasa Pure Link	12,5	9	112,5
Primer forward	1	9	9
Primer reverse	1	9	9
ADN	2	8	16
Agua ultrapura	2	1 (negativo)	2

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

Las muestras se colocaron en el termociclador por 2 horas y 30 minutos, el mismo fue programado a 94°C para la fase de desnaturalización, 54.5°C para la fase de hibridación y 72°C para la fase de elongación por 30 ciclos (figura 6.2).

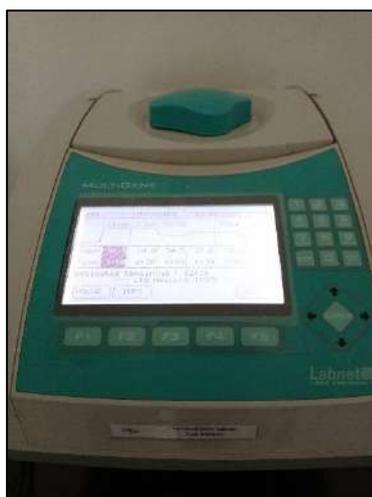


Figura 6-2: Termociclador

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Electroforesis en gel de agarosa*

Se preparó el gel de agarosa con 40 mL de solución TBE y 0,4 g de agarosa en un frasco de 100 mL, la solución se calentó en el microondas hasta que quedó transparente y se dejó enfriar. Se preparó la cámara del gel colocando los posillos en ella, se colocó la solución del gel y se esperó 15 minutos a que solidifique. Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforesis. Para marcar las muestras en el gel se tomó 2 uL de muestra de cada tubo con ayuda de una micropipeta y se colocó en el espacio del gel, se dejó las muestras en el gel a 100 voltios por 25 minutos (figura 7-2), transcurrido ese tiempo se observaron las bandas.



Figura 7-2: Cámara de electroforesis

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Secuenciación e identificación bacteriana*

Se envió a los laboratorios de “Macrogen” en Corea del Sur los resultados de la amplificación de las muestras para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias se utilizó el programa Geneious R9.1 para analizar la calidad de las secuencias de pares de bases obtenidas y se las comparó con ayuda de la base de datos NCBI, para ello se empleó la herramienta de búsqueda de alineación local básica “BLAST” que encuentra regiones de similitud local entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística.

2.6. Celdas microbianas con propósitos bioelectrogénicos

2.6.1. Pruebas de ensayo

Como se observa en la figura 8-2. Se realizó prepruebas para conocer el comportamiento de las bacterias con el sustrato a utilizar, para ello se tomó dos celdas disponibles de 125 mL que tiene el grupo de investigación GIDAC donde se realizó la esterilización respectiva de sus compartimentos, siendo el inóculo utilizado la cepa *Delftia Acidovorans*. Su distribución consistió en que una celda contenía el lixiviado con el inóculo señalado y una segunda con glucosa y la cepa correspondiente. Se monitoreo durante 5 días y se tomó medidas de voltaje en milivoltios con ayuda de un multímetro digital (MT15) en horario de 8 am hasta las 16:00 pm en intervalos de una hora.



Figura 8-2: Monitoreo de MFCs en pruebas de ensayo

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Limpieza de las MFCs*

Los compartimentos de las MFCs que consistían en láminas de acrílico fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% inicialmente por 60 minutos, transcurrido este tiempo se enjuagaron con agua comercial (Tesalia) (Logroño et al., 2016, pp. 1-8). Y volvieron a ser sumergidos en la solución por 24 horas. Finalmente se volvieron a enjuagar y se expuso dichos compartimientos a luz UV como se aprecia en la figura 9-2 durante 15 minutos en una cámara de flujo laminar.

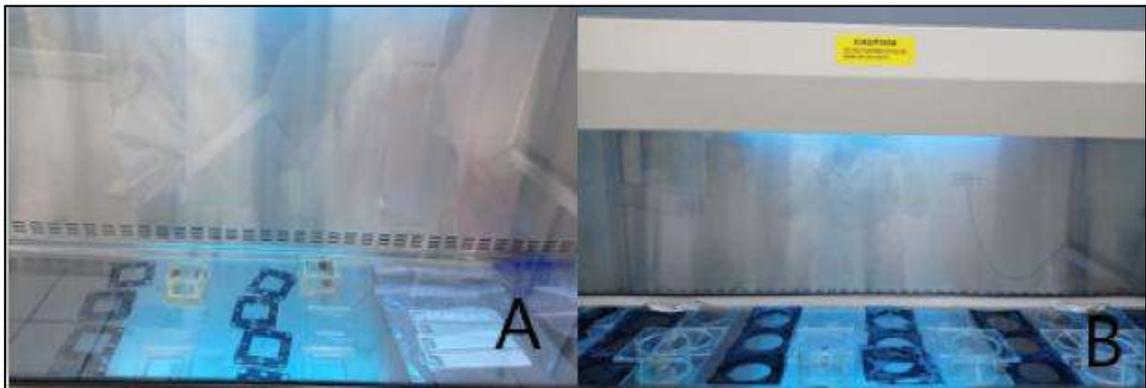


Figura 9-2: Esterilización de compartimentos en UV. **A:** Pruebas de ensayo. **B:** Experimentación final.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Tratamiento de las membranas*

Las membranas anódicas fueron cortadas de acuerdo con el diámetro del compartimento, los cortes se sumergieron en acetona industrial por 12 horas, se lavaron 5 veces con agua destilada para eliminar los sobrantes del disolvente. Posterior a eso, se preparó una solución con 50 gr de sulfato de amonio en 250 mL de agua destilada para sumergir los cortes por 15 minutos. Después, se sumergieron en 100 mL de ácido sulfúrico al 10% por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se calentó los cortes a 450 °C en un horno mufla 20 minutos para finalmente lavarlos con agua destilada y guardarlos en fundas ziploc (figura 10-2). Para el caso de los cortes de fibra de carbono como cátodos, únicamente se lavaron repetidas veces con agua destilada y se guardaron hasta su uso en fundas ziploc (Mazo, 2020, pp. 24-37). La sección de limpieza y tratamiento de las membranas se llevó también a cabo para el experimento final de operación de flujo continuo de las MFCs diseñadas.



Figura 10-2: Tratamiento de membranas anódicas. **A:** ánodos en solución de sulfato de amonio. **B:** Calentamiento de ánodos.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

2.6.2. *Diseño y construcción de las MFCs*

- *Diseño de las MFCs*

Las MFCs fueron de configuración simple de una cámara con cátodo parcialmente expuesto al aire, armadas con láminas y tubos de acrílico de 3 mm de espesor, la cámara anódica consistió en un cilindro de 510 mL de capacidad con un diámetro interno de 100 mm, una altura de 63.7 mm y un orificio de 13 mm en su pared donde se colocó la válvula neumática para la entrada y salida del sustrato (lixiviados). La cámara catódica estuvo compuesta en la parte inferior por 3 láminas de acrílico y en la parte superior por dos láminas de las mismas. Como membranas de intercambio se usó tejido de fibra de carbono de 0.8 mm de espesor. En la figura 11-2 se muestra el diseño de las MFCs implementadas. Para el flujo continuo se utilizó una Bomba de succión de agua de 12v con un caudal de 120 L/h, una manguera de entrada y otra de salida del líquido de 8mm de diámetro para la recirculación del sustrato en las MFCs.

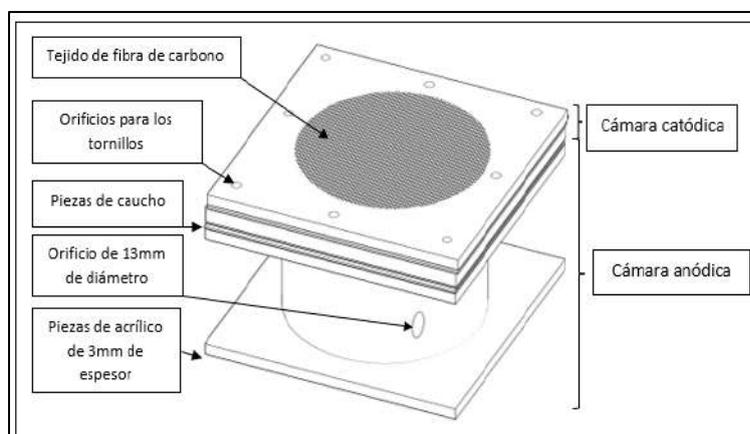


Figura 11-2: Diseño de las MFCs

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Construcción de las MFCs*

Una vez obtenidas las piezas mencionadas en el apartado 2.6.2, se procedió con el ensamblaje de las mismas, su unión se la realizó con cloroformo y para reforzar la adición se empleó pegamento líquido instantáneo y bicarbonato de sodio. Se realizó el tratamiento de los compartimentos y de las membranas de intercambio, después de ello las celdas se armaron e inocularon en una cámara de flujo laminar en el laboratorio de análisis biológicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias como se muestra en la figura 12-2, primero se procedió a colocar en las 6 celdas una cama de sustrato para adicionar en 3 de ellas 8.2 mL de la cepa *Delftia acidovorans* y en las 3 restantes 8.2 mL de una solución de suelo proveniente del páramo de Navag, en el sector de Cajabamba en el cantón Colta ubicado a 4240 msnm, con coordenadas (737774.6S - 9808481.4O). Dicha solución se la realizó previamente según Bonilla (2018, p. 55) donde se colocó 2 g de suelo en 50 mL de agua comercial (Tesalia) y se agitó la mezcla por 10 minutos. Este sector a este tipo de altitudes en suelos no intervenidos se escogió debido a que se encuentra dentro de las referencias geográficas de producción de bioelectricidad.

