



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE REACTIVACIÓN EN
CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD”**

AUTORA: LUCELY NATALY VALDIVIESO VALDIVIESO

TUTOR: DR. CELSO GUILLERMO RECALDE MORENO

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTOS TÉCNICOS

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Riobamba – Ecuador

2017

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Proyecto Técnico: **“EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE REACTIVACIÓN EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD”**, de responsabilidad de la señorita egresada Lucely Nataly Valdivieso Valdivieso, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajos de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Dr. Celso Recalde
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Dr. Gerardo Medina
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Yo, Lucely Nataly Valdivieso Valdivieso, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Lucely Nataly Valdivieso Valdivieso

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su nivel académico desarrollado en los años de estudios, y especialmente al Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA), al Dr. Celso Recalde, Ing. Mario Pérez, por su contribución para desarrollar este trabajo fortalecido en amplios conocimientos de investigación.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Gerardo Medina, Ing. Anita Cunachi, Dennis López por su incondicional apoyo y amistad durante el desarrollo de nuestro trabajo.

A todos nuestros amigos por su valioso aporte y sincera amistad.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado salud y las fuerzas para alcanzar mis objetivos. A mis padres por su gran amor y cariño, haberme brindado todo su apoyo, la educación y enseñarme a tener fortaleza en todo momento. A mis hermanos por su amistad.

A toda mi familia por el cariño, aprecio y sabios consejos *GRACIAS!*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv

INTRODUCCIÓN	1
---------------------------	---

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Antecedentes del proyecto	5
1.2 Marco conceptual	6
1.2.1 <i>Celdas de combustible microbiano</i>	6
1.2.2 <i>Sustratos para una CCM</i>	8
1.2.3 <i>Microbiología bacteriana</i>	9
1.2.3.1 <i>Factores de crecimiento microbiano</i>	9
1.2.4 <i>Microorganismos electrogénicos en las CCMS</i>	12

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA	13
2.1 Métodos	13
2.1.1 <i>Muestreo de la celda (CCM 50:50)</i>	15
2.1.2 <i>Análisis físico químico de suelo de CCMI</i>	15
2.1.3 <i>Cultivo y conteo microbiano inicial</i>	15
2.1.4 <i>Instalación y configuración de las CCM</i>	16
2.1.5 <i>Mecanismo de reactivación con glucosa</i>	19
2.1.6 <i>Mecanismo de reactivación con inducción de pulsos de corriente directa</i>	20

2.1.7	<i>Cultivo y conteo microbiano final</i>	15
2.2	Diseño del proyecto	21

CAPITULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1	Análisis de resultados	22
3.1.1	<i>Caracterización físico química del suelo</i>	22
3.1.2	<i>Recuento inicial microbiológico</i>	23
3.1.3	<i>Recuento final microbiológico</i>	24
3.1.4	<i>Producción de bioelectricidad</i>	26

	CONCLUSIONES	43
--	---------------------------	-----------

	RECOMENDACIONES	44
--	------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Sustratos utilizados en CCMs.....	8
Tabla 1-2	Materiales Experimentales.....	13
Tabla 2-2	Equipos Utilizados.....	14
Tabla 2-2	Materiales de Laboratorio para el análisis microbiológico.....	14
Tabla 1-3	Análisis Físico Químico del Suelo.....	22
Tabla 2-3	Comparación con caracterización del Suelo de la CCM1.	22
Tabla 3-3	Registro Inicial UFC de CCM1	23
Tabla 4-3	Crecimiento promedio total inicial	24
Tabla 5-3	Registro final de UFC para cada CCM.....	25
Tabla 6-3	Crecimiento promedio total final.....	25
Tabla 7-3	Registro Promedio de voltaje para cada periodo de prueba.....	26
Tabla 8-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación I	32
Tabla 9-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación I.....	32
Tabla 10-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación I.....	33
Tabla 11-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación II.....	34
Tabla 12-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación II.....	34
Tabla 13-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación II	34
Tabla 14-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación III.....	35
Tabla 15-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación III	35
Tabla 16-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación III	36
Tabla 17-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación IV	36
Tabla 18-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación IV	37
Tabla 19-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación IV	37
Tabla 20-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación V.....	38
Tabla 21-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación V	38
Tabla 22-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación V	39
Tabla 23-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación VI	40
Tabla 24-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación VI.....	40
Tabla 25-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación VI.....	40
Tabla 26-3	Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación VII	41
Tabla 27-3	Análisis de Medias para el Periodo de reactivación VII.....	41
Tabla 28-3	Test de Tukey para el Periodo de reactivación VII.....	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1	Esquema de una CCM de cámara simple	6
Gráfico 2-1	Curva de Crecimiento Microbiano	10
Gráfico 1-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo I.....	26
Gráfico 2-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo II	27
Gráfico 3-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo III.....	28
Gráfico 4-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo IV.....	28
Gráfico 5-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo V	29
Gráfico 6-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo VI.....	29
Gráfico 7-3	Producción de voltaje en las CCM, Periodo VII	30
Gráfico 8-3	Producción de voltaje en las CCM, durante todos los tratamientos.....	31

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2	Celda de combustible microbiana 1 (CCM1).....	15
Fotografía 2-2	Cajas de acrílico	17
Fotografía 3-2	Colocación del suelo en las cajas	18
Fotografía 4-2	Ensamblaje de una CCM.....	18
Fotografía 5-2	Instalación de las CCMs con el DAQ	19
Fotografía 6-2	Medición de la CCMC	19
Fotografía 7-2	Alimentación con Glucosa a una CCM.....	20
Fotografía 8-2	Pulso de Voltaje a las CCM	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	RECuento INICIAL MICROBIOLÓGICO
Anexo B	RECuento FINAL MICROBIOLÓGICO
Anexo C	PROCESO EXPERIMENTAL
Anexo D	ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICO DEL SUELO
Anexo E	GENERACIÓN DE VOLTAJE AL TERCER PULSO
Anexo F	GRÁFICOS DE DISTRIBUCIÓN NORMAL PARA LOS PERIODOS DE PRUEBA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
INER	Instituto Nacional de Eficiencia Energética y Energías Renovables.
GEAA	Grupo de Energías Alternativas y Ambiente
MIP	Membrana de Intercambio de Protones
CCM1	Celda de Combustible Microbiano 1 de Armas y Ramírez 2014
CCMC	Celda de Combustible microbiano Control
CCMV	Celda de Combustible Microbiano 1 bajo tratamiento de electricidad
CCMVR	Celda de Combustible Microbiano 1 bajo tratamiento de electricidad réplica
CCMG	Celda de Combustible Microbiano 2 bajo el tratamiento de glucosa
CCMGR	Celda de Combustible Microbiano 2 bajo el tratamiento de glucosa réplica
CCMS	Celda de Combustible Microbiano cámara Simple
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ANE	Agar Nutritivo Enriquecido con Glucosa
PDA	Potato Dextrose Agar
°C	Grados Centígrados
h	Horas
M.O	Materia Orgánica
g	Gramos
kg	Kilogramos
m	Metro
cm	Centímetro
%	Porcentaje
mL	Mililitros
L	Litro
V	Diferencia de Potencial
Vdc	Voltaje de corriente directa.
I	Intensidad de Corriente
mV	Milivoltios
pH	Potencial de Hidrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
K₂HPO	Difosfato de Potasio
CO₂	Dióxido de carbono

NH₄	Amonio
P	Fósforo
K	Potasio
Ca	Calcio
Mg	Magnesio

RESUMEN

Se evaluaron mecanismos de reactivación en Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) para la producción de bioelectricidad. Se configuraron dos CCMs con su respectiva réplica, en cajas de acrílico con 125 mL de capacidad, el compartimento anódico se alimentó con suelo proveniente de una celda de combustible microbiano inactiva procedente del trabajo de titulación (Armas & Ramirez, 2014, pp. 1-105), se ubicaron los demás implementos y se colocó el electrodo cátodo para formar el circuito de la CCM. Se probaron dos mecanismos de reactivación: añadiendo sustrato (glucosa) a las cuatro CCMs y a dos de ellas bajo estimulación eléctrica directa, durante siete periodos, con intervalos de descanso entre cada periodo, los estímulos se aplicaron con pulsos de 2 milisegundos, para voltajes de: 0,3 V; 0,6 V; 0,9 V, se repitió cada estímulo dos veces y finalmente por una única vez 2 V, sobre las mismas celdas. Para monitorear el voltaje generado (V) se instaló sensores a cada CCM conectado a un sistema de adquisición de datos, durante 43 días de monitoreo. Adicionalmente se acondicionó una celda control la cual fue alimentada únicamente con agua destilada monitoreada con el multímetro. Al final de los experimentos se comparó la generación promedio de voltaje en cada periodo de prueba, se obtuvo una generación promedio de 0,13 V en las celdas alimentadas únicamente con glucosa para el periodo VI (segundo estímulo de 0,9 V), pero se observa además que a medida que aumentan los pulsos de corriente las celdas bajo este mecanismo reaccionan de manera creciente en la generación de bioenergía. El análisis microbiológico determinó crecimiento en 5 órdenes de magnitud al finalizar los tratamientos. Para complementar estos resultados se recomienda experimentar con voltajes más altos con el objetivo de analizar la reacción de las CCMs y la generación de bioelectricidad.

PALABRAS CLAVES: <BIOTECNOLOGÍA>, <INGENIERÍA AMBIENTAL>, <MECANISMOS DE REACTIVACIÓN>, <CELDS DE COMBUSTIBLE MICROBIANO (CCMs)>, <BIOELECTRICIDAD>, <BIOENERGÍA>.

SUMMARY

Reactivation mechanisms were evaluated in Microbial Fuel Cells (CCMs) for the production of bioelectricity. Were set up two CCMs in acrylic boxes with 125 mL capacity, the anode behavior was fed with soil from an inactive microbial fuel cell from the titration work (Armas & Ramirez, 2014, pp. 1- 105), the other implements were placed and the cathode electrode was placed to form the CCM circuit. Two substrate mechanisms (glucose) were tested in the four CCMs and two of them under direct electrical stimulation, during seven periods, with rest intervals between each period, the stimuli were applied with pulses of 2 thousand seconds, for voltages of: 0.3 V; 0.6 V; 0.9 V, each stimulus was repeated twice and finally by a single time 2 V, on the same cells. To monitor the generated voltage (V) sensors were installed to each CCM connected to a data acquisition system, during 43 days of monitoring. Additionally a control cell was conditioned which was fed only with distilled water monitored with the multimeter. At the end of the experiments, the average voltage generation of each test period was compared, an average generation of 0.13 V was obtained in cells fed only glucose for period VI (second stimulus of 0.9 V), but It is also observed that as the current pulses increase the cells under this mechanism react more and more in the generation of bioenergy. The microbiological analysis determined growth in 5 orders of magnitude at the end of the treatments. To complement these results it is recommended to experiment with higher voltages with the aim of analyzing the reaction of CCMs and the generation of bioelectricity.

KEYWORDS: <BIOTECHNOLOGY>, <ENVIRONMENTAL ENGINEERING>, <REACTIVATING MECHANISMS>, <MICROBIAL FUEL CELLS (CCMs)>, <BIOELECTRICITY>, <BIOENERGY>.

INTRODUCCIÓN

Las Celdas de Combustible Microbiano (CCMs) son dispositivos, que han estado en la mira de la comunidad científica por la capacidad metabólica de los microorganismos electrogénicos que degradan los sustratos, liberando electrones y protones generando así energía eléctrica. El principio bajo el cual funciona una CCM sea de cámara simple o doble, es la conexión mediante un circuito externo que se forma desde el ánodo hasta el cátodo, para mediciones de voltaje y corriente junto a una resistencia externa fija. Varias aplicaciones de las CCMs han sido ampliamente exploradas entre estas: el tratamiento de residuos orgánicos (El-Chakhtoura, 2014, pp. 24-31), tratamiento de aguas residuales (domesticas e industriales) (Barrera Díaz, Roa-Morales, Ureña Núñez, & Linares, 2008, pp. 1-15), reducción de metales pesados como el Cr^{+6} y U^{+6} (Lovley, 2006, pp. 27-35). Así los estudios sobre las celdas de combustible microbiano han sido amplios en técnicas de electrorremediación a nivel de laboratorio con un campo eléctrico de 175 V m^{-1} para descontaminar suelos con metales pesados según (Vázquez, Hernández, Lemus, & Arbelo, 2004, pp. 387-398).

En la actualidad nos enfrentamos a problemas críticos con el uso de combustibles fósiles, frente a la necesidad de electricidad se genera el interés de buscar nuevas iniciativas donde se haga uso de nuevas tecnologías biológicas y biorremediación de medios contaminados. Se conoce que en Ecuador se han realizado iniciativas para generar electricidad a partir de las bacterias electrogénicas mediante el uso de CCM, las mismas que después de un cierto período de uso se han desechado o al menos no se han vuelto a evaluar mecanismos que permitan reactivar las celdas; por lo que esta investigación nace con la inquietud de conocer y evaluar mecanismos que permitan la reactivación de la CCMs para generar nuevamente bioelectricidad.

Se conoce que no hay estudios suficientes sobre la reactivación de celdas de combustible microbiano, es por eso que para el desarrollo de este proyecto se ha tomado en cuenta el trabajo de titulación (Armas & Ramirez, 2014, pp. 1-105), se utilizará el material (suelo alimentado con tres matrices orgánicas, peso/peso 50:50) derivado de la CCM1 de 12 L de capacidad, con una generación máximo promedio de bioelectricidad de 0.11 V. Las mencionadas celdas fueron almacenadas bajo cubierta en los mismos recipientes durante 2 años, permaneciendo inactivas. Así pues para este trabajo se prepararán cuatro CCMs de 125 ml de capacidad, a cada una se someterá a mecanismos de reactivación: dos celdas de combustible microbiano bajo el estímulo de glucosa más voltaje (CCMV) y dos celdas de combustible microbiano con glucosa (CCMG), para comparar la generación de electricidad entre si y determinar el mecanismo más óptimo de

reactivación de una CCM. En cuanto a generación de bioelectricidad para los dos tratamientos hubo diferencia en el segundo suministro del pulso tres (0,9 V) y al suministrar un cuarto pulso (2 V) donde generan los mismos promedios de voltaje para cada caso de tratamiento, además se observa que mientras a medida que se aumenta el pulso de corriente directa las celdas bajo este tratamiento reaccionan de manera positiva y ascendente en la generación de voltaje mientras que las celdas bajo el mecanismo de adición de glucosa se mantienen una tendencia constante.

Identificación del problema

El incremento de la generación de residuos sólidos orgánicos, aguas residuales urbanas e industriales afectan negativamente al ambiente. Además el conocimiento y la aplicación de nuevas técnicas de energía limpia son poco conocidas. La obtención de bioelectricidad mediante celdas de combustible microbiano es una tecnología muy eficiente pero poco desarrollada convencionalmente, además hay pocos trabajos que estudian el ciclo de vida las celdas de combustible microbianos así como no se han analizado completamente los mecanismos para reactivarlas, sea el caso de celdas acuáticas o terrestres. En los estudios realizados con CCMs en la mayoría de los casos una vez que habido producción de bioelectricidad estas se han desechado, el presente proyecto pretende conocer que sucede con las CCMs, ¿que produce su reactivación? ¿El porcentaje de producción será el mismo? ¿Qué mecanismos puedo usar para reactivarlas?, después de un primer uso, en vista de estas interrogantes se propone volverlas a activar mediante dos mecanismos para lo cual se han instalado dos celdas bajo el tratamiento de reactivación con glucosa como sustrato y dos celdas bajo el tratamiento de glucosa más pulsos de Voltaje, esperando comparar dichos tratamientos mediante la generación de bioelectricidad.