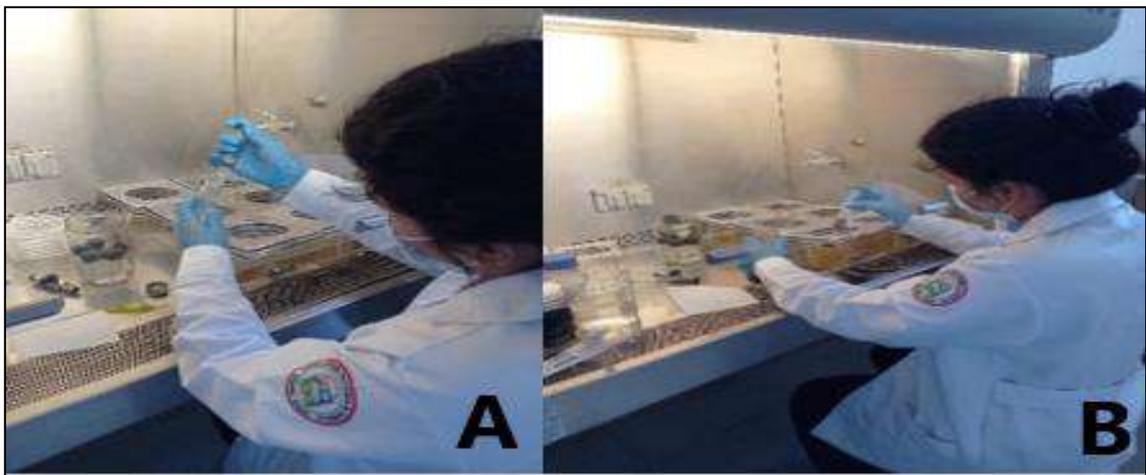


Figura 12-2: Adición del inóculo a las MFCs **A:** adición de la cepa *Delftia acidovorans*. **B:** Adición de la solución de suelo de páramo.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

Una vez realizada la inoculación de las MFCs, se procedió a ensamblar las cámaras anódicas y catódicas. Se comenzó con el cuerpo cilíndrico con su base cuadrada seguido de una lámina de acrílico con un orificio igual al cilindro, después se colocó un empaque con las medidas de las láminas de acrílico, luego la fibra de carbono y papel celofán para separar las cámaras y nuevamente se colocó otro empaque seguido de la cámara catódica con un lamina de acrílico de 9 mm de grosor, después un empaque, la fibra de carbono, luego otro empaque y por último una lámina de acrílico de 6 mm de grosor. Para que las piezas puedan sostenerse se realizaron 8

orificios de 5 mm de diámetro en cada lámina cuadrada para ajustar las piezas con tornillos galvanizados como se muestra en la figura 13-2. Adicional con la ayuda de una bomba se procedió a terminar con el llenado de las celdas con el lixiviado hasta que este entre en contacto con la fibra de carbono del compartimento anódico.

Al final de este procedimiento, las celdas estuvieron disponibles para ser conectadas a un sistema de adquisición de datos para su respectivo monitoreo.

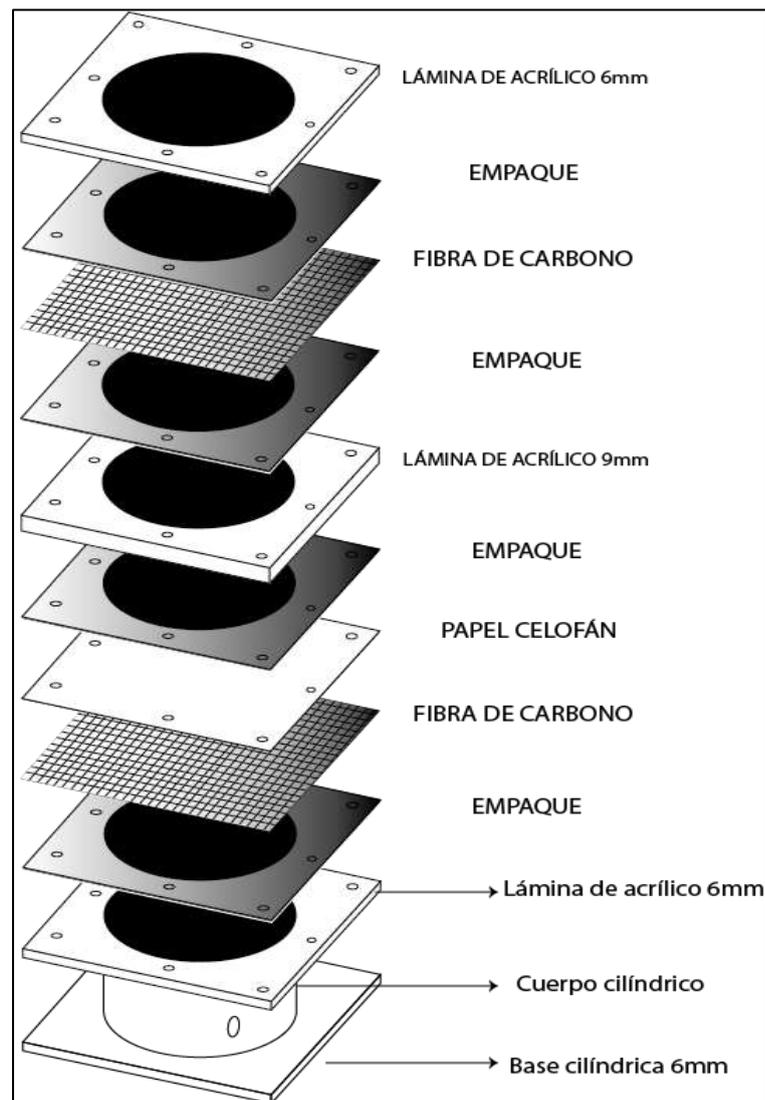


Figura 13-2: Esquema del ensamblaje de las MFCs

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

2.7. Monitoreo y seguimiento de la investigación

2.7.1. Análisis de lixiviados

- Método de análisis 4500-H-B: es empleado para medir el pH de una muestra de agua residual

por potenciometría utilizando un electrodo de hidrógeno estándar, para realizar la medición de pH se procedió a retirar el electrodo de la solución de almacenamiento para enjuagar y secarlo antes de sumergirlo en la muestra de interés, una vez sumergido el electrodo en la muestra de lixiviado se realizó la lectura del pH en el equipo (APHA et al., 2017, pp. 42-65).

- Método 2510-B: Se lo emplea para la medición de conductividad, para ello primero se realizó la medición de una solución de verificación de 0.01mol/L, luego se procedió a lavar y secar el electrodo para sumergirlo en la muestra de lixiviados y realizar la lectura de la conductividad de la muestra en el equipo (APHA et al., 2017, pp. 42-65).
- 5220-D : método colorimétrico para medición de DQO, se inició con la preparación de la muestra a analizar, luego se procedió con la medición de la reducción de dicromato, donde se mezcló el contenido de los recipientes de reacción para combinar el agua condensada y desalojar la materia insoluble, luego de ello se deja asentar la materia suspendida para que el camino óptico este despejado, después se mide la absorción de cada muestra en blanco y estándar a la longitud de onda de (420 nm o 600 nm) y se procedió finalmente a realizar el cálculo de la DQO (APHA et al., 2017, pp. 42-65).
- 5210-B: Es un método estándar para medición de DBO de 5 días, primero se realizó el ajuste de pH con una solución tampón ya que la muestra a medir debe estar entre 7.0 a 7.2. Una vez preparada la muestra se llenó hasta rebosar un frasco hermético con una capacidad de 60 mL e incubarlo a una temperatura de 20°C durante 5 días. Se midió inicialmente y después de la incubación el oxígeno disuelto, al final para el cálculo de la DBO se realizó la diferencia entre el OD inicial y el final (APHA et al., 2017, pp. 42-65).
- 4500-NH4-C: es un método volumétrico donde el amoníaco se titula con ácido sulfúrico estándar usando un indicador mixto de rojo de metilo y azul de metileno (APHA et al., 2017, pp. 42-65).

2.7.2. Operacionalización de las MFCs

Para el monitoreo de MFCs se utilizó un sistema de adquisición de datos que consistió en un Arduino 1, y 3 conversores análogos ads1115 I2c que permitieron recolectar automáticamente datos de voltaje cada 60 segundos en un ordenador durante 15 días.

Se realizó la medición de pH de las 6 celdas cada día por el transcurso del experimento en el laboratorio de calidad de agua y el tiempo de retención hidráulico considerado fue de 24 horas para la recirculación del sustrato (Escapa et al., 2012, pp. 55-62) como se muestra en la figura 14-2.

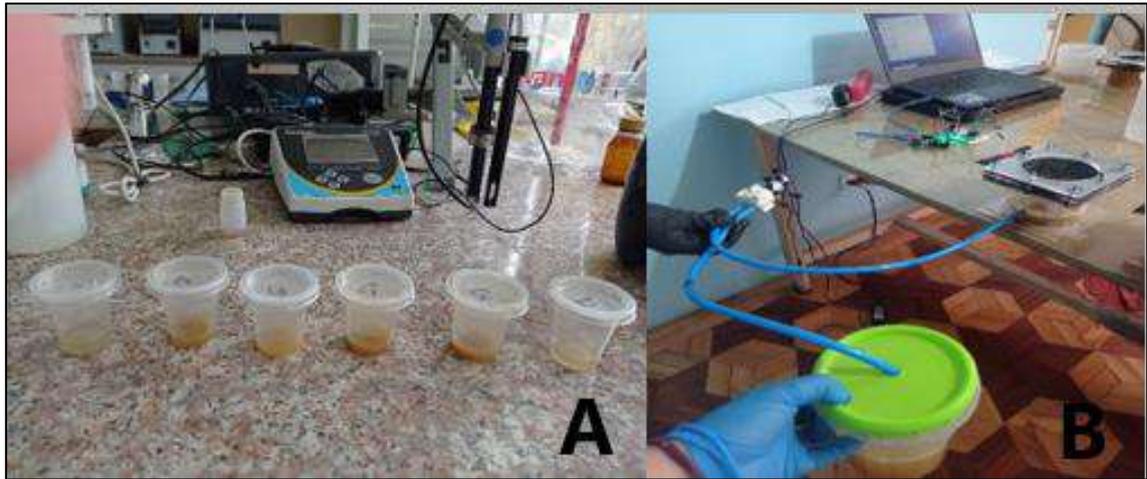


Figura 14-2: Operacionalización de MFCs. **A:** Medición de pH. **B:** Recirculación del sustrato.

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

2.8. Materiales experimentales

En la Tabla 3-2 se describen los equipos, materiales de laboratorio y cantidades utilizadas durante las diferentes etapas de la investigación.

Tabla 2-2: Recursos utilizados en el desarrollo de la investigación

Etapas de la investigación	Equipos y materiales	Cantidad	Sustancias y reactivos
Siembra de bacterias	Probeta 100 mL	1	Agar Nutritivo Agua destilada
	Balanza analítica	1	
	Erlenmeyer 250 mL	1	
	Micropipeta de 0.1-1 mL	1	
	Puntas de 1 mL	8	
	Espátula Drigalsky	1	
	Cajas Petri	8	
	Lámpara de alcohol	1	
	Cámara de flujo laminar	1	
	Parafilm	1	
	Autoclave	1	
Identificación molecular	Cajas Petri	8	Buffer de extracción B-Mercaptoetanol Cloroformo congelado Etanol frío Acetato de sodio 3M Etanol 70% filtrado Agua filtrada ultrapura RNAsa Máster mix TBE Agarosa Bromuro de etidio
	Cooler	1	
	Tubos de 1.5 mL	34	
	Perlas de vidrio	24	
	Micropipeta 0.5 – 10 uL	1	
	Micropipeta 10 – 100 uL	1	
	Micropipeta 100 – 1000 uL	1	
	Puntas para micropipeta	100	
	Vortex	1	
	Microcentrífuga	1	
	Baño maría	1	
	Nanodrop	1	
	Computadora	1	
	Cámara de flujo laminar	1	
	Termociclador	1	
	Microondas	1	
	Cámara de electroforesis	1	

	Marcador molecular	1	
Muestreo de residuos y obtención de lixiviados	Fundas ziploc	60	Agua tesalia
	Balanza	1	
	Guantes		
Construcción de celdas	Láminas de acrílico 14x14 cm	54	
	Cilindros de acrílico	6	
	Cortes de fibra de carbono de 0.8 mm de espesor	12	
	Empaques	24	
	Tornillos galvanizados	48	
	Lagartos	12	
	Tijeras	1	
	Perforadora	1	
	Papel celofán	1m2	
Inoculación de las celdas	Jeringuillas de 10 mL	2	25 mL de la cepa <i>Delftia acidovorans</i> 25 mL de la solución de suelo de páramo Alcohol potable al 96% Lixiviado
	Vaso de precipitación de 250 mL	1	
	Erlenmeyer	1	
	Guantes		
	Toallas de papel		
Pretratamiento de las MFCs	Tacho de plástico	1	Solución de hipoclorito de sodio al 5% Acetona industrial Sulfato de amonio Agua comercial Ácido sulfúrico al 10% Agua destilada
	Vasos de precipitación 1000 mL	2	
	Matraz balón 500 mL	1	
	Probeta 100 mL	1	
	Pipeta 10 mL	1	
	Pera de succión	1	
Operacionalización de las MFCs	Arduino	1	
	convertidores análogos ads1115	3	
	I2c		
	Computadora	1	
	Cable UTP	1m	

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

2.9. Planteamiento de hipótesis

2.9.1. Hipótesis Textual

Los cultivos axénicos de bacterias electrogénicas identificadas molecularmente influyen en la concentración de materia orgánica presente en los lixiviados de residuos orgánicos mediante la implementación de la tecnología MFC.

2.9.2. Hipótesis estadística

$$H_0: \delta CH = \delta CD$$

$$H_a: \delta CH \neq \delta CD$$

Donde:

δCH = Voltaje de corriente directa producida por cultivos heterótrofos.

δCD = Voltaje de corriente directa producida por la cepa *Delftia acidovorans*.

2.9.2.1. Hipótesis estadística causal bivariada

Relación entre una variable independiente (bacterias electrogénicas) con respecto a una variable dependiente (remoción de materia orgánica)

2.9.3. Variables

- Variables dependientes: Generación de bioelectricidad medida en voltios de corriente directa VCD y la remoción de materia orgánica medida en DBO.
- Variable independiente: MFCs con bacterias electrogénicas.
- Variables intervinientes: condiciones de laboratorio (T, pH, humedad, presión, entre otros.)

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. *Obtención de bacterias electrogénicas*

- *Aislamiento bacteriano*

En la investigación de Mazo (2020, pp. 24-37) se reportan 13 cepas aisladas, de las cuales 3 pertenecían a celdas de 125 mL con sustratos orgánicos (residuos de frutas y verduras). Las cepas bacterianas fueron caracterizadas microscópicamente mediante tinción Gram y vistas a través de un microscopio óptico para describir su morfología y cada cepa bacteriana fue replicada 6 veces hasta obtener un cultivo puro. Al final las cepas bacterianas fueron conservadas en glicerol 1:1 a una temperatura de -22 °C en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, ESPOCH.

3.1.2. *Identificación molecular*

- *Extracción del ADN*

La extracción de ADN de las muestras se realizó por métodos convencionales utilizando aproximadamente 100 mg de pellet. Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa con la intención de obtener presencia de ácidos nucleicos. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- *Amplificación del ADN*

El ADN bacteriano de cada una de las muestras fue amplificado y se visualizó el ensamblaje de la PCR convencional en gel de agarosa 1% de fragmento de aproximadamente 1200pb, amplificado con primers 27F/1492R, usando marcador de peso molecular ABM 100pb Opti-DNA Marker (Figura 1-3).

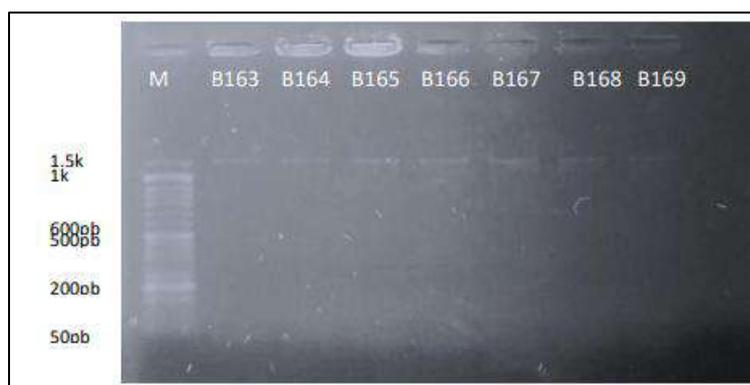


Figura 1-3: Visualización en gel de agarosa

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

- *Secuenciación e identificación bacteriana*

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos como el programa Geneious 9.0.1. Una vez ensambladas las secuencias se compararon con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

Los resultados obtenidos no mostraron calidad suficiente en ambas secuencias para lograr un ensamblaje, por lo que se hicieron las identificaciones con las secuencias sin emparejar. El porcentaje de identidad de los resultados debía ser mayor al 99% para obtener una buena identificación molecular de las bacterias, sin embargo, las muestras correspondientes a A240 y C140 obtuvieron un porcentaje de identidad menor al 99%, por lo que no permitieron asegurar que el aislado corresponde a esa especie. Al secuenciar la muestra con código B140, se obtuvieron secuencias cuyas calidades no permiten el análisis bioinformático para la determinación de su identificación por comparación con las bases de datos del NCBI.

En la tabla 1-3, a continuación, se presenta la identificación molecular de microorganismos aislados

Tabla 1-3: Identificación molecular de microorganismos aislados

Código original	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
A140	403	61.5	<i>Delftia acidovorans</i>	16S	99.26	LC462156.1
A240	1306	74.6	<i>Providencia rustigianii</i>	16S	80.51	KJ806379.1
B140	-					
C140	450	10.4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16S	82.35	MH165371.1
C240	718	87.3	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.86	CP049015.1
D140	767	71.7	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.35	CP049015.1
D240	692	79.5	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.42	CP049015.1
E140	580	71.4	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	16S	99.31	MH304643.2

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

La cepa seleccionada para la experimentación fue *Delftia acidovorans*, ya que por bibliografía se conoce que posee una amplia distribución medioambiental, encontrándose en el agua, suelos y plantas. Bilgin et al. (2015, p. 278); presenta características electrogénicas y según Leiva et al. (2019, pp. 639-646) en su investigación, las biopelículas anódicas formadas en los reactores de mejor rendimiento estaban presentes bacterias del género *Delftia*, la cual en la actualidad se le conoce como un taxón con propiedades electrogénicas, y al dar buena respuesta al ser empleadas en MFC con pH bajo, demuestra que esta tecnología puede ser aplicada para tratar cargas orgánicas ácidas. También ha sido empleada en MFCs con cátodo expuesto donde generó un voltaje máximo de 340.75 mV (Chen et al, 2014, p.3), además de que puede metabolizar sustratos como la glucosa.

3.1.3. Celdas microbianas con propósitos bioelectrogénicos

En la tabla 2-3 se muestra la nomenclatura empleada en la investigación.