Justificación del proyecto

El uso actual de la energía se ha incrementado en los últimos tiempos como consecuencia de la expansión demográfica que poco a poco agota al planeta, sus recursos y desde luego repercute notoriamente en la economía, por esta razón se desarrolla el interés de buscar nuevas formas de obtención de energía eléctrica como es bioelectricidad (energía limpia). Se sabe que en el Ecuador la oferta energética es dependiente de la explotación del petróleo, actualmente representa el 90% de la generación total de energía primaria. La fuente energética para el año 2015 en la

producción de gas natural fue 9.7% y para la energía renovable el 8.5%. (Delgado, 2015, pp. 1-54) por lo que es urgente buscar nuevas alternativas de energía verde. Existen varias iniciativas en Latinoamérica y en el Ecuador en temas de investigación con CCMs, que emplean sustrato orgánico aprovechable por los microorganismos electrogénicos presentes en el suelo (Logroño V., 2014, pp. 1-126). (Armas & Ramirez, 2014, pp. 1-105) estudiaron la influencia de la generación de electricidad usando matrices orgánicas con bacterias electrogénicas mediante celdas de combustible microbiano. La aplicación de estas tecnologías tiene ventajas sobre otras fuentes de energía, convirtiéndose en una tecnología que aporta positivamente a la disminución de la crisis energética, minimizando los problemas ambientales y creando nuevas líneas de investigación.

El Grupo de Energías Alternativas y Ambiente (GEAA) de la ESPOCH tiene por objeto desarrollar líneas de investigación orientadas a atender problemas de actualidad, investigando fuentes de energía renovable y la reutilización de residuos. Lo que se pretende con este estudio técnico es la reactivación de celdas microbianas mediante la evaluación de diversos mecanismos por ejemplo: la adición de un sustrato (glucosa) y estimulación eléctrica, con el objetivo de generar y potenciar la producción de electricidad con el sustrato proveniente de una celda inactiva, lo cual sin duda puede ser aprovechado a futuro para generar energía verde a gran escala y de esta manera contribuir al desarrollo económico y social del país; así como la generación de conocimiento frente a las incógnitas de saber que sucede una vez que las CCMs son usadas y conocer cómo reaccionarán después de aplicar mecanismos de activación.

OBJETIVOS

General

- Evaluar de mecanismos de reactivación en Celdas de combustible Microbiano para la producción de bioelectricidad.

Específicos

- Implementar dos celdas de combustible microbiano con diferentes mecanismos de reactivación siendo la primera la adición de sustrato y la segunda mediante la estimulación eléctrica.
- Comparar la generación de electricidad en cada CCM después del proceso de reactivación.
- Determinar el crecimiento microbiano de cada uno de las celdas después de la generación máxima de bioelectricidad.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes del proyecto

Se han realizado estudios en Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) para la remoción de materia orgánica, biorremediación y la generación de energía eléctrica sostenible. (Revelo, Hurtado, & Ruiz, 2013, pp. 17-28). Por otro lado, en las últimas dos décadas se ha incrementado el interés por desarrollar tecnologías que ayuden a solucionar el problema de los suelos contaminados, mediante la remediación *in situ*, dentro de las cuales se ha propuesto a la electrorremediación por su capacidad de remover contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. (Rosa Perez & Teutli, Leon, 2007, pp. 129-138). Actualmente existen pocos estudios sobre la reactivación de celdas de combustible microbiano, sin embargo se han aplicado diferentes mecanismos como es añadir electricidad con fines de remediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos y metales pesados tales como: Pb, Cd, As (Vázquez, Hernández, Lemus, & Arbelo, 2004, pp. 387-398), además se han realizado estudios sobre la eficacia de eliminar cobre de suelos contaminados donde se probó diferentes combinaciones de reactivos y la configuración de ánodo y cátodo; se aplicó una diferencia de potencial (voltaje) (1,0 Vdc /cm²). (Jay, Bongay, & Ngo, 2012, pp. 719–724). En México con la ayuda de tecnología alemana se sometió a suelos con hidrocarburos a procesos eléctricos con el objeto de remover componentes orgánicos y movilizar los metales pesados mediante la estimulación bacteriana del medio dando excelentes resultados en la aplicación de técnicas de electrorremediación. (Martinez Gilbón, 2001, pp. 1-135)

En el Centro de investigación de Energías Alternativas de la ESPOCH, se ha evaluado la producción de bioelectricidad microbiana utilizando residuos orgánicos como sustrato, para dos casos de estudio: Andes y Amazonia, en el cual se generó bioelectricidad utilizando suelo de los Andes y de la Amazonía Ecuador, usando celdas de combustible microbiano (Logroño V., 2014, pp. 1-126), y en los últimos años no se han realizado estudios de la estimulación eléctrica de los microorganismos con fines de producción de bioelectricidad así como también no se ha identificado que sucede con los microorganismo que actuaron en las CCM. Con este proyecto se pretende aportar nuevos conocimientos útiles para la reactivación de los microorganismos con fines de generación eléctrica usando el sustrato de una CCM inactiva, utilizada hace dos años. (Armas & Ramirez, 2014, pp. 1-105).

1.2 Marco conceptual

1.2.1 Celdas de combustible microbiano

Las CCMs constituyen una nueva tecnología usada desde hace algunos años con diversos fines: biorremediación de ambientes contaminados, así como también procesos de electrorremediación a nivel de laboratorio obteniendo muy buenos resultados en la remoción de contaminantes en suelos y aguas residuales (Vázquez, Hernández, Lemus, & Arbelo, 2004, pp. 387-398). Durante los últimos años estas nuevas fuentes de energía se han usado en su mayoría a nivel de laboratorios donde una vez usadas son desechadas sin embargo se plantea la interrogante de conocer si es posible reactivarlas usando mecanismos que activen el metabolismo de la población microbiana existente.

Generalmente el funcionamiento normal de una CCM depende de la acción metabólica de las comunidades microbianas dentro de la cámara del ánodo donde se dan reacciones de oxidación de material orgánico e inorgánico (Logan & Regan, 2006, pp. 512-518). Existen diferentes tipos de diseños de una CCM, por ejemplo la de cámara doble donde los sistemas están separados en diferentes compartimientos (Ver Ilustración 1), a través una membrana semipermeable conocido como membrana de intercambio protónico. En celdas de combustible microbiana de cámara simple (CCMS) se incluye la cámara catódica en la parte superior y la cámara anódica en la parte inferior separadas a una distancia por la membrana intercambiadora de protones (MIP).

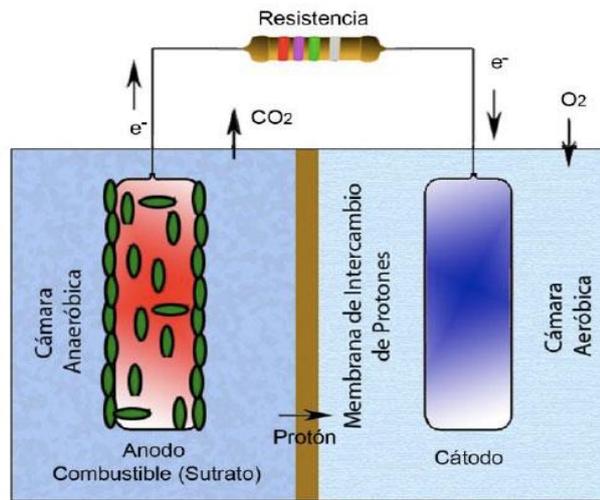


Gráfico 1-1: Esquema de una CCM de cámara simple

Fuente: (Du, Li, & Gu, 2007)

En el campo de la biorremediación ambiental las CCMs pueden ser diseñadas según los requerimientos técnicos ya que son fáciles de utilizar e instalar, usándose en procesos de remediación ambiental (aguas y suelos contaminados) (Du, Li, & Gu, 2007, pp. 464-482).

Compartimentos de una CCM.

En el compartimento Anódico la glucosa es el principal nutriente para el crecimiento bacteriano y el lugar donde ocurren las reacciones de oxidación, con la generación de dióxido de carbono y la liberación de electrones, que son captados por el electrodo ánodo y transferidos al cátodo utilizando un circuito externo. Las reacciones químicas que ocurren en este compartimiento son anaerobias y en algunos casos anaerobios facultativas. En este mismo compartimiento se generan protones que migran hacia el compartimento catódico mediante la Membrana Intercambiadora de Protones (MIP), al estar expuesta esta cámara catiónica se combina con el aire (oxígeno) originando agua (Li, Sheng, Liu, & Yu, 2011, pp. 244–252). En CCMs la transferencia de electrones dentro de las cámaras utilizan distintas vías para ser conducidos mediante un circuito externo, dándose la formación de agua en el cátodo producto de la combinación de protones con el oxígeno como se ha visto en los trabajos. (Zhou, Yang, Hongyu, Jina, & Gu, 2014, pp. 152-154).

En las CCMs el comportamiento de los electrodos es importante porque se refleja en valores medidos mediante los siguientes parámetros: a) la diferencia de potencial (ΔV), b) la densidad de corriente (A/m^2) y c) la densidad de potencia (W/m^2), expresados en relación al área superficial de los electrodos. Las curvas de polarización cíclicas que permiten

obtener parámetros como el potencial y la intensidad, picos anódicos y catódicos dentro de una CCM; donde hay que tener estabilidad en estos sistemas de acuerdo a su configuración de diseño. (Burgos & Rutely, 2012, pp. 20-25)

1.2.2 Sustratos para una CCM

El uso del sustrato es un factor muy importante a considerar a la hora de reactivar una celda, así como en la generación de bioelectricidad. Existen sustratos desde sustancias químicamente puras (glucosa y acetato) hasta mezclas más compuestas (lodos residuales y residuos orgánicos e inorgánicos) (Revelo, Hurtado, & Ruiz, 2013). La glucosa es un excelente sustrato de fácil acceso y por su ruta fermentable es aprovechable de forma más rápida como se ha visto en varias investigaciones, por las bacterias existentes en el medio. (Pant, Bogaert, Diels, & Vanbroekhoven, 2010, pp. 1533–1543). A continuación, se destacan algunas investigaciones del uso de diferentes concentraciones de sustrato (Ver Tabla 1-1). (Zhou, Yang, Hongyu, Jina, & Gu, 2014, pp. 152-154).

Tabla 1-1: Sustratos utilizados en CCMs

SUSTRATO	TIPO DE CCM	P _{max} (mW/m ²)	REFERENCIA
Glucosa	Cámara doble	283	Rahimnejad et al.
Suero de Queso	Cámara doble	42	Stamatelatou et al.
Desperdicios de Alimentos	Cámara simple	207,2**	Kannaiah and
Con aceite de palma de acetato de efluentes	Cámara doble	622	Jong et al. (2011)
Las aguas residuales Lácteos	Cámara simple	5,7	Ayyaru and
Lixiviados	Cámara simple	20,9	Va'zquez-Larios et
Basura compuesta de alimentos	Cámara simple	107,89	Goud et al. (2011)
Farmacéutica Aguas Residuales	Cámara simple	177,36	Velvizhi and Venkata (2011)
Colorantes Azo	Cámara simple	-	Sun et al. (2011)
Las heces humanas de Aguas Residuales	Cámara doble	70,8	Du et al. (2011)

Las aguas residuales penicilina sintético con glucosa	Cámara simple	101.2*	Wen et al. (2011)
Aguas residuales de papel	Cámara simple	125***	Velasquez et al.
Aguas Residuales Lácteos	Cámara simple	25***	
Aguas Residuales de Cervecería y nanadería	Cámara simple	10***	
Aguas Residuales de destilerías	Cámara simple	245,34	Mohanakrishna et al. (2012)
Los lodos de depuradora	Tubular MFC	73	Yuan et al. (2012)
Efluente del clarificador primario	Cámara simple	13	Ishii et al. (2012)
Aguas residuales de destilería de alcohol	Cámara doble	1000	Ha et al. (2012)
Aguas residuales de agricultura	Cámara simple	13	
Aguas residuales Domésticas	Cámara simple	42	-
Aguas residuales de Papel	Cámara simple	8	-
Aguas residuales de alimentos/de leche	Cámara simple	15	-
Vino Descompuesto	Cámara doble	3,82*	Rengasamy and Berchmans (2012)
<p>*Wm⁻³</p> <p>** Calculado a partir de la energía y las densidades de corriente.</p> <p>***mA/m⁻²</p>			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

1.2.3 Microbiología bacteriana

Los microorganismos necesitan diferentes fuentes nutricionales para desarrollar su metabolismo y respiración. La materia orgánica (M.O.) es la fuente de carbono, se obtiene a partir de los diferentes sustratos que contribuyen al desarrollo de reacciones óptimas para activar procesos metabólicos microbianos donde se genere bioelectricidad.

1.2.3.1 Factores de crecimiento microbiano

El desarrollo de los microorganismos depende de las condiciones ambientales ,disponibilidad de nutrientes, consistencia del medio, acidez-alcalinidad, presencia o no oxígeno, grado de

humedad, luz ambiental, pH, temperatura, el medio de cultivo y otros factores que determinan el crecimiento como la esterilización del medio evitando contaminación. (Santambrosio, 2009, pp. 4-8). Así mismo los microorganismos usan minerales (C, N, P y S) como nutrientes, que son componentes celulares indispensables según sus rutas bioquímicas. El tipo y concentración de biomasa se describe como un factor alterante del rendimiento de CCMs. (Falcón, Lozano, & Juárez, 2009). Se sabe que los microorganismos han desarrollado adaptación para crecer en todo tipo de ambientes desde temperaturas altas hasta las más bajas (Kandeler, et al., 1998, pp. 251-262), situación similar al pH. En las CCMs el pH óptimo para el crecimiento de microorganismos es el neutro (pH 7) aunque en algunos casos por la degradación de sustratos hay una tendencia a la acidificación. (Avdeef, Sofen, Bregante, & Raymond, 1978, pp. 5362-5370).

En el crecimiento microbiano existen cuatro fases: a) Fase de latencia, b) Fase exponencial, c) Fase estacionaria y d) Fase de muerte como se muestra en el Grafico 2-1 (curva de crecimiento microbiano). (Stainer , Ingraham, Wheelis, & Painter , 2013, pp. 1-707). Para estimar un conteo microbiano se determinan las unidades formadoras de colonias Ecuación 1. ($UFC\ g\ suelo = N \times FD \times Vt / Vi \times S$), donde N es Numero de colonias, FD es Factor de dilución, Vt es Volumen de dilución (10 mL), Vi es Volumen inoculado en mL y S es Cantidad de suelo utilizado para la siembra.

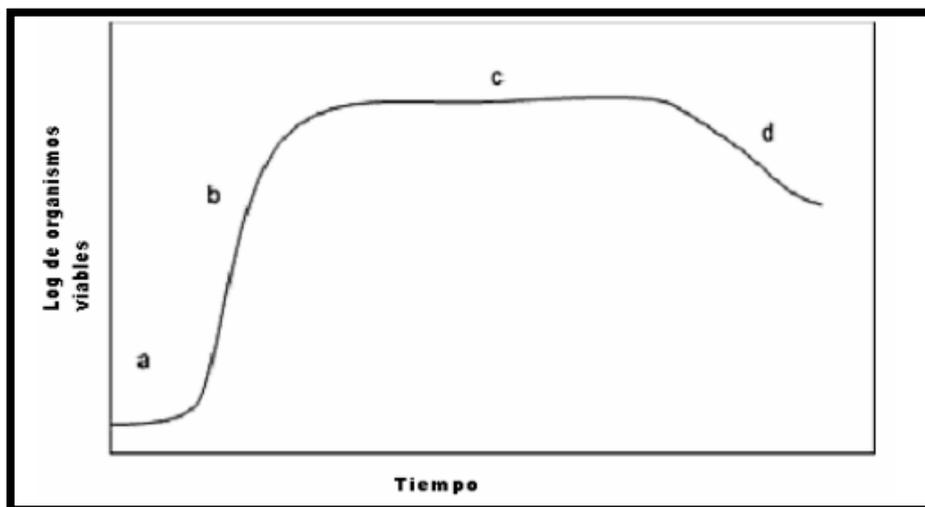


Grafico 2-1: Curva de Crecimiento Microbiano

Fuente: (Stainer , Ingraham, Wheelis, & Painter , 2013)

1.2.3.2 Activación microbiana

Los microorganismos, en el periodo de latencia necesitaran de elementos que activen las células para que se pueda establecer la actividad metabólica. La activación microbiana se realiza con técnicas de incorporar al medio los nutrientes necesarios y además proveer las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo.