Tabla 2-3: Nomenclatura de los tratamientos aplicados

Nomenclatura			
CH	Cultivos Heterótrofos	C1	Celda uno
DA	Cepa <i>Delftia acidovorans</i>	C2	Celda dos
Unidad de voltaje	milivoltios (mV)	C3	Celda tres

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

- *Pruebas de ensayo*

Los valores obtenidos de voltaje en las pruebas de ensayo demostraron que la bacteria empleada usa como sustrato a la muestra de lixiviado proveniente de residuos de frutas y verduras debido a su asimilación con biomoléculas de carbohidratos y glucosa. (Logroño et al., 2014, pp. 61-68). En el mejor de los casos los valores de voltaje durante los 5 días fueron aumentando, comenzando con un voltaje de 9.5 mV en el día uno y finalizando con un voltaje de 32.7 mV en el día 5, demostrando que no existió algún tipo de inhibidor potencial que pueda afectar la producción de voltaje en la MFC. En el gráfico 1-3 a continuación se muestra la variación de voltaje producido en la celda (DA+Lixiviado)

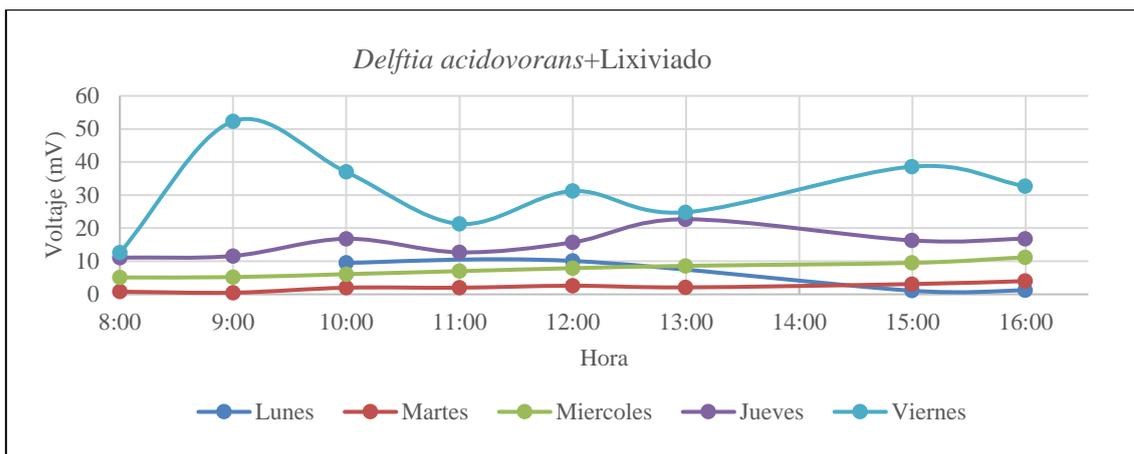


Gráfico 1-3: Variación de voltaje producido en la celda (DA+Lixiviado)

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

Por otro lado, para la MFC con glucosa se comenzó adicionando 2 ppm de glucosa a los dos días siguiente se aumentó a 4 ppm y el ultimo día a 8 ppm (Logroño et al., 2014, pp. 61-68). El primer día de monitoreo comenzó con un voltaje de 6.9 mV y concluyó con uno de 0.7 mV como se muestra en el gráfico 1-3. Lo que nos indicó que la glucosa como sustrato no ayudó a la cepa empleada para la producción de voltaje, por las características metabólicas de la bacteria, no todas asimilan glucosa en medios enriquecidos. En comparación con Chen, et al. (2013, pp. 286-293) donde según sus investigaciones esta cepa en cultivo mixto resultó eficiente para la producción de voltaje en MFC anaerobias con concentraciones de glucosa de 2000 mg/L; cabe recalcar que la investigación propuesta no se encamina a experimentar sinergismos microbianos.

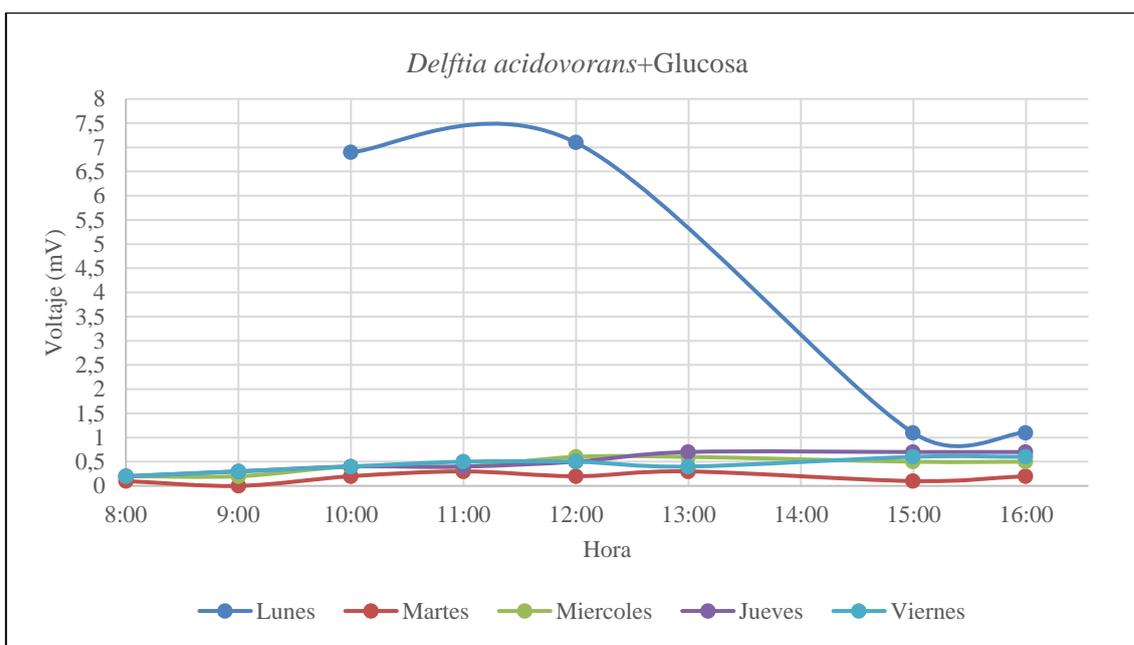


Gráfico 2-3: Variación de voltaje producido en la celda (DA+Glucosa)

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

3.1.4. Monitoreo y seguimiento de la investigación

- *Muestreo de lixiviados*

El sustrato empleado en la experimentación fue un lixiviado proveniente de la combinación de residuos de frutas y verduras en una proporción 50:50 (Pérez, 2019, p. 22), de la cual de 2 kg residuos por día se obtuvo 600 mL de lixiviado puro. En la tabla 2-3 se muestra los residuos de frutas y verduras recolectados por día, donde se evidencia que existe una similitud en los residuos que se desechan en más cantidad diariamente.

Tabla 3-3: Fecha y hora de los muestreos de los residuos sólidos (frutas y verduras)

Día de muestreo	Viernes	Sábado	Domingo	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves
Fecha y hora	04/11/21 12:00 pm	05/11/21 12:30 pm	06/11/21 12:00 pm	07/11/21 11:30 pm	08/11/21 12:00 pm	09/11/21 12:00 pm	10/11/21 12:00 pm
Vegetal	Cascaras de haba Tomate Zapallo Cebolla	Cascaras de haba Pimiento Cebolla Rábano	Cascaras de haba Rábano Tomate Zanahoria	Rábano Tomate Pimiento Cascara de habas	Cascara de haba Tomate Zanahoria Pimiento	Tomate Rábano Zanahoria Cebolla blanca	Cebolla Cascara de haba Tomate Rábano
Fruta	Naranja, papaya, babaco, banano	Naranja Mandarina Papaya Banano	Banano, Papaya Naranja Mandarina	Banano Papaya Naranja Mandarina	Papaya Banano Naranja Mandarina	Papaya Naranja Banano Mandarina	Naranja Mandarina Papaya Banano

Realizado por: Rivas, Jomayra. 2022.

- *Análisis de lixiviados*

En la tabla 2-3 se encuentra detallado el análisis inicial y final del lixiviado. Según el TULSMA los lixiviados que se generan en los rellenos sanitarios deben cumplir con los límites que se establecen para la descarga de efluentes a un cuerpo de agua dulce, por tanto, basándose en esa información los valores iniciales del sustrato para DBO5, DQO y Nitrógeno amoniacal se encontraban fuera de norma.

Tabla 4-3: Resultados de análisis de lixiviados previo y al final de la experimentación

Parámetros	unidades	Método de análisis	Resultados (Inicio)	Resultados finales (DA)	Resultados finales (CH)	Límites permisibles descargas a cuerpos de agua dulce	% remoción DA	% Remoción CH
pH	-	4500-H-B	4.18	5.33	5.58	-	-	-
Conductividad eléctrica	mSiems/cm	2510-B	6.64	2.07	1.58	-	-	-

Demanda Química de Oxígeno	mg/L	5220-D	93000	14430	11410	100	84.48	87.73
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	5210-B	13000	5940	5270	50	54.31	59.46
N. amoniacal	mg/L	4500-NH4-C	229	31.2	27.5	30	86.37	86.89

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

La DQO fue removida de 93000 ppm hasta 14430 ppm y 11410 ppm para la muestra tratada con la cepa *D. acidovorans* (DA) y cultivos heterótrofos (CH) respectivamente. La DBO disminuyó más de la mitad para ambos casos. Aunque la concentración de los dos parámetros descendió significativamente, no se llegó a estar bajo los límites permisibles para descargas a cuerpos de agua dulce según la norma TULSMA. Por otro lado, el nitrógeno amoniacal fue removido hasta llegar a 31.2 ppm para DA y 27.5 ppm para CH llegando a valores por debajo del límite permisible. La reducción de concentración de DQO en el sustrato pudo deberse al efecto de recirculación en MFC coincidiendo con Moharir y Tembhurkar (2018, p. 10063) esta mejora la producción de bioelectricidad y las actividades microbianas en la celda, dando lugar a una mayor eliminación de DQO.

El grupo que presentó mayor remoción de materia orgánica fue el que contenía la muestra de suelo de páramo, donde este tipo de suelos en otras investigaciones como la de Logroño et al. (2015, pp. 2009-2014) sugiere que la comunidad microbiana de suelo de páramo puede producir electricidad a partir de materia fácilmente degradable. Si bien se conoce que los cultivos puros permiten la obtención de mejores voltajes de energía eléctrica, para obtener voltajes aún mayores se requiere emplear cultivos bacterianos mixtos, para que actúen en sinergia como lo explica Jothinathan y Wilson (2017, pp. 520-527).