Para este proyecto se utilizará la glucosa disuelta en agua destilada como un sustrato óptimo y fácil de degradar por las bacterias que usan la ruta metabólica de la metanogénesis para producir una fermentación y finalmente generar electricidad, este proceso que se da en corto tiempo. Otros sustratos son más complejos y difíciles de degradar por lo que la glucosa es un excelente sustrato como se ha reportado en trabajos que evalúan la eficiencia de estos en CCMs (Pant, Bogaert., Diels, & Vanbroekhoven, 2010, pp. 1533–1543).

1.2.3.3 Electrorremediación

La electrorremediación es un tratamiento electroquímico que involucra la aplicación de corriente directa o un gradiente de potencial bajo de electrodos, dando como resultado el transporte de iones (electroósmosis) y el arrastre mecánico de colides, bacterias y contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Actualmente no se ha dado mucho interés a esta técnica para generar bioenergía, incluso vemos como en investigaciones se usa la corriente directa sobre CCM para mejorar el sistema potenciando el uso de electrodos (Cristiani, P. ; Carvalho, M.L. ; Guerrini, E. ; Daghigho, M. ; Santoro, C. ; Li, B., 2013, pp. 6-13) hasta matar a cierto tipo de bacterias a voltajes propuestos (Costerton , Ellis , Lam , Johnson, & Khoury, 1994, pp. 2803-2809) , este tema es clave ya que a menor voltaje se estimularan a los microorganismos para que comiencen su ruta metabólica. Además varios estudios demuestran que al aplicar 1.2 Voltios la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo lleva al electrolisis del agua reduciendo los protones y por lo tanto afectando negativamente la generación de bioenergía en las CCMs. (Thrash & Coates, 2008, pp. 3921–3931).

En esta investigación se pretende usar el principio de electrorremediación no con el fin de remediar el ambiente, sino conocer el efecto al suministrar corriente directa al sustrato de una celda inactiva para estimular a los microorganismos existentes en la generación de electricidad.

1.2.4 Microorganismos electrogénicos en las CCMS

Los microorganismos electrogénicos son seres capaces de descomponer la materia orgánica emitiendo protones y electrones para producir su propia energía. En CCM la energía producida por los microorganismos es captada por electrodos llamándose bioenergía (Logan & Regan, 2006, pp. 512-518). El crecimiento de estos microorganismos electrogénicos en las CCMS dependerá de reacciones de oxidación y metanogénesis (hidrolisis y fermentación) en el compartimento anódico y en todos los casos este sitio determina la transferencia de electrones, mientras mayor sea el potencial mayor será la transferencia de electrones al compartimento catódico (Velasquez, et al., 2011, pp. 789–798). Particularmente, estudios se enfocan en especies bacterianas electroquímicamente activas, por ejemplo: cepas puras de Proteobacterias del género *Rhodospirillum rubrum* y *Geobacter* las cuales presentan una alta eficiencia al degradar sustratos, dentro de estos tratamientos se utilizó glucosa y acetato como sustrato (Burgos & Rutely, 2012, pp. 20-25). En general las comunidades bacterianas predominantes asociadas a los géneros: *Geobacter*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Enterobacter*, *Dechlorosoma* son electrogénicas por excelencia cumpliendo un gran papel en CCM (Mocali, et al., 2012, pp. 1299–1315). En otros casos la presencia de comunidades microbianas mixtas en CCMS han tenido un desempeño positivo en la generación de electricidad, debido a que están sujetas a las relaciones ecológicas de simbiosis entre las bacterias (Kim, Jung, Regan, & Logan, 2007, pp. 2568–2577).

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Métodos

Para la realización de esta investigación se usaron los materiales, como se muestran en las siguientes tablas 1-2, 2-2 y 3-2.

Tabla 1-2: Materiales Experimentales

ETAPA DEL PROYECTO	MATERIALES	CANTIDAD
Muestreo de suelo contenido en la CCM 1 para análisis físico químico	Guantes látex (par)	2
	Fundas plásticas	2
	Balanza portátil	1
	Alcohol	1 L
Instalación de las CCMs	Tijeras	3
	Fibra de carbono	8
	Papel celofán	4
	Cuchos pequeños	20
	Cuchillo	2
	Cajas de acrílico	5
	Destornilladores	2
	Cuchara para toma de muestra	1
	Cables pequeños	10
	Jeringuillas	7
Muestreo para análisis microbiano	frascos estériles	2
	Guantes de Látex	1

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 2-2: Equipos Utilizados

ETAPA DEL PROYECTO	EQUIPOS	CANTIDAD
Instalación de las CCMs	DAQ (sistema de datos)	1
	Computador	1
	Multímetro	1
	Balanza Analítica	1
Análisis Microbiológico	Cámara de flujo laminar	1
	Autoclave	1
	Balanza analítica	1
	Micropipeta 1000 μ l -100 μ l	2

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 3-2: Materiales de Laboratorio para el análisis microbiológico

MATERIALES	REACTIVOS	SUSTANCIAS	EQUIPOS
Gradillas	Agar nutritivo	Alcohol al 70%	Cámara de flujo laminar
Toalla de Cocina	Glucosa	Agua destilada	Balanza Analítica
Algodón Mechero	PDA		Autoclave
Papel Aluminio			Refrigeradora
Erlenmeyer de 250 ml			
Erlenmeyer de 500 ml			
Frasco para laboratorio tapa rosca 1000 ml.			
Pera de succión			
Tubos pirex con tapa 20ml			
Cajas Petri			
Micropipeteador de 100 μ l			
Micropipeteador de 1000 μ l			
Puntas volumétricas para micropipeteador			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

2.1.1 Muestreo de la celda (CCM 50:50)

Se muestreo el suelo contenido en una celda inactiva CCM1 utilizando un barreno casero de 20 cm de profundidad y un diámetro de 4 cm para obtener dos tipos de muestras: Superficial (1) y la muestra completa (2). Adicionalmente se tomó directamente 800 g de suelo (Ver Fotografía 1-2); que fueron almacenados en fundas plásticas y en frascos para guardarse en refrigeración a 10 °C hasta su utilización. (Ver Anexo C)



Fotografía 1-2: Toma de muestra de Celda inactiva (CCM1)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

2.1.2 Análisis físico químico de suelo de CCM1

El análisis de las propiedades físico-químicas de suelo de la CCM1 se realizó en el laboratorio del Departamento de Suelos Facultad de Recursos Naturales-ESPOCH (Ver anexo D) determinando las características físicas químicas y la cantidad de nutrientes.

2.1.3 Cultivo y conteo microbiano

Se homogenizaron y tamizaron los suelos y se procedió a pesar 10 gramos de la muestra (1) y (2) para ser diluidos en 90 ml de agua destilada estéril (solución madre), se agitaron manualmente durante 30 minutos y se dejaron reposar durante 40 minutos. Posteriormente se

prepararon las diluciones en base diez hasta la (-7).

Se prepararon los medios de cultivo usando agar nutritivo (AN) (23 g/L) enriquecido con glucosa (0.5 g/L) y Potato Dextrose Agar (PDA) (40 g/L). Se llevaron a la autoclave todas las muestras, y se dejaron reposar hasta volverlas a utilizar. En la cámara de flujo laminar se sembraron 100 µl de cada dilución para ponerlos en medios contenidos en cajas Petri. Se distribuyó la siembra de manera uniforme usando una varilla de vidrio. Seguidamente se incubaron las cajas a temperatura Ambiente (17 °C) para finalmente realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24, 48 y 72 horas.

Se siguió el mismo procedimiento al finalizar todos los experimentos para realizar un conteo final, las muestra fueron tomadas de cada CCM, y para este caso se prepararon diluciones en base diez hasta la dilución -10, para ser sembradas, incubadas y determinar las UFC en los tiempos previstos.

2.1.4 Instalación y configuración de las CCM

Se prepararon 5 celdas de combustible en las cajas cuadradas de acrílico de 5 cm de lado (Ver Fotografía 2-2), con 125 ml de capacidad. Dentro de las cajas se incorporaron de manera compacta 175.71 g de suelo proveniente de la celda inactiva (Ver Fotografía 3-2) seguidamente se colocó el ánodo, una porción del mismo suelo de la celda inactiva y a continuación el cátodo (Stoodley, deBeer, & Lappin Scott, 1997, pp. 1876–1879) (ver Fotografía 4), en el Grafico 1-2 se observa a detalle la instalación de una CCM: 1) Material de acrílico, 2) fibras de carbono (electrodos ánodo y cátodo), 3) cauchos, 4) papel celofán; todos estos materiales están sujetos con tornillos en las esquinas.

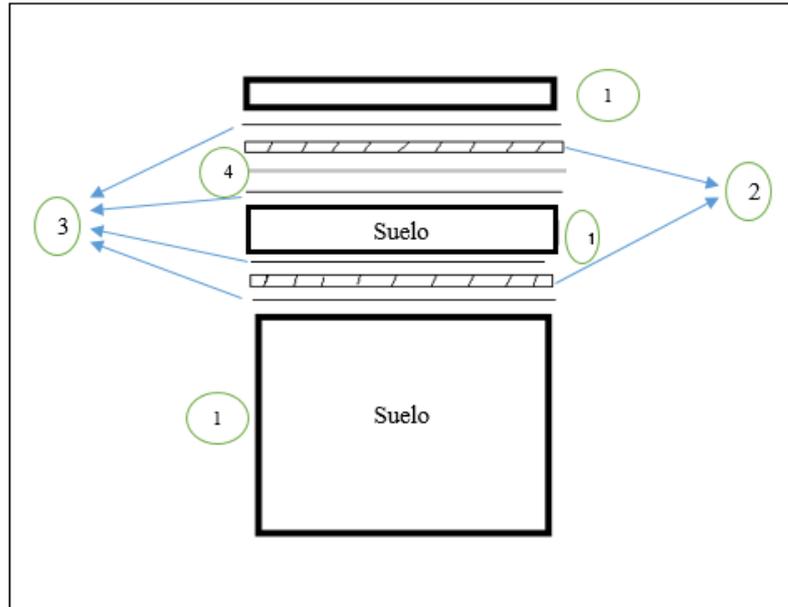


Grafico 1-2: Instalación de una CCM

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



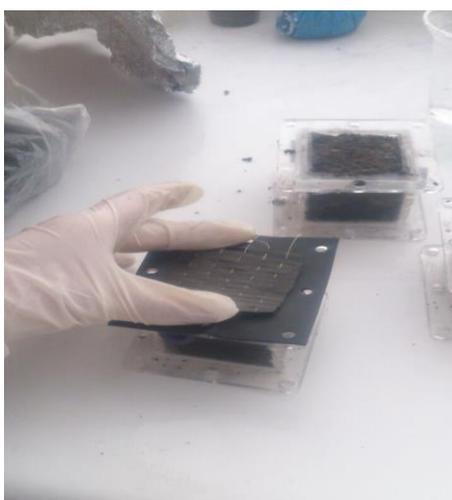
Fotografía 2-2: Cajas de acrílico

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 3-2: Colocación del suelo en las cajas

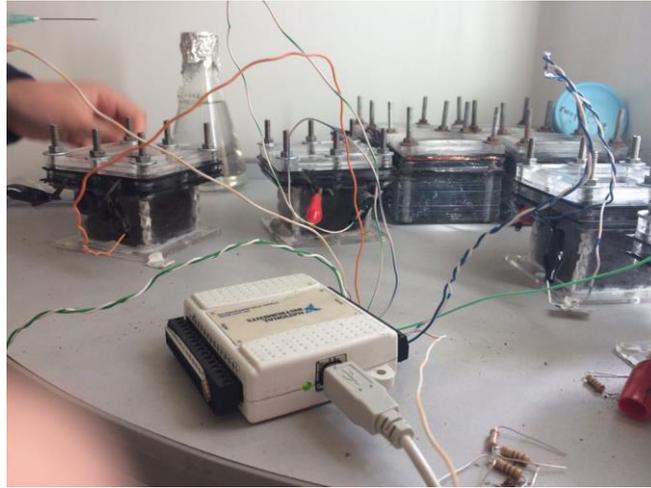
Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 4-2: Ensamblaje de una CCM

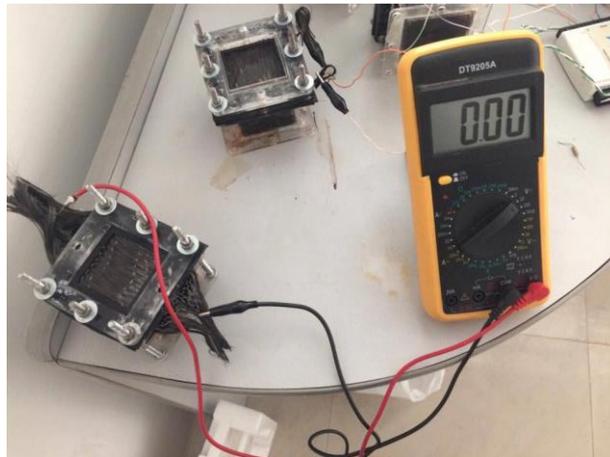
Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Finalmente el ánodo y cátodo de las celdas se conectaron a un sistema de adquisición de datos DAQ USB-6009 que operan bajo el Software LabView en una computadora, la cual permitió realizar un registro de datos de manera continua durante todo el proceso. (Ver Fotografía 5). Mientras la celda de combustible microbiano control (CCMC) fue monitoreada manualmente con el multímetro. (Ver Fotografía 6)



Fotografía 5-2: Instalación de las CCMs con el DAQ

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 6-2: Medición de la CCMC

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

2.1.5 *Mecanismo de reactivación con glucosa*

Después de realizar la instalación y configuración de las celdas se procedió a inyectar el sustrato de glucosa 1 g /L con agua destilada estéril hasta saturar el medio para evitar la presencia de oxígeno en la cámara anódica (Min & Logan , 2004, pp. 5809-5814). (Ver fotografía 7-2). Esta solución se aplicó en las 4 celdas, mientras que la CCMC solo fue saturada con agua destilada.

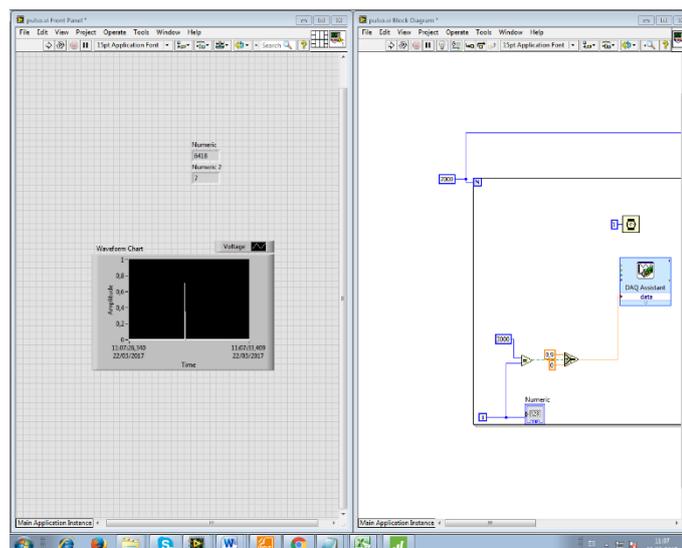


Fotografía 7-2: Alimentación con Glucosa a una CCM

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

2.1.6 Mecanismo de reactivación con inducción de pulsos de corriente directa

Como segundo mecanismo de reactivación, se suministró corriente eléctrica a dos celdas (CCMV, CCMVR). Se aplicaron pulsos con 4 voltajes 0.3 V, 0.6 V, 0.9 V hasta 2 Voltios en un tiempo de 2 milisegundos (tiempo de pulso), se usó el software LabView conjuntamente con el DAQ para introducir manualmente cada pulso (Ver Fotografía 8). El tiempo de experimentación tuvo una duración de 43 días.