Empleando tratamientos convencionales de lixiviados como transferencia de lixiviados, biodegradación y procesos fisicoquímicos se han obtenido porcentajes de remoción de DQO y N-NH₄ en el mejor de los casos bastante altos como se muestra en la tabla 5-3, sin embargo, estos valores pueden variar y en distintas investigaciones como señala Renou et al. (2008, p. 65) han sido diferentes teniendo porcentajes de remoción altos y bajos. A pesar de que en algunos procesos la eliminación de contaminantes con estas tecnologías puede ser mayor que la mostrada en esta investigación usando MFCs, esta última tiene un valor adicional a comparación de las otras y es la recuperación de energía.

Tabla 5-3: Porcentajes de remoción de contaminantes de diferentes tratamientos de lixiviados

Tipo de Tratamiento	Proceso	% Remoción de contaminantes
Transferencia de lixiviados	Recirculación y tratamiento combinado con aguas residuales domésticas	63 al 70% DQO y en el mejor de los casos hasta un 98%.
Biodegradación	Aerobios	55 al 64 % de la DQO en lagunas aireadas 97% COD y 87.5% N-NH ₄ ⁺ usando reactores aerobios
	Anaerobios	40% DQO con lagunas no aireadas reactores de lecho fluidizado 20% DQO hasta un 81%. 31% N-NH ₄ >70% DQO reactores UASB
Procesos fisicoquímicos	Oxidación química	50-70 % DQO
	Adsorción	85% DQO
	Precipitación química	Hasta un 98% N-NH ₄ 40-50% DQO
	Coagulación / floculación:	Hasta un 50% DQO
	Flotación con aire disuelto	76-93% N-NH ₄
Procesos tecnológicos	Microfiltración	25-35% DQO
	Ultrafiltración	10-75% DQO
	Osmosis inversa	>98% DQO
MFC	DA	DQO: 84.48% DBO: 54.31% N-NH ₄ : 86.37%
	CH	DQO: 87.73% DBO: 59.46% N-NH ₄ : 86.89 %

Fuente: Renou (2008, p. 65).

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

3.1.5. Operacionalización de las MFCs

- Voltaje generado

Tabla 6-3: Promedio de voltaje generado en milivoltios

Día	Cultivos heterótrofos			Cepa <i>Delftia acidovorans</i>		
	C1 CH	C2 CH	C3 CH	C1 DA	C2 DA	C3 DA
1	151.55	23.01	19.55	70.84	19.76	87.84
2	249.55	52.37	56.78	123.15	66.75	166.54
3	303.30	10.30	213.58	129.76	139.48	152.52
4	339.61	22.31	238.76	55.88	177.63	143.35
5	344.86	43.88	78.65	27.82	161.48	72.43
6	268.40	55.79	16.35	105.24	93.67	58.63
7	242.15	16.16	12.88	99.84	30.54	37.58
8	172.77	12.13	123.92	164.35	54.69	129.53
9	108.11	48.97	206.25	203.19	56.31	189.82
10	128.23	28.72	201.44	212.20	71.50	229.33
11	274.03	35.59	190.21	198.48	91.62	242.10
12	93.31	43.07	178.17	170.33	133.80	217.52
13	65.84	17.51	173.24	153.60	153.11	181.20
14	76.51	71.05	162.83	137.57	160.55	157.34
15	50.67	142.51	165.44	118.65	174.17	137.41
promedio por celda	191.26	41.56	135.87	131.39	105.67	146.88
Promedio CH	122.90			Promedio DA	127.98	

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

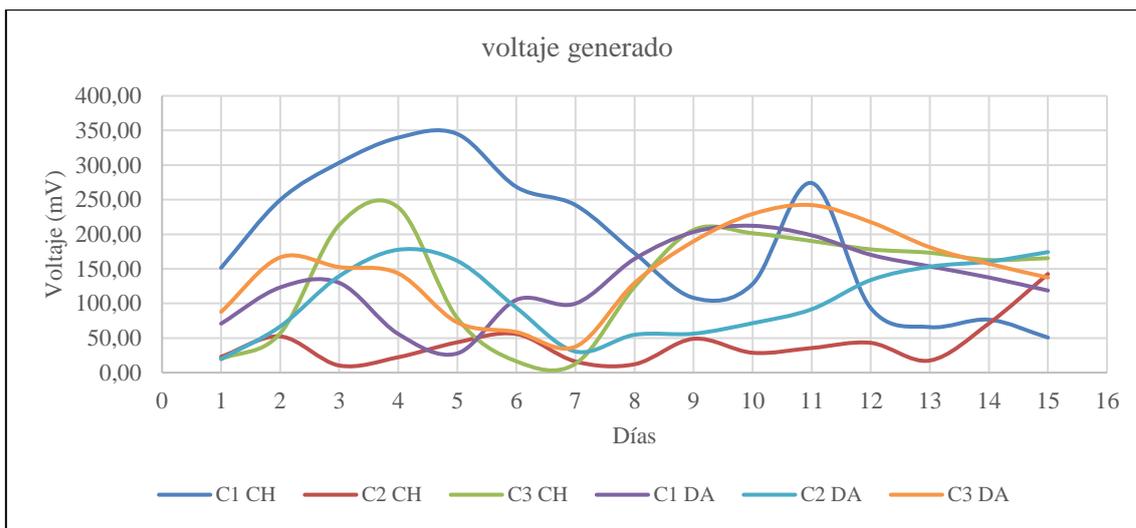


Gráfico 3-3: Voltaje generado por las MFCs

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

En la tabla 6-3 y el gráfico 3-3 se observa el voltaje promedio por día de cada celda empleada, evidenciándose que C1CH fue la que mayor promedio de voltaje generó para el tratamiento de lixiviados con cultivos heterótrofos llegando a tener un pico de 344.86 mV. Por otro lado, para el grupo DA, la celda C3DA mostró un pico de 242.10 mV. El promedio general de voltaje de corriente directa para cada tratamiento fue de 122.90 y 127.98 mV para CH y DA respectivamente.

En el gráfico 4-3 a continuación, se indica el mejor promedio de voltaje generado en el tratamiento CH y el DA en los 15 días de monitoreo indicando que C1CH tuvo un voltaje mínimo de 50.67 mV y máximo de 344.86 mV, en el caso de C3DA presentó 37.58 mV como valor mínimo y 242.10 mV siendo el valor de voltaje máximo generado.

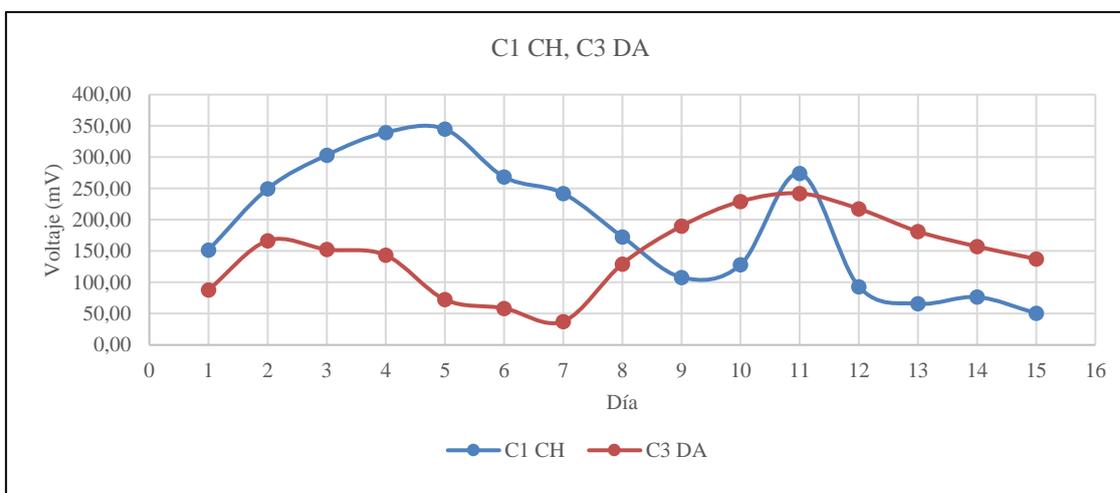


Gráfico 4-3: Voltaje generado por las MFC C1CH

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

- *pH*

Tabla 7-3: pH medido diario de las MFCs durante la experimentación

Fecha	Día	PH					
		C1 CH	C2 CH	C3 CH	C1 DA	C2 DA	C3 DA
25/2/2022	0	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72
26/2/2022	1	5.04	4.96	5.05	4.91	4.91	4.90
27/2/2022	2	5.05	4.97	5.07	4.93	4.96	4.92
28/2/2022	3	5.06	4.99	5.10	4.94	5.00	4.93
1/3/2022	4	5.07	5.00	5.12	4.96	5.05	4.95
2/3/2022	5	5.08	5.01	5.15	4.98	5.10	4.97
3/3/2022	6	5.05	5.03	5.12	4.96	5.15	4.94
4/3/2022	7	5.07	5.06	5.21	5.00	5.28	5.01
5/3/2022	8	5.13	5.10	5.24	5.04	5.29	5.07
6/3/2022	9	5.19	5.13	5.26	5.09	5.30	5.13
7/3/2022	10	5.26	5.17	5.29	5.13	5.30	5.19
8/3/2022	11	5.20	5.15	5.25	5.08	5.25	5.14
9/3/2022	12	5.16	5.21	5.32	5.12	5.36	5.19
10/3/2022	13	5.22	5.20	5.30	5.15	5.38	5.18
11/3/2022	14	5.49	5.24	5.30	5.14	5.40	5.16
12/3/2022	15	5.60	5.30	5.22	5.17	5.42	5.10