FOTOGRAFÍA 8-2: Pulso de Voltaje a las CCM

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

2.2 Diseño técnico del proyecto

El presente proyecto se enfoca en verificar los fenómenos electroquímicos que se manifiestan en el proceso de reactivación de celdas que estuvieron inactivas. Se obtuvieron datos recogidos por el DAQ y fueron registrados en la herramienta de Excel, para luego analizarlos mediante el Software Minitab17 como herramienta estadística, a partir de registros diarios durante un periodo de 43 días monitoreados, mediante sensores automáticos. Se inició con la fase de la estadística previamente con la organización y limpieza de la base de datos: para su estudio se probó que siguen una distribución normal (Ver Anexo E) y posteriormente se graficó la información útil a analizar que se presentaran en los resultados estadísticos (ver gráficos). Se evaluó durante los siete periodos, la hipótesis mediante un análisis univariado (ANOVA) en la cual se comprobó los objetivos planteados al inicio de la investigación, basándonos en pruebas paramétricas disponibles aplicables para esta investigación. Finalmente se aplicó el test de Tukey que ofrece información sobre agrupación de conjuntos de intervalos mediante una comparación múltiple de las medias (promedios).

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de resultados

3.1.1 Caracterización físico química del suelo

Se determinó la cantidad de nutrientes y la composición química del suelo obtenido de la celda inactiva CCM1 (Armas & Ramirez, 2014, pp 1-105), como se muestra en la en la Tabla 1-3 y en la Tabla 2-3 comparamos los resultados la situación inicial de la celda inactiva

Tabla 1-3: Análisis Físico Químico del Suelo

IDENTIFICACIÓN	pH	% M.O	mg		Meq/100g			uS
			NH4	P	K	Ca	Mg	Conducción eléctrica
SUELO (CCM1)	6.28 L. Ac	0.9 B	18.9 B	54.5 A	1.4 A	2.7 B	3.4 M	1989/ No salino
MÉTODO UTILIZADO	MÉTODO OLSEN							

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017 (Resultados Departamento de Suelos)

Tabla 2-3: Comparación con caracterización del Suelo.

PARÁMETROS	CCM1 2014	CCM1 2016
ph	5.5 L. Ac	6.28 L Ac
% Materia Orgánica	3.7 M	0.9 B
NH4 (Amonio)	11.5 B	18.9 B
P (Fósforo)	68.1 A	54.5 A
K (Potasio)	0.24 B	1.4 A
Ca (Calcio)	10.2 M	2.7 B
Mg (Magnesio)	5.7	3.4 M
Conducción Eléctrica	203 μ S / No salino	1989 μ S/No salino

CÓDIGO	
N: Neutro	A: Alto con respecto a la concentración normal del suelo
L. Ac.: Ligeramente ácido	M: Medio con respecto a la concentración normal del suelo
L. Alc: Ligeramente Alcalino	B: Bajo con respecto a la concentración normal del suelo

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Dentro de los parámetros analizados, principalmente se puede observar un cambio en el pH de 5.5 a 6.28 (ligeramente ácido) debido a la matriz orgánica que contenía el suelo, y al transcurrir un proceso de degradación. El estado ácido del sustrato es muy normal en el ciclo de una celda de combustible microbiano así como la conducción eléctrica que es alta en este caso, determina la movilidad de los electrones lo que es positivo en la generación de energía en CCMs. (Pant, Bogaert., Diels, & Vanbroekhoven, 2010, pp. 1533–1543).

3.1.2 Caracterización morfológica y recuento inicial microbiológico

En la evaluación morfológica se presentaron colonias planas y circulares de diversos colores: blancas que fueron visibles a las 48 horas, amarillas, rosadas, rojas, entre otras (Ver anexo A), En el trabajo (Armas & Ramirez, 2014, pp. pp 1-105) se reportaron únicamente gran cantidad de colonias de color blanquecino plano y circular. Esta diferencia de crecimiento, en cuanto a las nuevas morfologías bacterianas encontradas es producto de cambios en el ambiente y por descomposición del sustrato en el tiempo que permanecieron inactivas.

En la Tabla 7-3 se registra el conteo microbiano:

Tabla 3-3: Registro Inicial UFC de CCM inactiva

MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN	No Colonias			UFC (g)		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	PDA	Control	SC	SC	SC	I	I	I
1	PDA	10-2	215	93	>300	2.15x10 ⁶	I	I
1	PDA	10-3	88	137	72	8.8x10 ⁶	2.25x10 ⁷	2.9x10 ⁷
1	PDA	10-4	1	25	27	1x10 ⁶	2.6x10 ⁷	5.3x10 ⁷
1	PDA	10-5	SC	7	3	I	7x10 ⁷	1x10 ⁸
1	PDA	10-6	1	7	1	1x10 ⁸	8x10 ⁸	9x10 ⁸
1	PDA	10-7	SC	1	6	I	1x10 ⁹	7x10 ⁹
1	AN	control	SC	SC	SC	I	I	I
1	AN	10-2	289	172	>300	2.89x10 ⁶	I	I
1	AN	10-3	47	93	55	4.7x10 ⁶	1.4x10 ⁷	1.95x10 ⁷
1	AN	10-4	12	33	16	1.2x10 ⁷	4.5x10 ⁷	6.1x10 ⁷

1	AN	10-5	SC	4	1	I	4.0×10^7	5.0×10^7
1	AN	10-6	SC	2	1	I	2×10^8	3×10^8
1	AN	10-7	16	36	1	1.6×10^{10}	5.2×10^{10}	5.3×10^{10}
2	PDA	Control	SC	SC	SC	I	I	I
2	PDA	10-2	287	>300	>300	2.87×10^6	I	I
2	PDA	10-3	58	119	49	5.8×10^6	1.7×10^7	2.26×10^7
2	PDA	10-4	9	16	20	9×10^6	2.5×10^7	4.5×10^7
2	PDA	10-5	1	1	1	1×10^7	2×10^7	3×10^7
2	PDA	10-6	SC	SC	1	I	I	1×10^8
2	PDA	10-7	SC	SC	1	I	I	1×10^9
2	AN	Control	SC	SC	SC	I	I	I
2	AN	10-2	>300	>300	>300	I	I	I
2	AN	10-3	100	78	64	1×10^7	1.78×10^7	2.42×10^7
2	AN	10-4	6	21	8	6×10^6	2.7×10^7	3.5×10^7
2	AN	10-5	1	3	SC	1×10^7	4×10^7	I
2	AN	10-6	SC	1	1	I	1×10^8	2×10^8
2	AN	10-7	SC	SC	SC	I	I	I

SC: sin crecimiento I: Incontable

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

El crecimiento promedio de la muestra 1 (superficial) y de la muestra 2 (muestra completa) se halla a continuación:

Tabla 4-3: Crecimiento promedio total inicial

MUESTRA	MEDIO	TOTAL (UFC) g
1	PDA	1.6×10^9
1	AN	1.06×10^{10}
2	PDA	2.39×10^8
2	AN	8.6×10^7

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

3.1.3 Recuento final microbiológico

Una vez realizado el proceso de reactivación se cuantificó la población microbiana existente obteniéndose los valores registrados en la tabla 9. (Ver anexo B).

Tabla 5-3: Registro final de UFC para cada CCM

MUESTRA DE LA CELDA	MEDIO	DILUCIÓN	No	UFC (ml)	UFC (g)
			Colonias		
			72 h	72 h	72 h
CCM(C)	AN	10 ⁻¹⁰	4	4x10 ¹¹	4x10 ¹²
CCM(C)	PDA	10 ⁻¹⁰	1	1x10 ¹¹	1x10 ¹²
CCM(V)	AN	10 ⁻¹⁰	5	5x10 ¹¹	5x10 ¹²
CCM(V)	PDA	10 ⁻¹⁰	SC	NC	NC
CCM(VR)	AN	10 ⁻¹⁰	27	2.7x10 ¹²	2.7x10 ¹³
CCM(VR)	PDA	10 ⁻¹⁰	1	1x10 ¹¹	1x10 ¹²
CCM(G)	AN	10 ⁻¹⁰	>300	NC	NC
CCM(G)	PDA	10 ⁻¹⁰	4	4x10 ¹¹	4x10 ¹²
CCM(GR)	AN	10 ⁻¹⁰	7	7x10 ¹¹	7x10 ¹²
CCM(GR)	PDA	10 ⁻¹⁰	3	3x10 ¹¹	3x10 ¹²

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 6-3: Crecimiento promedio total final

MUESTRA	MEDIO	TOTAL UFC (g)
CCMC	AN	4x10 ¹²
CCMC	PDA	1x10 ¹²
CCMV & CCMVR	AN	3.85x10 ¹²
CCMV & CCMVR	PDA	1x10 ¹²
CCMG & CCMGR	AN	7x10 ¹²
CCMG & CCMGR	PDA	3.5x10 ¹²

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

La población de microorganismos cuantificados al finalizar los procesos de reactivación ha aumentado en cinco órdenes de magnitud.

3.1.4 Producción de bioelectricidad

3.1.4.1 Registro de voltaje

En la tabla 11 se muestra el voltaje promedio en Voltios (V) para cada tratamiento:

Tabla 7-3: Registro Promedio de voltaje para cada periodo de prueba (Voltios)

PERIODO	CCMC	CCMV	CCMVR	CCMG	CCMGR
I	0,0000	0,0234	0,0242	0,0201	0,0250
II	0,0000	0,0139	0,0386	0,0114	0,0527
III	0,0000	0,0388	0,0543	0,0260	0,0811
IV	0,0000	0,0245	0,0186	0,0310	0,0414
V	0,0000	0,0443	0,0384	0,0834	0,0930
VI	0,0000	0,0820	0,0831	0,137	0,132
VII	0,0000	0,121	0,112	0,0819	0,0788

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

A continuación se presentan gráficos de generación de voltaje para CCM, después de cada tratamiento:

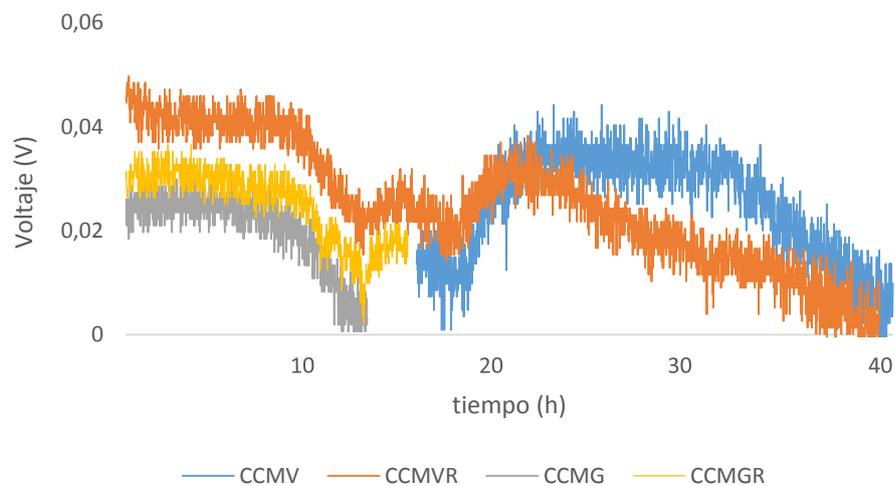


Gráfico 1-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo I

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En la gráfica 1-3, se observan las curvas de generación de voltaje para cada CCM, se presentan curvas inestables, donde apenas se agrega el tratamiento empiezan a generar energía como es el caso de la CCMG, CCMGR, CCMVR, esta última celda genera un valor máximo de 0.4 V a diferencia de las otras y se mantiene estable durante 40 horas. En la CCMV la generación de electricidad ocurre a las 20 horas después del estímulo para generar de manera constante el mismo voltaje que la anterior y decaer en 20 horas de producción.

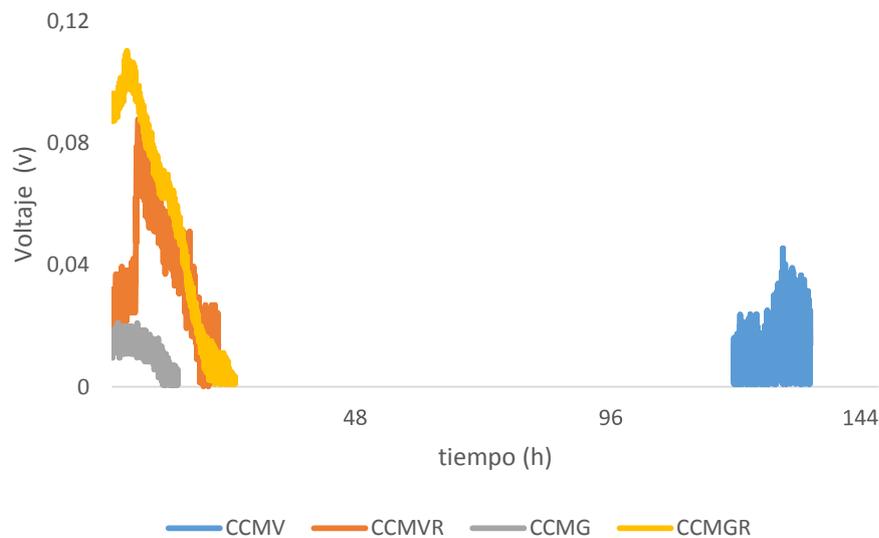


Gráfico 2-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo II

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Se realizó un nuevo experimento con 0.3 V sobre las mismas celdas y en la Gráfica 2-3 se observan curvas de generación de electricidad con un ciclo de vida de 24 horas para las CCMVR y CCMGR. La CCMV y la CCMG alcanzaron un voltaje mínimo de generación en tiempos diferentes, estos voltajes mínimos se debe a que en las primeras semanas las CCM se adaptan a los sustratos y hay decaimientos constantes en la producción de voltaje, e incluso la generación del mismo en muchos casos son productos del ruido del DAQ. (Du, Li, & Gu, 2007, pp. 464-482).

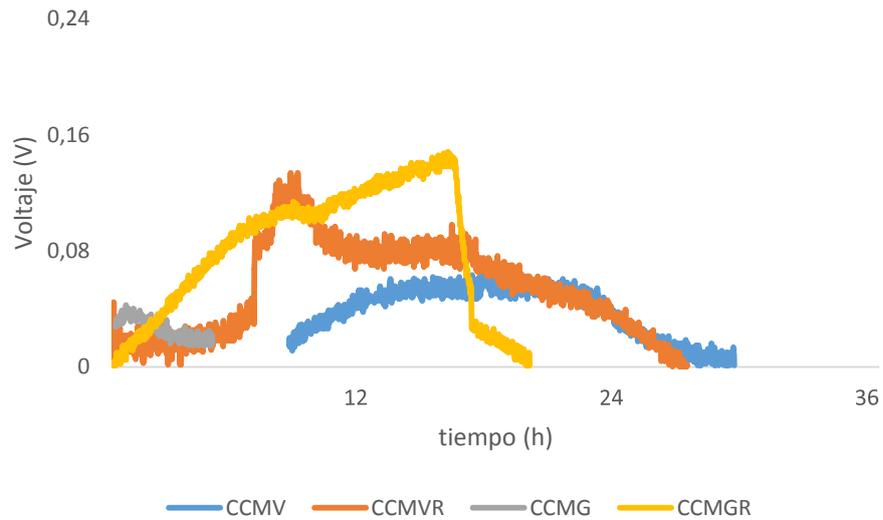


Gráfico 3-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo III

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Se sometieron a un pulso de 0.6 V después de los anteriores, sobre las mismas celdas, se observa en la Gráfica 3-3, curvas de producción inestables pero con una generación continua de 12 horas. Para este tratamiento la CCMG se comportó de la manera similar al periodo anterior.

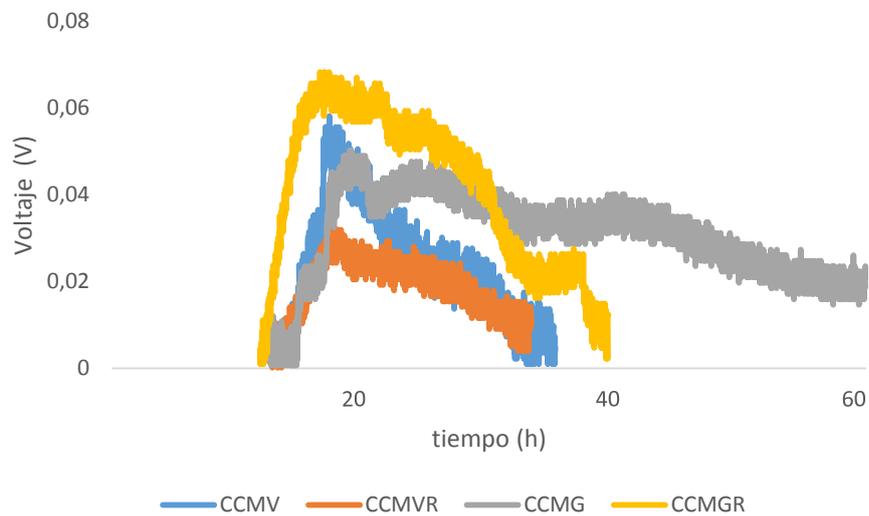


Gráfico 4-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo IV

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Se suministró un pulso de 0.6 V sobre las mismas celdas que corresponden al tratamiento con voltaje, en la Gráfica 4-3, se observa curvas de producción de electricidad a las 18 horas después de añadir los tratamientos, las celdas presentan una actividad eléctrica continua de más de 20

horas y para la mayoría de los casos una generación por encima de 0,04 V.

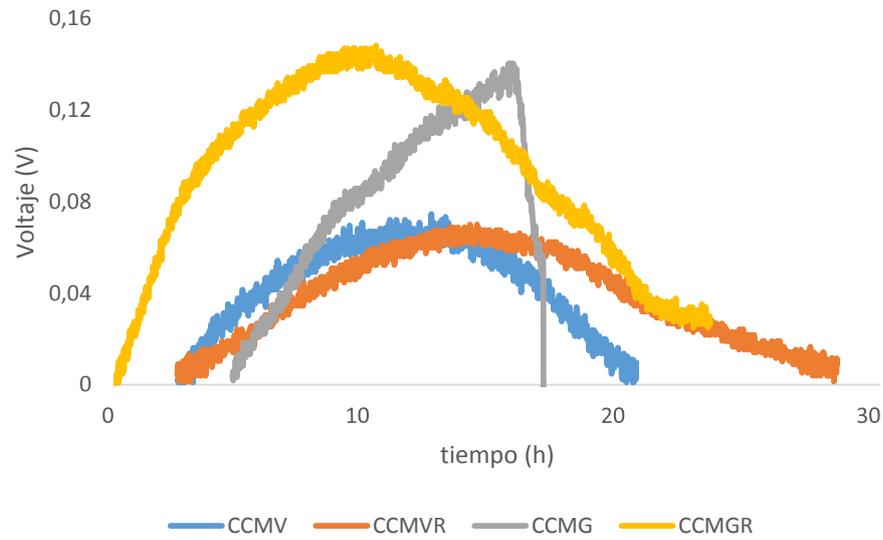


Gráfico 5-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo V

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En este quinto periodo de tratamiento como se muestran en el Gráfico 5-3, se volvieron a saturar las celdas con glucosa y un pulso de 0.9 V sobre las mismas celdas. Se obtuvieron curvas de generación estables en diferentes tiempos de generación de electricidad. Las celdas bajo el tratamiento con glucosa (curva amarilla y ploma) son las que generan hasta 0.14 V. Durante este periodo las curvas son estables y tienen más de 20 horas de actividad eléctrica en las celdas.

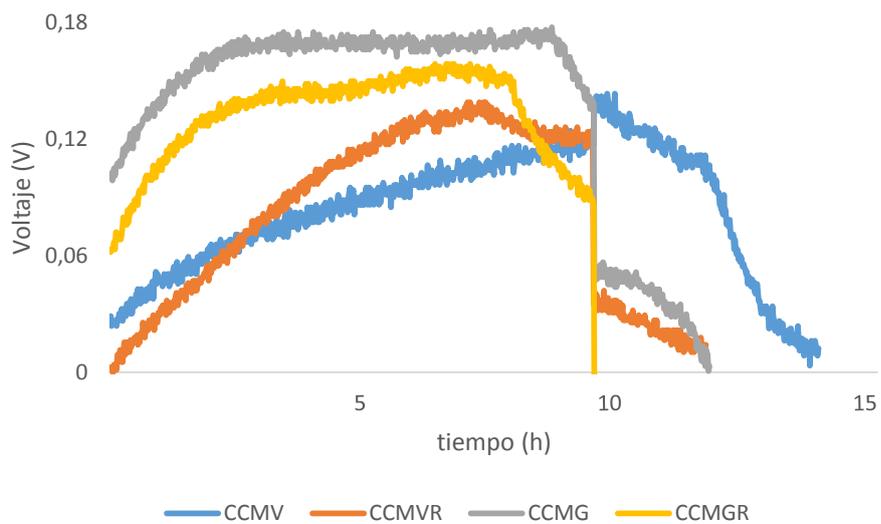


Gráfico 6-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo VI

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En la gráfica 6-3, se obtuvieron curvas de producción de voltaje óptimas. Las (CCMG y CCMGR) presentaron un mismo comportamiento alcanzando los más altos picos de generación de electricidad (de 0.15 V a 0.18 V) siendo más estables al momento de reportar voltajes, a diferencia de las (CCMV y CCMVR) cuya generación es estable en un rango 0.8 V a 0.14 V, menor a las de tratamiento bajo la influencia de solo glucosa. Para este experimento se reporta la generación de voltaje en menos de 15 horas.

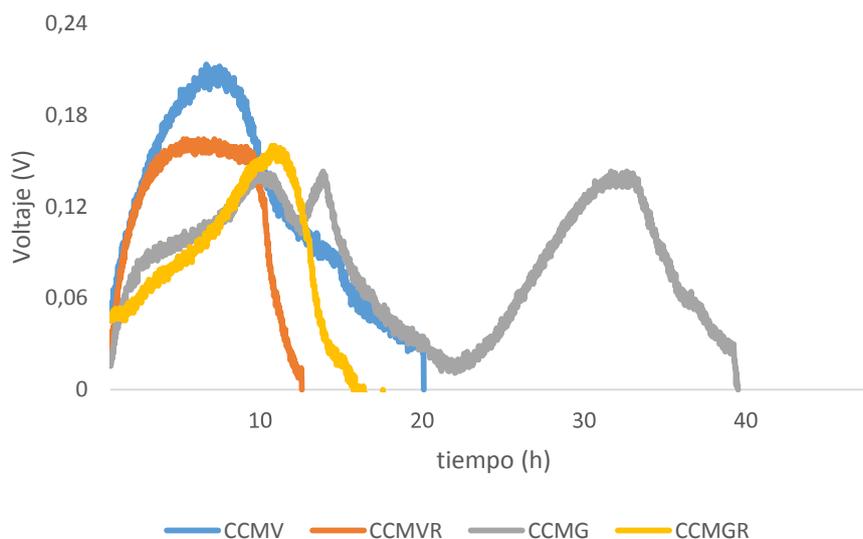


Gráfico 7-3: Producción de voltaje en las CCM, Periodo VII

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Se suministró un nuevo estímulo con 2 Voltios sobre las mismas celdas correspondientes, en la gráfica 7-3, reportaron curvas de voltaje similares para cada tratamiento, se agruparon las celdas que fueron tratadas con pulsos por la generación de voltaje de manera similar y estable, en un rango de 0.14 V a 0.22 V, mientras que para las CCMG y CCMGR se observa una curva similar en la producción de voltaje para luego decaer después de un largo periodo de generación hasta 40 horas.

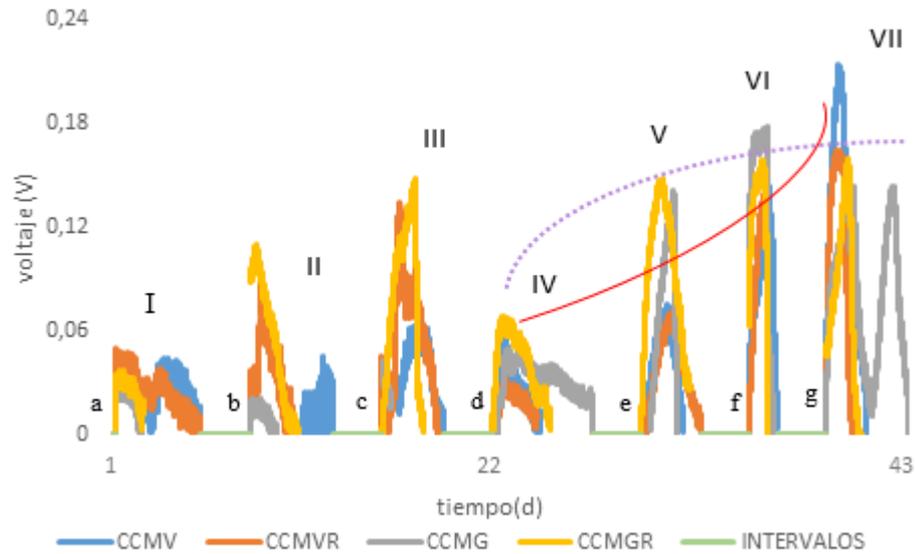


Gráfico 8-3. Producción de voltaje en las CCM, durante todos los tratamientos

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el gráfico 8-3, (no a escala para el eje del tiempo); se observa la generación de voltaje en cada periodo de tratamiento (I, II, III, IV, V, VI, VII), después de cada intervalo de descanso (a) 3 días, (b, c, d) 8 días, (e) 6 días, (f, g) 5 días, durante todo el proceso de reactivación en las CCMs en 43 días de monitoreo continuo. Durante el día 1 al 22 se observan curvas de generación de voltaje inestables para las Celdas con el tratamiento de glucosa y las celdas con pulsos eléctricos, y con promedios de generación similares para los dos casos. A partir del día 23 al 43 ocurren los cuatro periodos donde las celdas bajo el tratamiento de glucosa (CCMG y CCMGR) se visualiza curvas ascendentes, pero se mantienen aproximadamente estables durante los últimos tratamientos formando una curva de estabilidad color púrpura, a diferencia de las celdas bajo el suministro de glucosa más pulsos de voltajes (CCMV y CCMVR) que gráficamente se observa que a medida que aumentan los pulso de voltaje, la generación de voltaje es ascendente (curva creciente de color rojo) atendiendo a este comportamiento durante todo el tratamiento desde el día 1 hasta el día 43.

3.1.4.2 Análisis estadístico (ANOVA)

3.1.4.2.1 Análisis ANOVA para el Periodo de Reactivación I

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 8-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación I

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0,0108	0,00362	51,17	0,000
Error	4138	0,293	0,000071		
Total	4141	0,304			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 9-3: Análisis de Medias para el Periodo de reactivación I

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	1576	0,0239	0,0107	(0,0235. 0,0243)
CCMVR	901	0,0242	0,00546	(0,0237. 0,0248)
CCMG	768	0,0201	0,00727	(0,0195. 0,0207)
CCMGR	897	0,0250	0,007057	(0,0243. 0,0254)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 10-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación I

Factor	N	Mean	Grouping
CCMGR	897	0,0250	A
CCMVR	901	0,0242	A
CCMV	1576	0,0239	A
CCMG	768	0,0201	B

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 8 y 9), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P=0,000$, siendo ($P>0.05$); por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre alguna de las medias generados bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 10), un grupo según la comparación de medias de cada uno de los niveles donde las todas celdas (CCMGR, CCMVR, CCMV) pertenecen a un mismo grupo y la CCMG a otro, en conclusión para este periodo I donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia para la producción de bioelectricidad, como se explica en el Grafico 1 donde según el análisis de las curvas de generación de voltaje es igual en la generación promedio de voltaje para cada caso.

3.1.4.2.2 Análisis ANOVA para el Periodo de Reactivación II

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación,

generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 11-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación II

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	1,238	0,413	733,53	0,000
Error	4190	2,358	0,000563		
Total	4193	3,596			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 12-3: Análisis de Medias para el Periodo de reactivación II

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	862	0,0139	0,00920	(0,0123. 0,0154)
CCMVR	1199	0,0386	0,0195	(0,0373. 0,0400)
CCMG	742	0,0114	0,00537	(0,00970. 0,0131)
CCMGR	1391	0,0527	0,0361	(0,0514. 0,0539)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 13-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación II

Factor	N	Mean	Grouping
CCMGR	1391	0,0527	A
CCMVR	1199	0,0386	B
CCMV	862	0,0139	C
CCMG	742	0,0114	C

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 11 y 12), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P= 0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno de las medias generadas bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 13), existe tres grupos según la comparación de medias de cada uno de los niveles tratados, donde CCMGR pertenece al primero, la CCMVR al segundo, las (CCMV y CCMG) pertenecen a un tercero correspondientemente, en conclusión para este periodo

(II) donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia cuanto a la generación promedio de voltaje.

3.1.4.2.3 Análisis ANOVA para el Periodo de Reactivación III

Hipótesis:

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 14-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación III

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	1,361	0,454	442,27	0,000
Error	4323	4,436	0,001026		
Total	4326	5,798			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 15-3. Análisis de Medias para el Periodo de reactivación III

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	1255	0,0388	0,0177	(0,0370. 0,0406)
CCMVR	1621	0,0543	0,0320	(0,0528. 0,0559)
CCMG	274	0,0260	0,00680	(0,0222. 0,0298)
CCMGR	1177	0,0811	0,0449	(0,0793. 0,0830)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 16-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación III

Factor	N	Mean	Grouping
CCMGR	1177	0,0811	A
CCMVR	1621	0,0543	B
CCMV	1255	0,0388	C
CCMG	274	0,0260	D

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 14 y 15), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P=0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno de los datos generados bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 16), existe cuatro grupos según la comparación de medias de cada uno de los niveles tratados, donde las (CCMGR, CCMVR, CCMV, CCMG) pertenecen a grupos diferentes, en conclusión para este periodo III, donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia para la producción promedio de voltaje de bioelectricidad.