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

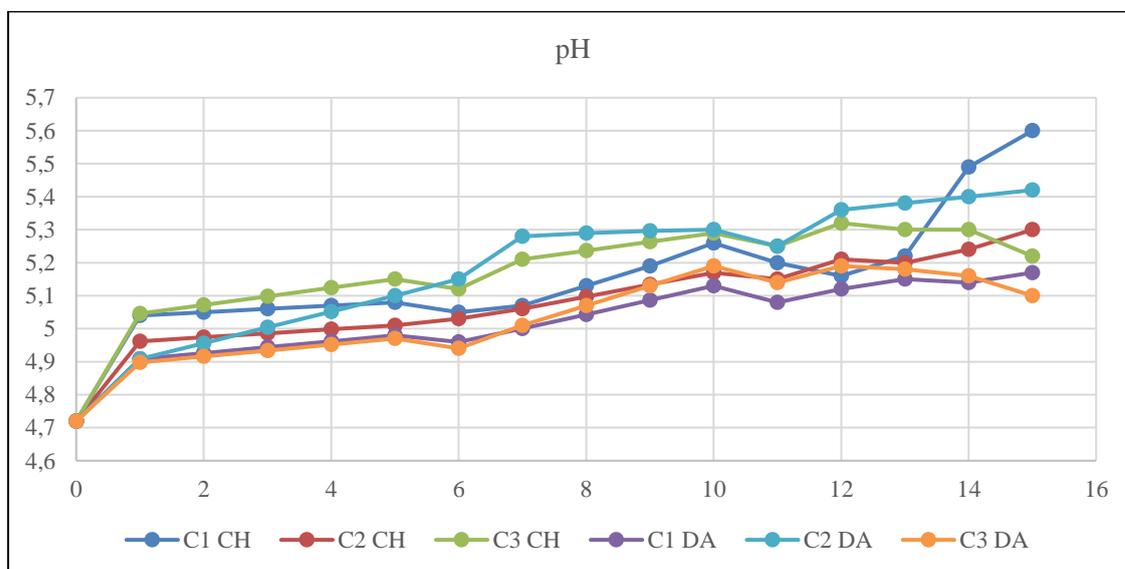


Gráfico 5-3: pH de las MFCs durante la experimentación

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

En la tabla 10-3 y el gráfico 6-3 se muestra que el pH inicial de la muestra de lixiviados fue de 4.72, a partir de ahí cada día durante 15 días fue aumentando hasta llegar a 5.6, 5.3, 5.22, 5.17, 5.42 y 5.1 para los tratamientos C1CH, C2CH, C3CH, C1DA, C2DA y C3DA respectivamente. Por bibliografía se conoce que las MFCs tienen mejor rendimiento en pH neutros (Borole et al, 2008, pp. 1367–1372; Behera et al., 2010, pp. 228–233), sin embargo, en la presente investigación se demuestra

que, aunque se empezó con valores de pH ácidos, las MFCs de inicio a fin tuvieron un buen rendimiento en cuanto a la producción de voltaje.

El aumento de pH se encuentra asociado a la eliminación de DQO en MFCs en flujo continuo, coincidiendo con la investigación de Leiva et al. (2016, pp. 1-9), donde realizó una neutralización biológica de aguas ácidas con esta tecnología, sugiriendo que las condiciones del lote pueden favorecer la neutralización del sustrato ácido.

- *Recirculación*

El tiempo de retención hidráulico empleado fue de 24 horas, donde cada día con ayuda de una bomba se realizó la recirculación del líquido, permitiendo la entrada y salida del mismo. La recirculación del sustrato es importante ya que logra mezclar de forma eficaz el contenido de la celda y asegura el contacto entre los microorganismos y el sustrato, además que se ha visto que aumenta el rendimiento en la producción de electricidad ya que mejora la capacidad de transferencia de protones (Moharir y Tembhurkar, 2018, p. 10063). Por temas de evaporación del lixiviado producida por los microorganismos presentes en las MFCs cada día se añadió 10 mL de agua comercial y no de sustrato, esto para no influir en la concentración de materia orgánica final del lixiviado.

3.1.6. *Prueba de hipótesis*

- *Hipótesis estadística*

$$H_0: \delta_{CH} = \delta_{CD}$$

$$H_a: \delta_{CH} \neq \delta_{CD}$$

H₀: No existen diferencias estadísticas entre los dos tratamientos aplicados, es decir que los cultivos axénicos no influyen en la producción de voltaje como en la remoción de materia orgánica presente en el lixiviado.

H_a: Señala que existen diferencias significativas entre los dos tratamientos.

- *Análisis de normalidad*

Para conocer si se debía aplicar un test paramétrico o no paramétrico se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para identificar si los datos siguen una distribución normal. Estas pruebas plantean lo siguiente:

H₀: Los datos siguen una distribución normal

H_a: Los datos no siguen una distribución normal

Nivel de significancia $\alpha=0.05$

Tabla 8-3: Pruebas de normalidad

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Voltaje corriente directa	0.101	90	0.023	0.955	90	0.003

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

Como se observa en la tabla 7-3, en ambos casos el valor de probabilidad p es menor al valor de significancia elegido 0.05 por lo tanto rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alternativa indicando que los datos no se ajustan a una distribución normal al 95% de confiabilidad por lo que se empleó un test no paramétrico para una correcta interpretación en la comprobación de hipótesis.

- *Prueba de Mann-Whitney*

También conocida como prueba de suma de rangos Wilcoxon es una prueba no paramétrica útil para probar la igualdad de medias de dos poblaciones que no siguen una distribución normal y sus muestras son independientes (las muestras provienen de poblaciones diferentes categorizadas CH y DA). En la tabla 8-3 se observa los rangos promedios de ambos tratamientos, este test clasificó los valores dependientes en orden ascendente de cada grupo, el valor más bajo se puntúo con uno, y después se utilizó la suma de los rangos de cada grupo en el cálculo de la estadística de la prueba.

Tabla 9-3: Rangos obtenidos con la prueba Mann-Whitney

Rangos				
	Tipo	N	Rango promedio	Suma de rangos
Voltaje corriente directa	CH	45	42.87	1929.00
	DA	45	48.13	2166.00
	Total	90		

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

Para determinar si la diferencia entre medianas era estadísticamente significativa se comparó el valor p con el nivel de significancia $\alpha=0.05$ y se consideró lo siguiente:

H₀: La diferencia entre las medianas es estadísticamente significativa

H_a: La diferencia entre las medianas no es estadísticamente significativa

La tabla 9-3 muestra que el valor p obtenido es de 0.339 siendo mayor que 0.05, por lo que no se rechaza H_0 , por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Tabla 10-3: Estadístico de prueba

Estadísticos de prueba ^a	
	Voltaje corriente directa
U de Mann-Whitney	894.000
W de Wilcoxon	1929.000
Z	-0.956
Sig. asintótica(bilateral)	0.339
a. Variable de agrupación: Tipo	

Realizado por: Rivas, Jomayra, 2022.

Los cultivos axénicos no influyen significativamente en la producción de electricidad reflejado en sus datos de voltaje de corriente directa, así mismo no existe una diferencia significativa en la remoción de sus parámetros contaminantes característicos de lixiviados, esto debido a que Jothinathan y Wilson (2017, pp. 520–527) demuestran que si se inocula en una misma MFC más de una especie de bacteria se obtiene valores más altos de voltaje a comparación del uso de un cultivo puro. No obstante, la remoción de contaminantes para ambos tratamientos fue similar siendo el mejor de los casos la reducción de DQO y N-NH₄ en 87.73% y 86.89% respectivamente.

CONCLUSIONES

- Se identificó las bacterias provenientes de cultivos axénicos obtenidos de un biofilm anódico de suelo de páramo en investigaciones realizadas por el GIDAC mediante técnicas moleculares, iniciando con la extracción de ADN de las muestras, su amplificación por PCR y la obtención de secuencias de pares de bases analizando su calidad mediante el programa Geneious R9.1 y con ayuda de la base de datos NCBI de las 8 bacterias se pudo identificar 7 microorganismos, de los que se conoce por bibliografía que 3 tienen propiedades electrogénicas, así se seleccionó la bacteria *Delftia acidovorans* como la más adecuada para la experimentación.
- Se construyó celdas de combustible microbianas de configuración simple con cátodo parcialmente expuesto al aire con una alimentación de flujo continuo, la recirculación permitió maximizar el volumen de sustrato empleado para el tratamiento, proporcionó aireación y logró mezclar el contenido de la celda asegurando el contacto entre los microorganismos y el sustrato aumentando la producción de electricidad, además favoreció el aumento de pH en el lixiviado asociado a la remoción de DQO.
- Se aplicó dos tratamientos por triplicado a la muestra de lixiviados, uno con la cepa *Delftia acidovorans* y otro con una muestra de suelo de páramo, las celdas se monitorearon mediante un sistema de adquisición de datos empleando un Arduino 1, y 3 conversores análogos ads1115 I2c permitiendo recolectar automáticamente datos de voltaje cada 60 segundos en un ordenador, en ciclos de 24 horas durante 15 días, obteniéndose un promedio global por tratamiento de 127.98 mV y 122.9 mV para DA y CH respectivamente, por otra parte, los porcentajes de remoción de materia orgánica en el lixiviado medidos en DQO, DBO y N-NH₄, fueron de 84.48% y 87.73% para la muestra con (DA) y (CH) respectivamente para DQO, la DBO disminuyó en más de un 50% para ambos casos y el nitrógeno amoniacal fue removido en un 86.37% para DA y un 86.89% para CH. Ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas estadísticamente tanto en la producción de voltaje como en la remoción de sus parámetros contaminantes propios del lixiviado.

RECOMENDACIONES

- Mejorar el diseño de las celdas en el sistema de operación para evitar pérdidas del sustrato e inóculo, tomando en cuenta que los mismos deben estar en permanente contacto con la membrana de intercambio anódico para generar valores de bioelectricidad estables y continuos.
- Considerar distancias de los electrodos en celdas con volúmenes más grandes, las mismas que pueden limitar el paso de electrones entre sus compartimentos y no conducir la bioelectricidad.
- Combinar cultivos puros en acción sinérgica que puedan maximizar la obtención de voltaje y remoción de cargas contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL DE ELECTRICIDAD. *Balance Nacional de Energía Eléctrica*, 2020 [en línea]. [Consulta: 4 junio 2021]. Disponible en: <https://www.regulacionelectrica.gob.ec/balance-nacional/>

AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL DEL AGUA. *Estrategia nacional de calidad del agua*, 2016 [en línea]. [Consulta: 9 julio 2021]. Disponible en: https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/05/Estrategia-Nacional-de-Calidad-del-Agua_2016-2030.pdf

ÁLVAREZ, A. *Tratamiento biológico del lixiviado generado en relleno sanitario "El Guayabal" de la ciudad de San José de Cúcuta* [en línea]. Barranquilla-Colombia: Universidad del Norte, 2014. [Consulta: 30 junio 2021]. Disponible en <https://elibro.net/es/ereader/epoch/96640?page=3>.

APHA et al. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23 ed. Washington DC-USA: APHA Press, 2017. ISBN: 9780875532875.

ARBIANTI, R.; et al. "Performance Optimization of Microbial Fuel Cell (MFC) Using *Lactobacillus bulgaricus*". *Journal of Applied Sciences*, 2013. 17(1), pp. 32-38. DOI: 10.7454/mst.v17i1.1925

ARDUINO. *Arduino Mega 2560 REV3* [en línea]. 2021. [Consulta: 12 de julio 2021]. Disponible en: <https://store.arduino.cc/usa/mega-2560-r3>

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

BEHERA, M.; et al. "Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH". *Bioelectrochemistry* [en línea], 2010, 79(2), pp. 228–233. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.06.002

BOROLE, A.; et al. "A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium*

cryptum”, *Biotechnology Letters* [en línea], 2008, 30(8), pp. 1367–1372. doi:10.1007/s10529-008-9700-y

BOU, G.; et al. “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], 2011. 29(8), pp. 601–608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012

CASTAÑEDA, M. *Microbiología aplicada: manual de laboratorio*. [en línea], 2004. [Consulta: 15 junio 2021]. Obtenido de: <http://hdl.handle.net/11191/1746>

CENTRO NACIONAL DE INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA. *BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineación local*. [en línea], 2021. [Consulta: 7 de julio 2021]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

CENTRO NACIONAL DE INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA. *Polymerase chain reaction, PCR* [en línea], 2017. [Consulta: 19 de septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

CHEN, C.; et al. “A comparison of bioelectricity in microbial fuel cells with aerobic and anaerobic anodes”. *Environmental Technology* [en línea], 2013. 35(3), pp. 286–293. [Consulta: 4 junio 2021]. doi:10.1080/09593330.2013.826254

CHOI, J.; & AHN, Y. “Enhanced bioelectricity harvesting in microbial fuel cells treating food waste leachate produced from biohydrogen fermentation”. *Bioresource Technology* [en línea], 2015. 183, pp. 53–60. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.109

CHURCH, D.; et al. “Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory”. *Clinical Microbiology Reviews* [en línea], 2020. 33(4). [Consulta: 18 septiembre 2021]. doi:10.1128/cmr.00053-19 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484979/>

ESCAPA, A.; et al. “Performance of a continuous flow microbial electrolysis cell (MEC) fed with domestic wastewater”. *Bioresource Technology* [en línea] 2012, 117, pp. 1-9. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.060

ESFANDYARI, M.; et al. “Mathematical modeling of two-chamber batch microbial fuel cell with pure culture of *Shewanella*”. *Chemical Engineering Research and Design* [en línea], 2017. 117, pp. 34–42. doi:10.1016/j.cherd.2016.09.016

ESPOCH. *Anuario climatológico año 2021* [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.espoch.edu.ec/index.php/estaci%C3%B3n-meteorol%C3%B3gica.html#boletines-mensuales-y-anuarios>

FAO. *Captación y almacenamiento de agua de lluvia* [en línea]. 2013. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i3247s/i3247s.pdf>

FENG, W.; et al. “Distribution of Nitrate Content in Groundwater and Evaluation of Potential Health Risks: A Case Study of Rural Areas in Northern China.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* [en línea], 2020, 17(24), p. 9390. DOI 10.3390/ijerph17249390.

GARCÍA, Paula. “Manejo y Tratamiento de Lixiviados en Rellenos Sanitarios: Revisión bibliográfica y Experiencia en Planta de Tratamiento de Lixiviados de Navarro”. *Especialización en Gerencia Ambiental y Desarrollo Sostenible Empresarial* [en línea], 2018, pp. 1-15. [Consulta: 15 junio 2021]. Disponible en: <https://repository.usc.edu.co/bitstream/handle/20.500.12421/677/MANEJO?sequence=1>

GÓNGORA, A.; et al. “Energía: celdas de combustible microbianas”. *Ingeniería*. [en línea], 2017. 21(1). pp. 54-62. [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/467/46752305005.pdf>

GUAMBO, A.; et al. “Environmental Biosensor potential of microbial fuel cells for Nitrate Reduction”. *Sensors & Transducers* [en línea], 2017, Vol. 217, n° (11). (Ecuador) pp.23-27.

GUIAMET, P. “Biofilms en la biocorrosión y en el biodeterioro de materiales”. *Microbiología Veterinaria*. [en línea], 2019. [Consulta: 15 junio 2021]. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/119482>

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], 2018. 332, pp. 647–657. doi:10.1016/j.cej.2017.09.114.

HE, Zhen.; et al. “Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell” *Environ. Sci. Technol* [en línea], 2005, 39, 5262-5267

HERNANDEZ, G., & SANCHEZ, M. “La plurifuncionalidad de las bacterias electrogénicas”. *Energía alternativa: bioelectrogénesis* [en línea], 2017. n° 211, pp. 4-10.

HERNÁNDEZ, M.; et al. “Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico”. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2019. doi:10.1016/j.ram.2019.06.003

INEC. *Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales.* [en línea]. 2019. [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/gadmunicipales/#:~:text=El%20Censo%20de%20Informaci%C3%B3n%20Ambiental,de%20gesti%C3%B3n%20ambiental%2C%20manejo%20de>

JATOI, A. S.; et al. “Advanced microbial fuel cell for wastewater treatment—a review. Environmental”. *Science and Pollution Research* [en línea], 2020. doi:10.1007/s11356-020-11691-2

JAVED, M.; et al. “Microbial fuel cells as an alternative energy source: current status”. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [en línea], 2018, pp. 1–27. doi:10.1080/02648725.2018.1482108

JOTHINATHAN, D., & WILSON, R. T. “Comparative analysis of power production of pure, coculture, and mixed culture in a microbial fuel cell”. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* [en línea], 2017. 39(5), pp. 520–527. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15567036.2016.1233306>

KARTHICK, S & HARIBABU, K. “Bioelectricity generation in a microbial fuel cell using polypyrrole-molybdenum oxide composite as an effective cathode catalyst”. *Fuel* [en línea], 2020. 275, p. 117994. doi:10.1016/j.fuel.2020.117994

LEIVA, Eduardo.; et al. “Neutralización de agua ácida utilizando celdas de combustible microbianas: una alternativa para el tratamiento de drenaje ácido de minas”. *MDPI* [en línea], 2016, 8 (11). <https://doi.org/10.3390/w8110536>

LEIVA, Enzo.; et al. “Microorganismos organotróficos tolerantes a ácidos enriquecidos a partir de un ambiente afectado por drenaje ácido de mina como inóculo para celdas de combustible microbianas”. *Ciencia del Medio Ambiente Total* [en línea], 2019. Vol 678, pp: 639-646. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.003>

LI, X. M.; et al. “Bioelectricity production from food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of NaCl and pH”. *Bioresource Technology* [en línea], 2013. 149, pp. 452–458. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.037

LI, X. M.; et al. “Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of microbial inocula”. *Process Biochemistry* [en línea], 2013. 48(2), pp. 283–288. [Consulta: 11 junio 2021]. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.001

LIBRO VI ANEXO 1: Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua

LOGROÑO, Washington.; et al. “Bioconversión de Residuos Sólidos Orgánicos con Suelos de la región Amazónica y Alto Andina del Ecuador en Celdas de Combustible Microbiano de Cámara Simple”. *Información Tecnológica* [en línea], 2014. (Ecuador). 26(2), 61-68. doi:10.4067/S0718-07642015000200008

LOGROÑO, Washington.; et al. “Bioelectricity Generation from Vegetables and Fruits Wastes by Using Single Chamber Microbial Fuel Cells with High Andean Soils”. *Energy Procedia* [en línea], 2015. (Ecuador). 75, pp. 2009–2014. doi:10.1016/j.egypro.2015.07.259

LOGROÑO, Washington.; et al. “A Terrestrial Single Chamber Microbial Fuel Cell-based Biosensor for Biochemical Oxygen Demand of Synthetic Rice Washed Wastewater”. *Sensors* [en línea], 2016. 16(1), 101. doi:10.3390/s16010101

MALDONADO, J.; et al. “Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios en filtros anaerobios de flujo ascendente de dos fases (DI – FAFS)”. *Revista INGENIERÍA UC* [en línea], 2017. 24(1). 91-104. [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/707/70750544011.pdf>

MATEO, Sara.; et al. “A critical view on microbial fuel cells: what’s the next stage?”. *ChemSusChem* [en línea], 2018. [Consulta: 11 junio 2021]. doi:10.1002/cssc.201802187

MAZO, Marjorie. Identificación molecular de bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad [en línea] (Trabajo de titulación). (Grado) ESPOCH, Riobamba, Ecuador. 2020. pp: 24-37

MEJÍA, Carlos., & ROMERO, Diego. “Tendencias tecnológicas de depuración de lixiviados en rellenos sanitarios iberoamericanos”. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín* [en línea], 2018. (Colombia). 18(35), pp. 125-147 [Consulta: 11 de junio 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.22395/rium.v18n35a8>

MOHARIR, P., & TEMBHURKAR, A. “Effect of recirculation on bioelectricity generation using microbial fuel cell with food waste leachate as substrate”. *International Journal of Hydrogen Energy* [en línea], 2018 43(21), pp. 10061–10069. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.04.072

MUHAMMAD MOHSIN, Javed.; et al. “Microbial fuel cells as an alternative energy source: current status”. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [en línea], 2018. 34(2), pp. 216-242.