3.1.4.2.4 Análisis ANOVA para el Periodo de reactivación IV

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 17-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación IV

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0,415	0,138	857,66	0,000
Error	7005	1,130	0,000161		
Total	7008	1,545			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 18-3: Análisis de Medias para el Periodo de reactivación IV

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	1298	0,0245	0,0136	(0,0238. 0,0252)
CCMVR	1240	0,0186	0,00685	(0,0179. 0,0193)
CCMG	2824	0,0310	0,0100	(0,0305. 0,0314)
CCMGR	1647	0,0414	0,0182	(0,0407. 0,0420)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 19-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación IV

Factor	N	Mean	Grouping
CCMGR	1647	0,0414	A
CCMG	2824	0,0310	B
CCMV	1298	0,0245	C
CCMVR	1240	0,0186	D

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 17 y 18), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P= 0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno de los datos generados bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 19), existe cuatro grupos según la comparación de medias de cada uno de los niveles tratados, donde las (CCMGR, CCMVR, CCMV, CCMG) pertenecen a grupos diferentes como en el periodo IV, en conclusión para este periodo replicado, donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia para la producción promedio de bioelectricidad.

3.1.4.2.5 Análisis ANOVA para el Periodo de reactivación V

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 20-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación V

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	2,879	0,960	1058,75	0,000
Error	4757	4,312	0,000906		
Total	4760	7,191			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 21-3 Análisis de Medias para el Periodo de reactivación V

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	1078	0,0443	0,0197	(0,0425. 0,0461)
CCMVR	1551	0,0384	0,0197	(0,0369. 0,0399)
CCMG	731	0,0833	0,0373	(0,0812. 0,0856)
CCMGR	1401	0,0930	0,0403	(0,0915. 0,0946)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 22-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación V

Factor	N	Mean	Grouping
CCMGR	1401	0,0930	A
CCMG	731	0,0834	B
CCMV	1078	0,0443	C
CCMVR	1551	0,0384	D

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 20 y 21), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P=0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno de los datos generados bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 22), existe cuatro grupos según la comparación de medias de cada uno de los niveles tratados, donde las (CCMGR, CCMVR, CCMV, CCMG) pertenecen a grupos diferentes. En conclusión, donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia para la producción promedio de bioelectricidad.

3.1.4.2.6 Análisis ANOVA para el Periodo de reactivación VI

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 23-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación VI

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	1,972	0,657	413,02	0,000
Error	2800	4,457	0,00159		
Total	2803	6,429			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 24-3: Análisis de Medias para el Periodo de reactivación VI

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	832	0,0831	0,0327	(0,0804. 0,0858)
CCMVR	700	0,0802	0,0448	(0,077. 0,0831)
CCMG	704	0,137	0,0514	(0,134. 0,140)
CCMGR	568	0,132	0,0231	(0,129. 0,135)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 25-3: Test de Tukey para el Periodo de reactivación VI

Factor	N	Mean	Grouping
CCMG	704	0,137	A
CCMGR	568	0,132	A
CCMV	832	0,0831	B
CCMVR	700	0,0802	B

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 23 y 24), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P=0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno las medias generadas bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 25), existe dos grupos según la comparación de medias de cada uno de los niveles tratados, donde las (CCMG, CCMGR) pertenecen al primero y la (CCMVR, CCMV) pertenecen al segundo, en conclusión donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación hay diferencia para la producción promedio de bioelectricidad donde cada grupo: A y B genera un promedio diferente para cada caso, y se observa una mayor producción en las celdas bajo glucosa con una media de 0,13 V.

3.1.4.2.7 Análisis ANOVA para el periodo de reactivación, V

Hipótesis

H_0 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan iguales promedios (medias) durante cada periodo.

H_1 : Las celdas bajo los tratamientos: 1) alimentación con glucosa (CCMG y CCMGR) y 2) glucosa más estimulación bajo corriente directa (CCMV y CCMVR), para su reactivación, generan diferentes promedios (medias) durante cada periodo.

Tabla 26-3: Análisis de Varianza para el Periodo de reactivación VII

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0,2478	0,0826	41,15	0,000
Error	3539	7,104	0,002007		
Total	3542	7,352			

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 27-3: Análisis de Medias para el Periodo de reactivación VII

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CCMV	1161	0,119	0,0583	(0,116. 0,121)
CCMVR	709	0,121	0,0480	(0,118. 0,125)
CCMG	944	0,0819	0,0260	(0,100. 0,106)
CCMGR	729	0,0788	0,0350	(0,0996. 0,106)

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Tabla 28-3. Test de Tukey para el Periodo de reactivación VII

Factor	N	Mean	Grouping
CCMVR	709	0,121	A
CCMV	1161	0,119	A
CCMG	944	0,0819	B
CCMGR	729	0,0788	B

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

En el cuadro de resultados del análisis de varianza con un factor, ANOVA (Ver tabla 26 y 27), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, al 95% de confianza, el valor de probabilidad calculado $P= 0,000$ siendo ($P<0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y hay diferencia entre al menos uno de los datos generados bajo los dos tratamientos para cada CCM.

En el test de Tukey (Ver tabla 28), existe dos grupos según la comparación de medias de cada uno de los CCMGR) niveles tratados, donde las (CCMVR, CCMV) pertenecen al primero y las (CCMG, CCMGR) pertenecen al segundo, en conclusión para este periodo IV donde se han empleado los dos mecanismos de reactivación, las celdas bajo el suministro de glucosa más voltaje (B) son las que generan un voltaje promedio mejor que el grupo B, además de que se observa que a medida de que se aumenta los pulsos voltaje se mejora el rendimiento en la generación de bioelectricidad. Así mismo en la gráfica 8 se observa la curva de generación de voltaje para las las celdas mencionadas y se percibe que presentan una tendencia creciente,

CONCLUSIONES

Se implementó dos CCM con capacidad volumétrica de 125 ml cada una con su réplica, a las cuales se sometieron a diferentes tratamientos de reactivación: con glucosa y suministro de voltaje como estímulo.

Al finalizar los procesos de reactivación en los 43 días de monitoreo continuo, las CCM bajo el tratamiento de glucosa presentan una generación de voltaje constante, llegando a una curva de estabilidad para seguramente después de un tiempo decaer la generación de energía, mientras que en las CMMs bajo la acción de estímulos eléctricos presentan una tendencia creciente donde a medida que se aumentan los pulsos de voltaje, aumenta la generación de energía expresada en Voltios.

En el conteo microbiológico inicial se demostró la existencia de microorganismos antes del tratamiento y una vez aplicados los mecanismos de reactivación al final del experimento, se realizó un conteo microbiológico expresando en UFC donde indica el aumento de población en cinco órdenes de magnitud.

RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas con pulsos de Voltaje más altos para analizar el comportamiento de las celdas bajo este mecanismo de reactivación.
- Utilizar los pulsos eléctricos en celdas separadas con el objeto de analizar el efecto del voltaje en cada CCM.

BIBLIOGRAFÍA

- ARMAS, P., & RAMIREZ, G.** *Generación de electricidad microbiana con diferentes matrices orgánicas mediante celdas de combustibles"* (tesis), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba. 2014. pp. 1-105.
- AVDEEF, A., et al.** "Stability constants for catechol models of enterobactin". *Journal of the America Chemical Society*", vol 100, No. 17 (1978), pp. 5362–5370.
- BARRERA, C., et al.** "Remoción de contaminantes biorefractarios en aguas". *Quivera*, vol 10, No. 01 (2008), pp. 1-15.
- BOROLE, P., et al.** "Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms inflow-through systems". *Biochemical Engineering Journal*, vol 48, No. 1 (2009), pp 71-80.
- BURGOS, C., & RUTELY, C.** (2012). *Evaluación Electroquímica de materiales anódicos y su aplicación en celdas de combustible microbianas*. Mérida- México.: (Tesis) (Ing. Quim). Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química. (2012)
- COSTERTON , J., et al.** "Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria". *Journal of Bacteriology*, vol 38, No. 12 (1994) pp. 2803-2809.
- CRISTIANI, P., et al.** "Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells", *Elsevier- Bioelectro Chemistry*, vol. 92, No. 01 (2013), pp. 6-13.
- DELGADO, D.** *Balance energetico 2015*. Retrieved from Ministerio Cordinar de Sectores Extrategicos: <http://www.sectoresestrategicos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/01/Resumen-Balance-Energe%CC%81tico-20151.pdf>
- DU, Z., LI, H., & GU, T.** "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy". *Biotechnology Advances*, vol.25, No. 5 (2007), pp. 464-482.
- EL-CHAKHTOURA., et al.** "Electricity generation and microbial community structure of air-cathode microbial fuel cells powered with the organic fraction of municipal solid waste

and inoculated with different sedes". *Biomass and Bioenergy*. vol 67, No (01) (2014), pp. 239-289.

JAY, D., BONGAY, R., & NGO, R. (2012). "Electroremediation of Cu- Contaminated Soil". *Environmental Engineering Science*, vol 30, No.12 (2012), pp. 719–724.

JUNG, S., & REGAN, J." Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors". *Microbiology and Biotechnology*, vol 77, No. 2 (2007), pp.120-125.

KANDELER, E., et al. "The response of soil microorganisms and roots to elevated CO₂ and temperature in a terrestrial model ecosystem". *Plant and Soil*, vol 202, No. 2 (1998), pp. 251-262.

KIM, J., JUNG, S., REGAN, J., & LOGAN, B. "Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells". *Bioresource Technology*, vol 98, No. 13 (2007), pp. 2568–2577.

LI, W., et al. "Recent advances in the separators for microbial fuel cells". *Bioresource Technology*, vol 102, No. 1 (2011), pp. 244–252.

LOGAN, B., & REGAN, J. "Electricity-Producing bacterial communities in microbial fuel cells". *Trends in Microbiology*, vol 14, No. 12 (2006), pp. 512-518.

LOGROÑO V., W.N. *Producción de Bioelectricidad Microbiana utilizando residuos orgánicos como sustrato, para dos casos de estudio: Andes- Amazonia, Ecuador.* (tesis), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. (2014) Riobamba, pp. 1-126.

LOVLEY, D. "Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes". *Environmental Microbiology and Current Opinion in Biotechnology* , vol 03, No 01 (2006), pp. 328-332.

VÁZQUEZ M.V., et al. "Integral Analysis of the Process of Electro-Remediacion of andisols Polluted by Heavy Metals". *Portugalia Electrochimica*, vol 22, No 4 (2004), pp. 387-398.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., & PARKER, J. *Brock. Biología de los Microorganismos.* [en línea]. España, Decima ed.,2003. [consulta 22 Marzo 2017]

Disponible en :

<https://drive.google.com/file/d/0B3i4iMpIY5O1VXd4RnN1MUNiclk/view>

MARTINEZ GILBÓN, A. J.. *Electrorremediación de Suelos contaminados con Hidrocarburos*. (tesis), Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, (2001), México, pp. 1-138

MIN, B., & LOGAN, B. "Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell". *Environment Science Technology*, vol 38, No 01 (2004), pp. 5809-5814.

MOCALI, S., et al. "Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer". *Springer*, vol 97, No 3 (2012), pp. 1299–1315.

PANT, D., BOGAERT, G., DIELS, L., & VANBROEKHOVEN, K., "A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production". *Bioresource Technology* [en línea], 101(6), (2010) ,pp. 1533–1543. Disponible en: [doi:http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017](http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017)

REVELO, D. M., HURTADO, N., & RUIZ, J., "Microbial fuel cells (mfcs): a challenge for the removal of organic matter and electricity generation"., *La Serena*, vol 24, No 6 (2013), pp. 17-28.

ROSA PEREZ, D. A., & TEUTLI, LEON, M., "Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en el campo". *Rev. Int. Contam. Ambiente*, vol 23, No 3 (2007), pp. 129-138.

RUBABA, O., et al., "Electricity producing property and bacterial community structure in microbial". *Bioscience and Bioengineering*, vol 116, No 1 (2013), pp. 106-113.

SANTAMBROSIO, E. "Preparación de medios de cultivos", Universidad Tecnológica Nacional Santa fe, *Retrieved*, 4 (18),(2009), Argentina, pp. 4-8, [Consulta: 2017-03-08], Disponible en : <http://www.fccb.unl.edu.ar/media/Institucional/MEMORIA%202010%20FBCB.pdf>

STAINER, R., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., & PAINTER, P. *Microbiología*. [en

linea]. Barcelona: REVERTE S. A, 2013. [Consulta: 20 Marzo, 2017]

Diposnible en :https://books.google.es/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA197&dq=curva+de+crecimiento+microbiano&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj22q7_7prTAhWqiFQKHU8UAnMQ6AEIzAC#v=onepage&q=curva%20de%20crecimiento%20microbiano&f=false

STOODLEY , P., DEBEER, D., & LAPPIN SCOTT, H. "Influence of Electric Fields and pH on Biofilm Structure as Related to the Bioelectric Effect" . *American Society for Microbiology*, vol 4, No 9 (1997)., pp. 1876–1879.

THRASH, J., & COATES, J." Review: Direct and Indirect Electrical Stimulation of Microbial Metabolism". *Environ. Sci. Technol.*, vol 42, No 11 (2008), pp. 3921–3931.

VÁZQUEZ, M., HERNÁNDEZ, F., LEMUS, M., & ARBELO, C. "Integral Analysis of the Process of Electro-Remediation of Andisols Polluted by Heavy Metals", *Port. Electrochim.*, vol 22, No 4 (2004), pp. 387-398.

VELASQUEZ, S., et al. "Evaluation of hydrolysis and fermentation rates in microbial fuel cells". *Springer* , vol 90, No 2 (2011), pp.789–798.

WEBER, K., et.al. "Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms". *Enviromental Microbiology*, vol 8, No 1 (2006), pp. 110-113.

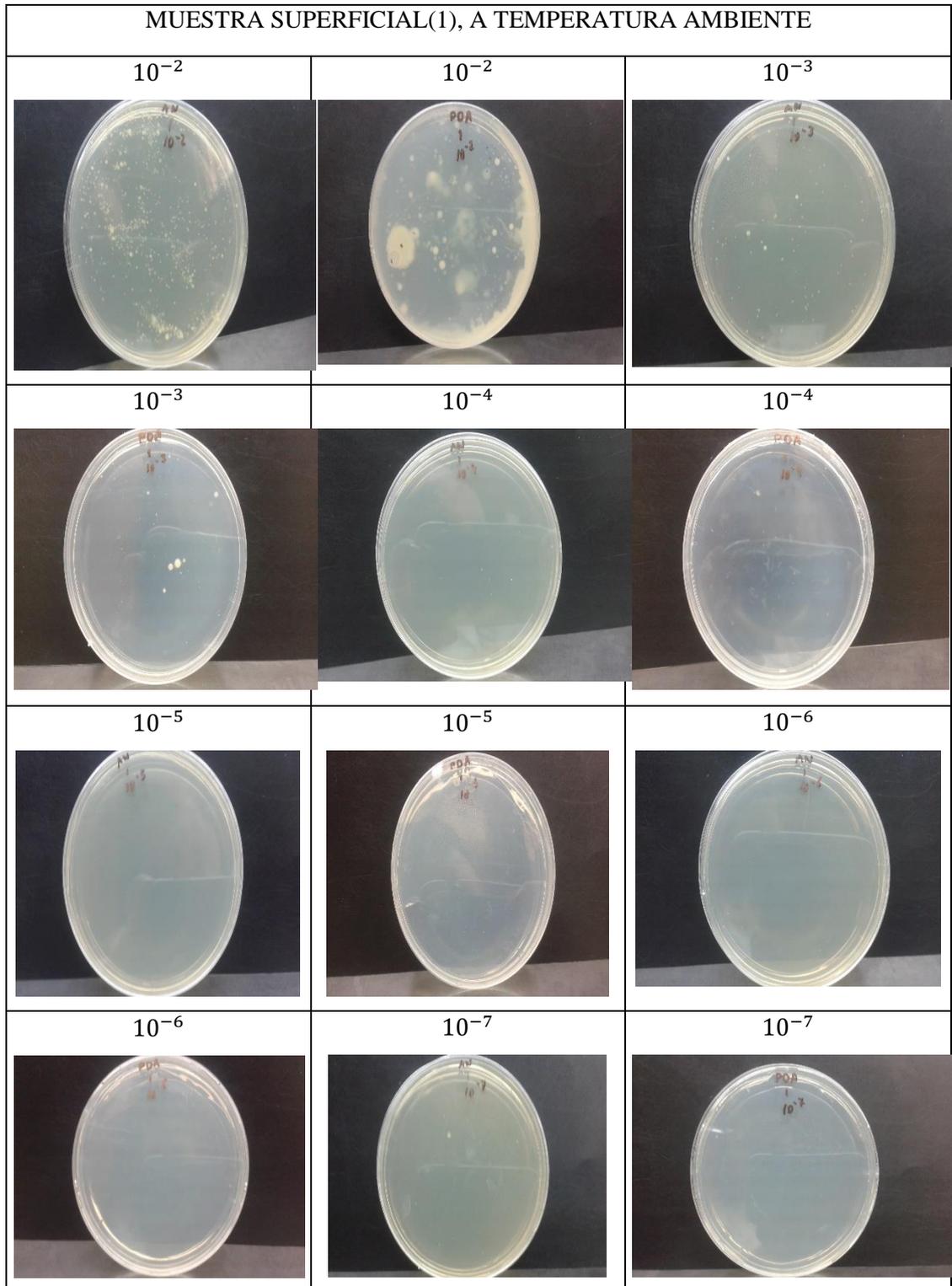
ZHANG, Y., MIN, B., HUANG , L., & ANGELIDAKI, I. " Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell". *Elsevier*, vol 102 (No 2) (2011), pp. 1156-1173.