NAVA DIGUERO, Pedro & CASTILLO JUÁREZ, Marcela. “Celdas de combustible microbianas como alternativa para atender los retos de la sostenibilidad: Agua, energía y contaminación”. *Revista de Ingeniería Innovativa* [en línea] 2018. 2(5), pp. 18-34. [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: [Revista_de_Ingenieria_Innovativa_V2_N5_3.pdf](#) (ecorfan.org)

PARVIN, F., & TAREQ, S. M. “Impact of landfill leachate contamination on surface and groundwater of Bangladesh: a systematic review and possible public health risks assessment”. *Applied Water Science* [en línea] 2021. 11(6). [Consulta: 1 de septiembre 2021]. doi:10.1007/s13201-021-01431-3.

PEIRAVI, M.; et al. “Bioelectrochemical treatment of acid mine drainage (AMD) from an abandoned coal mine under aerobic condition”. *Journal of Hazardous Materials* [en línea], 2017. 333, pp. 329–338. [Consulta: 11 junio 2021]. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.03.045

PEÑA-CASTRO, J.; et al. “Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas”. *Educación Química* [en línea], 2013. 24(2), pp. 237–246. doi:10.1016/s0187-893x(13)72468-6

PÉREZ, Miguel. Evaluación de grafeno y magnetita como membranas de intercambio de electrones en celdas de combustible microbianas (Trabajo de titulación). (Grado) ESPOCH, Riobamba, Ecuador. 2019. p. 22

POLO-ÁLVAREZ, A. *Extracción de ADN bacteriano kit de promega mod. extracción de ADN bacteriano kit de promega mod.* [en línea]. 2018. [Consulta: 18 de septiembre 2021]. Disponible en: https://www.academia.edu/44922525/EXTRACCI%C3%93N_DE_ADN_BACTERIANO_KIT_DE_PROMEGA_MOD?auto=citations&from=cover_page

RAFFO, E., & RUIZ, E. “Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno” *Industria Data* [en línea], 2014. 17(1), pp. 71-80. <https://www.redalyc.org/pdf/816/81640855010.pdf>

RAHIMNEJAD, M.; et al. “Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review”. *Alexandria Engineering Journal* [en línea], 2015. 54(3), pp. 745–756. doi:10.1016/j.aej.2015.03.031

REID, W.; et al. “El futuro de la bioenergía”. *Global Change Biology* [en línea], 2020. [Consulta: 11 junio 2021]. <https://doi.org/10.1111/gcb.14883>

RENOU, S., GIVAUDAN, J., POULAIN, S., DIRASSOUYAN, F., AND MOULIN. “Landfill leachate treatment: Review and opportunity”. *Journal of Hazardous Materials*, 2008. 150(3), pp. 468–493. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.077

REVELO, Dolly.; et al. “Microbial fuel cells (mfcs): a challenge for the removal of organic matter and electricity generation”. *Información tecnológica.* [en línea], 2013. 24(6). [Consulta: 11 junio 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>

RÖDER, M., & WELFLE, A. “Bioenergy”. *Managing Global Warming* [en línea], 2019. [Consulta: 1 septiembre 2021]. pp. 379–398. doi:10.1016/b978-0-12-814104-5.00012-0 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128141045000120>

ROSSELLÓ-MÓRA, Ramón., & AMANN, Rudolf. “Past and future species definitions for Bacteria and Archaea”. *Systematic and Applied Microbiology* [en línea], 2015. Vol. 38, n° (4), pp. 209–216. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.001

SANZ, Susana. *Prácticas de microbiología*. 2da edición. España, 2011. ISBN: 978-84-694-0870-4

SANTORO, C.; et al. “Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review”. *Journal of Power Sources* [en línea], 2017. 356, pp. 225–244. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.109

SERRATO, A.; et al. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1era Ed. Ciudad de Mexico: INECC, 2014. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa

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], 2017. [Consulta: 11 junio 2021]. 114, pp.1–7. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.11.002

SRIKANTH, S; et al. “Electro-biocatalytic treatment of petroleum refinery wastewater using microbial fuel cell (MFC) in continuous mode operation”. *Bioresource Technology* [en línea], 2016. 221, pp. 70–77. [Consulta: 18 junio 2021]. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.034

SUGIARTO, T. “LabView-Arduino Interfacing for Data Acquisition and Telemetry system” *ResearchGate* [en línea], 2016. [Consulta: 29 junio 2021]. DOI: 10.13140/RG.2.1.3654.0568

TORRES, P.; et al. “Influencia de la edad de lixiviados sobre su composición fisicoquímica y su potencial de toxicidad”. *U.D.C.A Act. & Div. Cient.* [en línea], 2014. 17(1), pp. 245-255. [Consulta: 29 junio 2021]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v17n1/v17n1a27.pdf>

UTOMO, H. D.; et al. “Recycling solid waste and bioenergy generation in MFC dual-chamber model”. *Energy Procedia* [en línea], 2017. 143, pp. 424–429. [Consulta: 1 de septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610217364706>

VALDERRAMA, Jose Miguel; et al. “Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación”. *Encuentros en la biología* [en línea], 2020. 13(173). Disponible en: http://www.encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7_secuenciacion.pdf

VEGA, A.; et al. “Internet de los objetos empleando Arduino para la gestión eléctrica domiciliaria” *Revista Escuela de Administración de Negocios* [en línea], 2014. 77, pp. 24-41. [Consulta: 29 junio 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/206/20633274004.pdf>

WANG, K.; et al. “Treatment of Landfill Leachate Using Activated Sludge Technology: A Review.” *Archaea* [en línea], 2018, pp:1–10. [Consulta: 1 septiembre 2021]. doi:10.1155/2018/1039453. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6142762/>

WANG, F.; et al. “Identification of Groundwater Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of a Landfill in a Low Permeability Area” *Int J Environ Res Public Health* [en línea], 2021, 18(14). [Consulta: 1 septiembre 2021]. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8307002/>

ZAINI, Muaz.; & MURUGAN, Vel. “Membraneless Microbial Fuel Cell: Characterization of Electrogenic Bacteria and Kinetic Growth Model” *Journal of Environmental Engineering* [en línea], 2019. 145(5). [Consulta: 1 septiembre 2021]. Disponible en: [https://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001522](https://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001522)



ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS INICIAL DE LA MUESTRA DE LIXIVIADOS


Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos
en Aguas y Alimentos

Contactanos: 0998580374 - 032924417
Av. 11 de Noviembre y Milton Reyes Riobamba

INFORME DE ANÁLISIS

Fecha: 19 de enero del 2022
Análisis solicitado por: Srta. Jomayra Rivas
Tipo de muestras: Lixiviado.
Localidad: Mercado Mayorista Cantón Riobamba

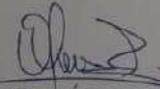
Análisis Químico

Determinaciones	Unidades	*Métodos de análisis	Resultados
pH	-	4500-H-B	4.18
Conductividad Eléctrica	mSiems/cm	2510-B	6.64
Demanda Química de Oxígeno	g/L	5220-D	93.0
Demanda Bioquímica de Oxígeno	g/L	5210-B	13.0
N. Amoniacal	mg/L	4500-NH ₄ -C	229

**Métodos Normalizados: APHA, AWWA, WPCF.*

Observaciones:

Atentamente.


Dra. Gina Álvarez R.
RESPONSABLE TECNICO LABORATORIO
Nota: El presente informe afecta solo a la muestra analizada


Servicio de Análisis Químicos y Microbiológicos
Dra. Gina Álvarez
Telf.: 2 924 322 // Cel.: 0998580374

Tam. 11 de Noviembre y Milton Reyes (Cerca de la Nueva Puerta Epoch - Foz)
Contactos: 0998580374 - 0324518617 - 032942322 - 032900200
Riobamba - Ecuador

ANEXO B: ANÁLISIS FINAL DE LAS MUESTRAS DE LIXIVIADOS TRATADAS



INFORME DE ANÁLISIS

Fecha: 14 de marzo del 2022
Análisis solicitado por: Srta. Jomayra Rivas
Tipo de muestras: Lixiviados.
Localidad: Mercado Mayorista Cantón Riobamba

Análisis Químico

Determinaciones	Unidades	*Métodos de análisis	Muestra 1 DA	Muestra 2 CH
pH	-	4500-H-B	5.33	5.58
Conductividad Eléctrica	mSiems/cm	2510-B	2.07	1.58
Demanda Química de Oxígeno	g/L	5220-D	14.43	11.41
Demanda Bioquímica de Oxígeno	g/L	5210-B	5.94	5.27
N. Amoniacal	mg/L	4500-NH ₄ -C	31.2	27.5

*Métodos Normalizados: APHA, AWWA, WPCF.

Observaciones:

Atentamente.

Dra. Gina Álvarez R.
RESPONSABLE TÉCNICO LABORATORIO

Nota: El presente informe afecta solo a la muestra analizada



Avenida 9 de Octubre # 12 y Madrid
Contáctanos: ☎0998580374 ☎032 942 322
Saqmic Laboratorio
Riobamba - Ecuador

saqmic



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

*UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL*

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 12 / 05 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Jamayra Karolina Rivas Veles</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Ingeniería en Biotecnología Ambiental</i>
Título a optar: <i>Ingeniera en Biotecnología Ambiental</i>
I. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Rúaie MSc.</i>

Leonardo Medina
13-05-2022

0924-DBRA-UTP-2022