ZHOU, M., et.al."Bioelectrochemistry of Microbial Fuel Cells and their Potential Applications in Bioenergy". *Elsevier*, Vol 9, No 27 (2014), pp. 152-154.

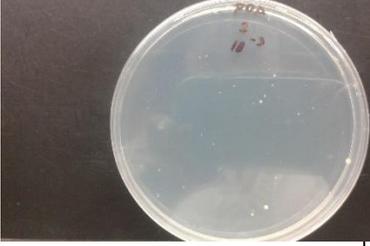
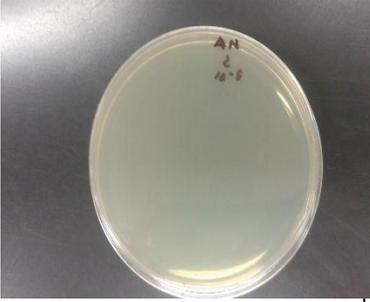
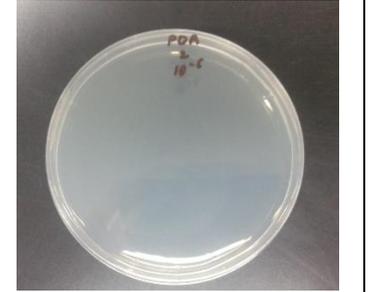
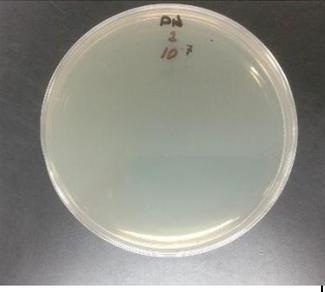
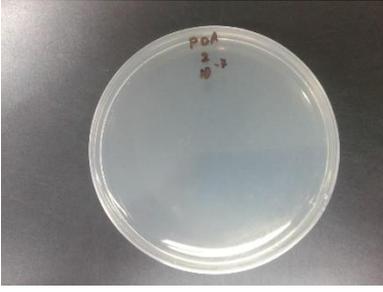
ZHU, N., et.al. " Improved performance of membrane free single chamber air cathode microbial fuel cells with nitric acid and ethylenediamine surface modified activated carbon fiber felt anodes" , *Elsevier*, Vol 102, No 01 (2011), pp 422–426.

ANEXOS

Anexo A. RECuento INICIAL MICROBIOLÓGICO

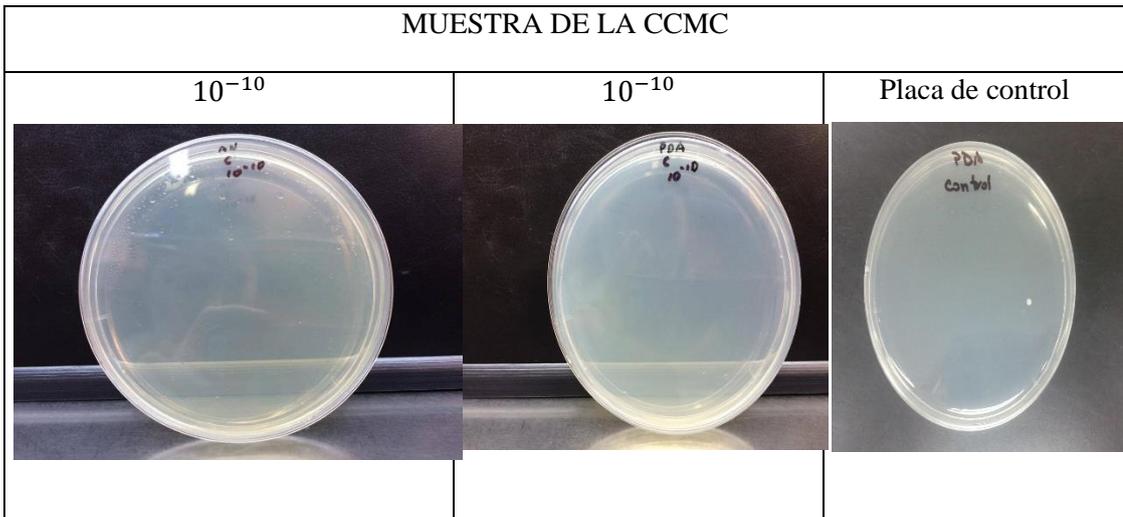


Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

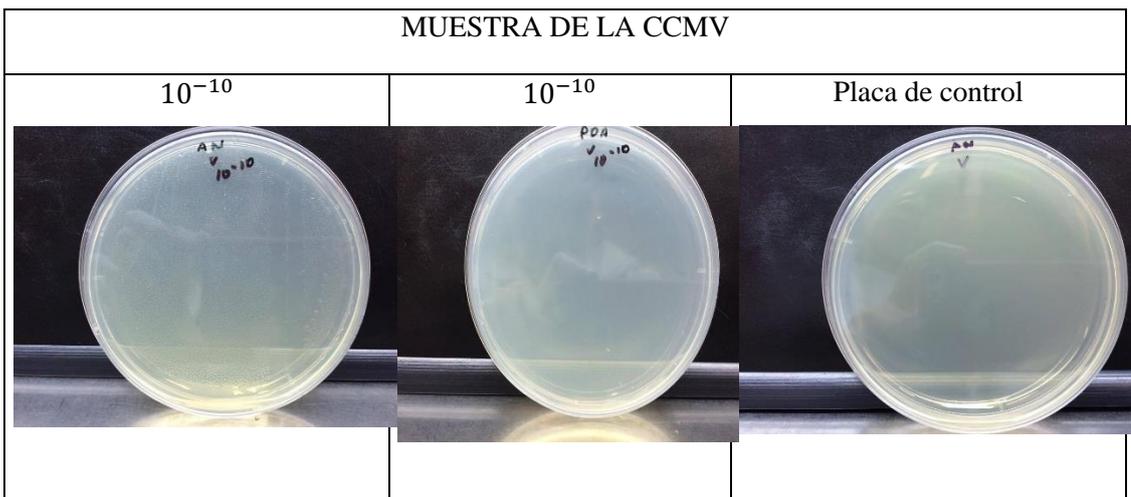
MUESTRA COMPLETA(2), A TEMPERATURA AMBIENTE		
10 ⁻² 	10 ⁻² 	10 ⁻³ 
10 ⁻³ 	10 ⁻⁴ 	10 ⁻⁴ 
10 ⁻⁵ 	10 ⁻⁵ 	10 ⁻⁶ 
10 ⁻⁶ 	10 ⁻⁷ 	10 ⁻⁷ 

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

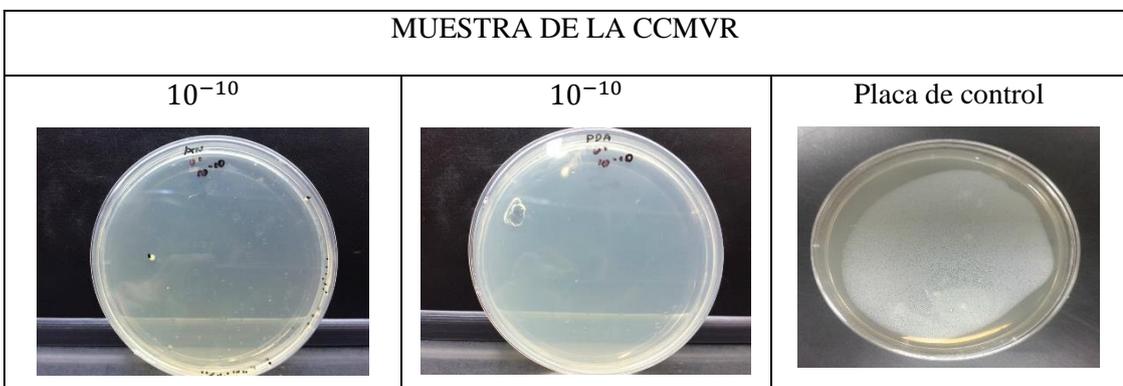
Anexo B. RECUENTO FINAL MICROBIOLÓGICO



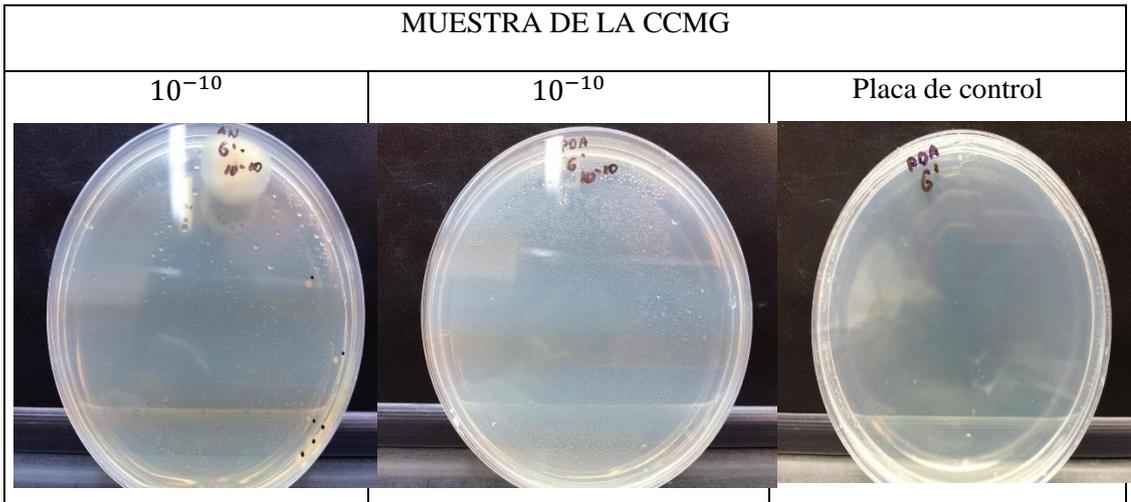
Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



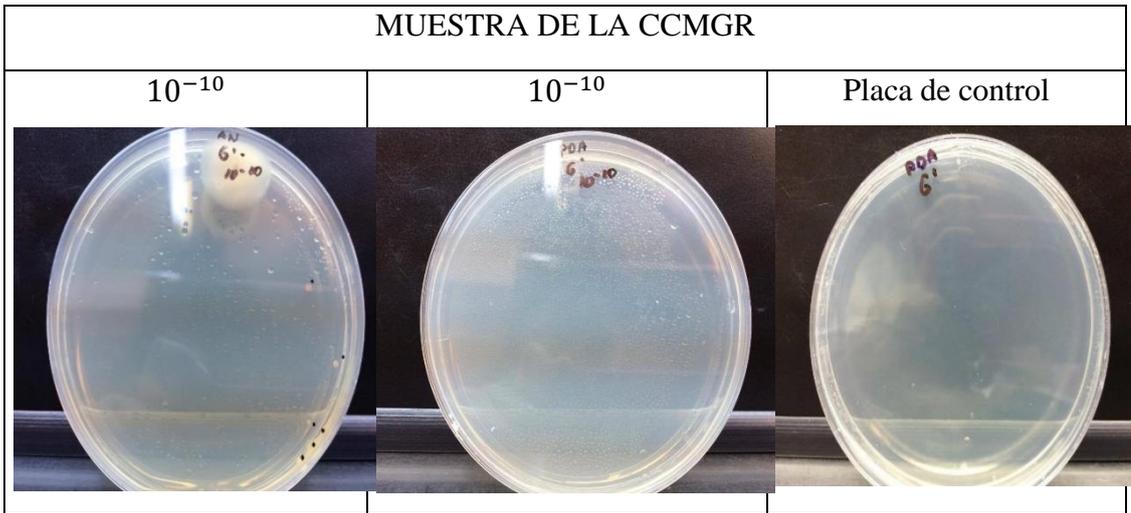
Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Anexo C. PROCESO EXPERIMENTAL



Fotografía 6. Muestreo de la CCM inactiva

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 7. Dilución en serie

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



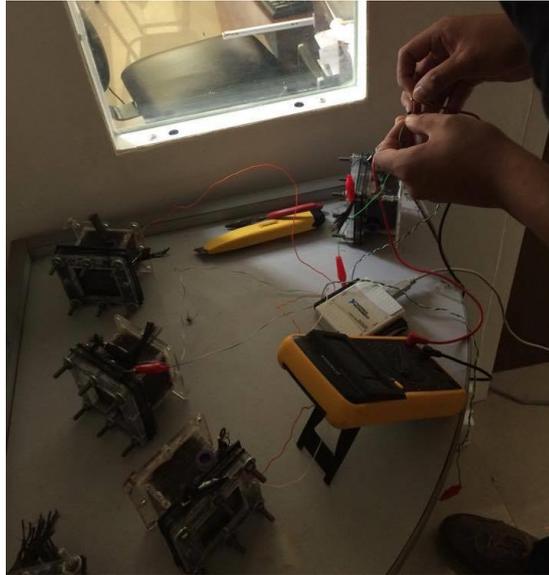
Fotografía 8. Inoculo bacteriano

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



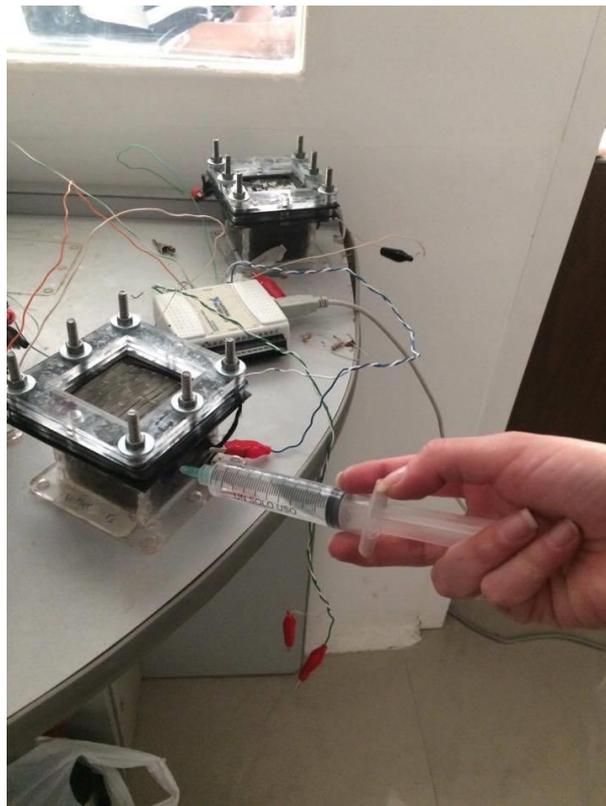
Fotografía 9. Configuración de una CCM

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



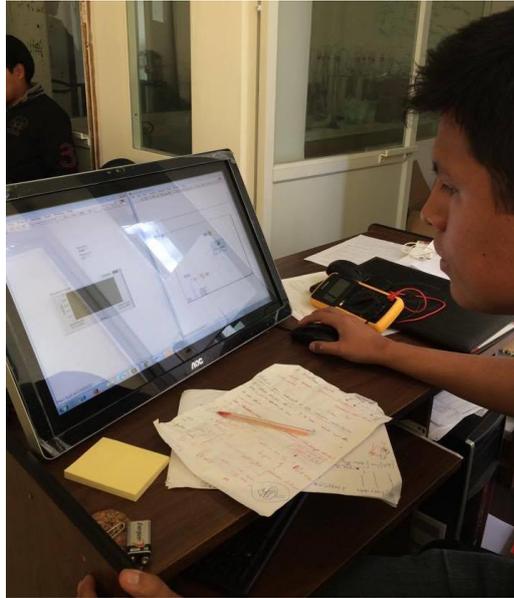
Fotografía 10. Instalación de las CCM

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



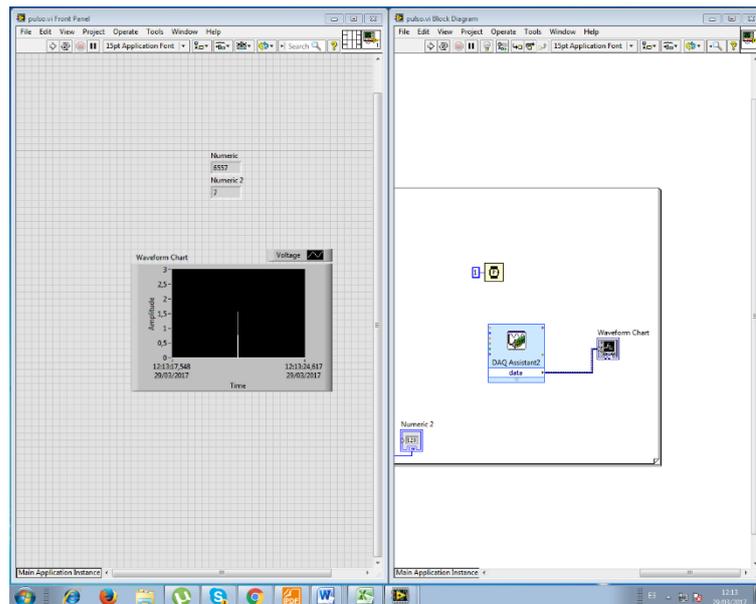
Fotografía 11. Saturación de las CCMs con glucosa y agua destilada

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 12. Pulsos a través del SOFTWARE LabVIEW

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017



Fotografía 13. Recepción de datos en SOFTWARE LabVIEW

Realizado por: Valdivieso Lucely, 2017

Anexo D. ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICO DEL SUELO



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
LABORATORIO DE SUELOS



Nombre del Propietario: Lucely Valdivieso Fecha de ingreso: 15/11/2016
Fecha de salida: 28/11/2016

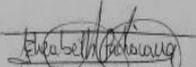
Ubicación: Páramo de Pichán San Isidro Guano Chimborazo
 Nombre de la granja Parroquia Cantón Provincia

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE SUELOS

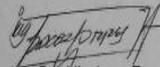
Ident.	pH	uf/cm.		%			Meq/100g		
		C.E	M.O	NH4	P	K	Ca	Mg	
Suelo	6.28 LAc	1989 No salino	0.9 B	18.9 B	54.5 A	1.4 A	2.7 B	3.4 M	

CODIGO	
N: Neutro	A: alto
L.Ac. Ligeramente ácido	M: medio
L. Alc. Ligeramente alcalino	B: bajo





Ing. Elizabeth Pachacama
TECNICO DE LABORATORIO

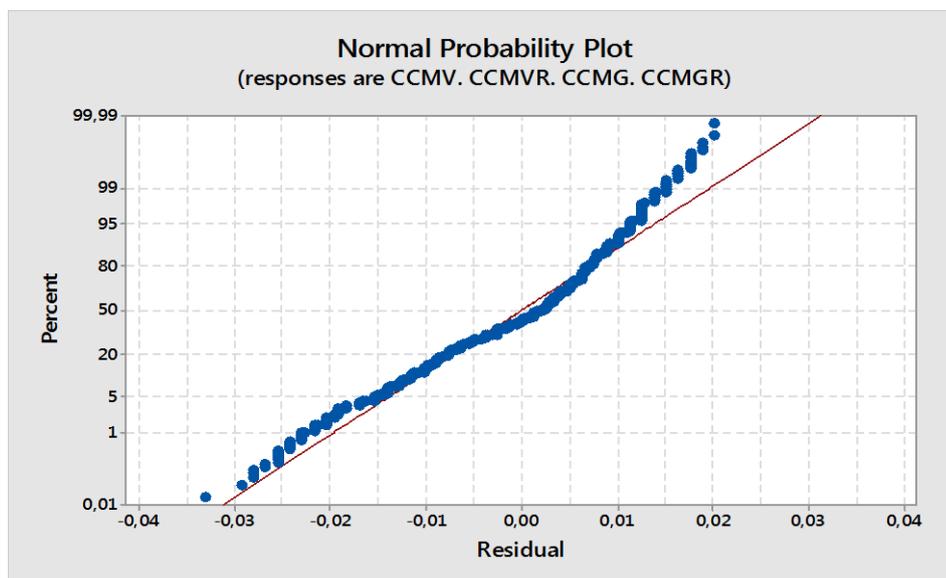


Ing. Franklin Arcos T.
JEFE LAB. SUELOS

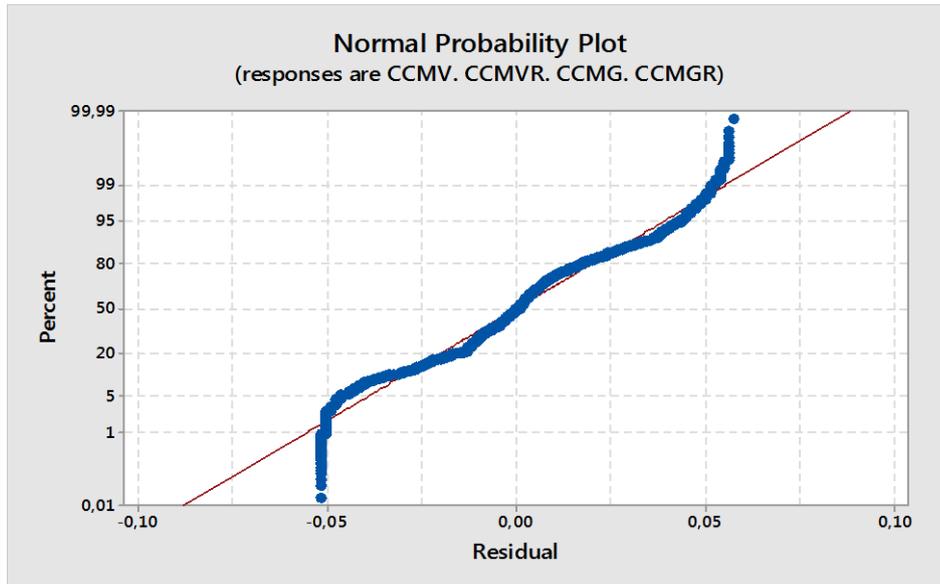
Dirección: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur Km1 1/2, Facultad de Recursos Naturales, Teléfono 2998220 Extensión 418
Apoyando a la producción sana, rentable y amigable con la naturaleza

Anexo E. GRÁFICOS DE DISTRIBUCIÓN NORMAL PARA LOS PERIODOS DE PRUEBA

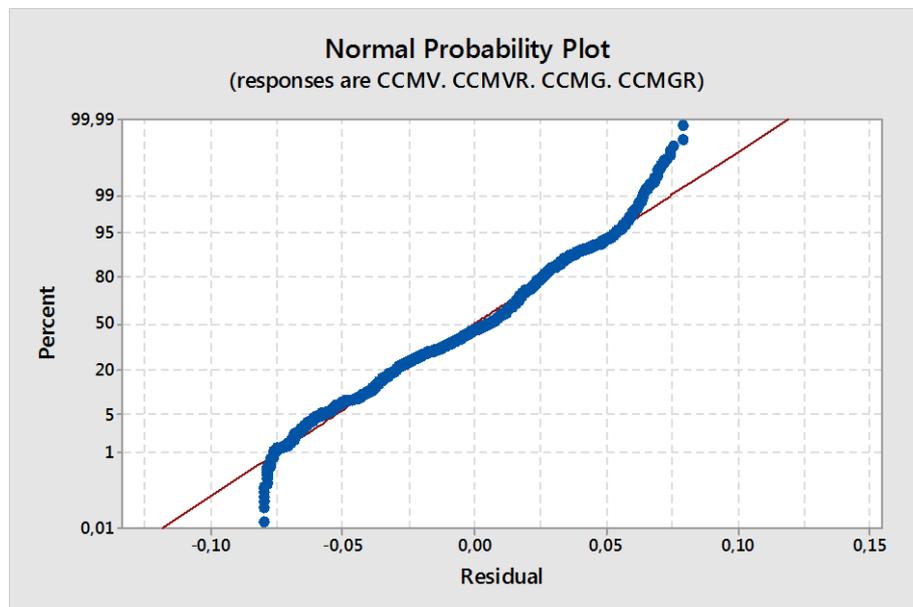
I



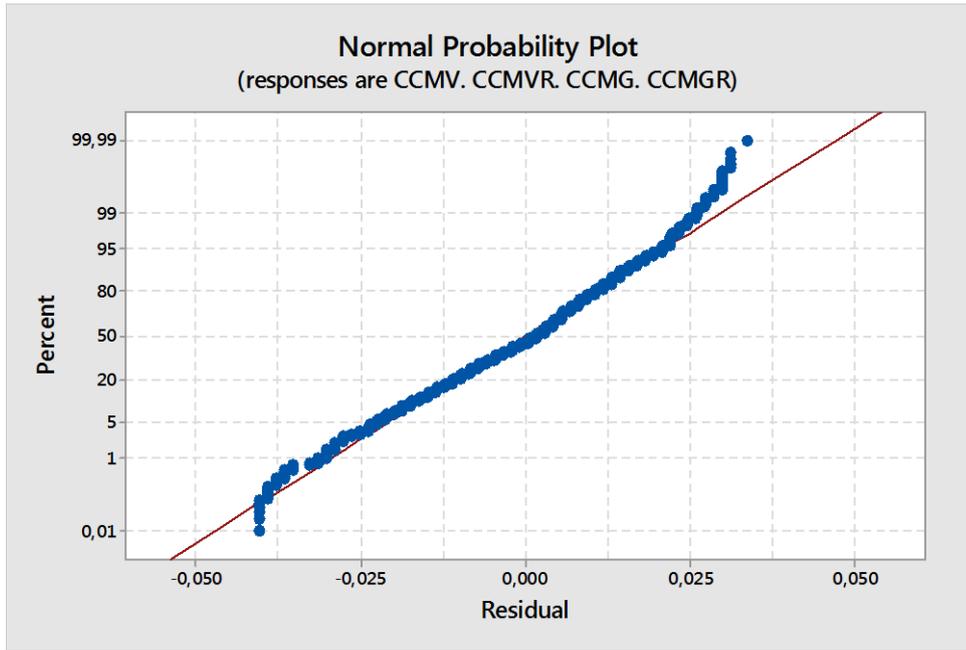
II



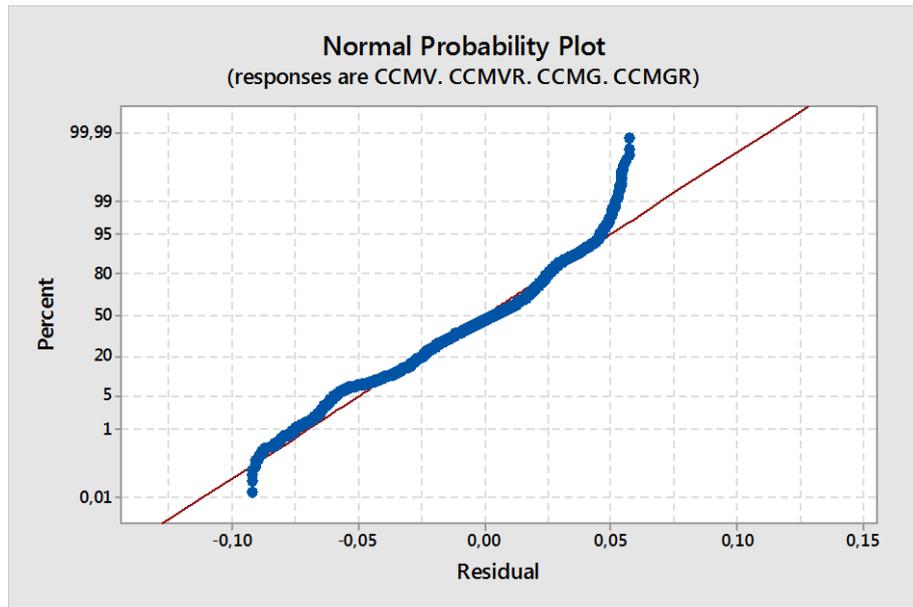
III



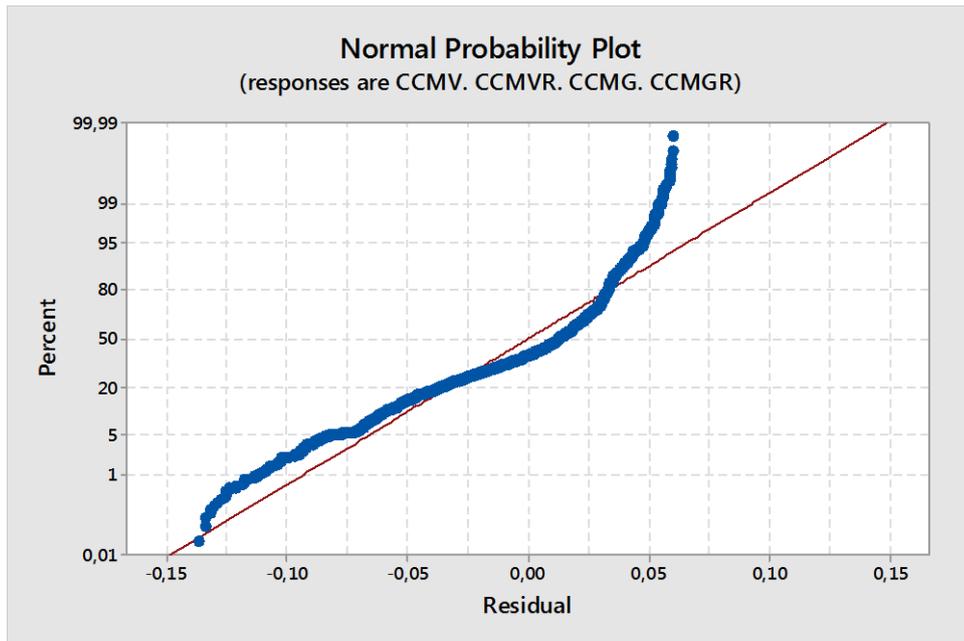
IV



V



VI



VII

