

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO
DE EFLUENTES DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN
CELAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS**

HENRY ANDRÉS MORENO ESPINEL

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

2017

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO
DE EFLUENTES DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN
CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS**

HENRY ANDRÉS MORENO ESPINEL

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

Director:

VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

Ingeniera Química, Ph.D. en Ingeniería Química

Codirector:

CHANGPING YU

Ingeniero Civil, Ph.D. en Ingeniería Ambiental

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS**

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. METODOLOGÍA	18
1.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO MCG	19
1.1.1 Producción de PHAs	19
1.1.2 Caracterización fisicoquímica del MCG	19
1.1.2.1 DQO	19
1.1.2.2 Polisacáridos	20
1.1.2.3 Proteínas	20
1.1.2.4 Carbono y nitrógeno	20
1.1.2.5 pH	20
1.2 PRUEBA PRELIMINAR CRECIMIENTO DE CEPAS EN EL MCG	20
1.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS	21
1.3.1 α -FeOOH como aceptor de electrones	21
1.3.1.1 Producción del α -FeOOH	21
1.3.1.2 Prueba preliminar con <i>Enterobacter sp.</i>	21
1.3.1.3 Aislamiento en condiciones microaerobias	22
1.3.1.4 Aislamiento en condiciones anaerobias estrictas	23
1.3.2 WO ₃ como aceptor de electrones	24
1.3.2.1 Producción del WO ₃	24
1.3.2.2 Prueba preliminar del WO ₃	25
1.3.2.3 Aislamiento con WO ₃	25

1.3.3	Identificación molecular de las cepas aisladas	26
1.4	CELIDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS	27
1.4.1	Selección de la cepa electrogénica	27
1.4.1.1	Prueba de crecimiento en MCG	27
1.4.1.2	Prueba de actividad electrogénica en MCG	28
1.4.2	Preparación de las celdas de combustible microbianas	28
1.4.2.1	Pretratamiento de la membrana de intercambio protónico	28
1.4.2.2	Montaje de las celdas de combustible microbianas	28
1.4.3	Operación de las celdas microbianas	30
1.4.4	Caracterización fisicoquímica del MCG final	31
2	RESULTADOS	31
2.1	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO MCG	31
2.2	PRUEBA PRELIMINAR CRECIMIENTO DE CEPAS EN EL MCG	31
2.3	AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS	32
2.3.1	α -FeOOH como aceptor de electrones	32
2.3.1.1	Prueba preliminar con <i>Enterobacter sp.</i>	32
2.3.1.2	Aislamiento en condiciones microaerobias	33
2.3.1.3	Aislamiento en condiciones anaerobias estrictas	34
2.3.2	WO ₃ como aceptor de electrones	34
2.3.2.1	Prueba preliminar del WO ₃	34
2.3.2.2	Aislamiento con WO ₃	34
2.3.3	Identificación molecular de las cepas aisladas	35
2.4	CELIDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS	35
2.4.1	Selección de la cepa electrogénica	35
2.4.1.1	Prueba de crecimiento en MCG	35
2.4.1.2	Prueba de actividad electrogénica en MCG	36
2.4.2	Operación de las celdas microbianas	36

2.4.3. Caracterización fisicoquímica del medio MCG final	37
3 CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍAS	42
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Datos MCG caracterizado	31
Tabla 2. Desempeño eléctrico de las celdas	37

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Celda de combustible microbiano	14
Figura 2. Metodología global	18
Figura 3. Aislamiento condiciones microaerobias y α -FeOOH	23
Figura 4. Aislamiento condiciones anaerobias estrictas y α -FeOOH	24
Figura 5. Aislamiento condiciones microaerobias y WO_3	26
Figura 6. Crecimiento cepas aisladas	28
Figura 7. Elementos de las CCM	29
Figura 8. Resultado prueba preliminar de crecimiento	32
Figura 9. Resultado prueba preliminar del α -FeOOH	33
Figura 10. Resultados aislamiento condiciones microaerobias y α -FeOOH	33
Figura 11. Resultados aislamiento condiciones anaerobias estrictas y α -FeOOH	34
Figura 12. Resultado de la prueba preliminar del WO_3	34
Figura 13. Resultados aislamiento condiciones microaerobias y WO_3	35
Figura 14. Crecimiento de las cepas aisladas en MCG	36
Figura 15. Voltaje producido en las CCM con <i>Aeromonas dhakensis</i> sp.	37
Figura 16. Eficiencia del tratamiento del MCG con las CCM	38
Figura 17. Efecto del tratamiento con CCM en el contenido de polisacáridos en el MCG	39
Figura 18. Efecto del tratamiento con CCM en el contenido de proteínas en el MCG	39
Figura 19. Cámara anódica al final del experimento	40

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Obtención de Medio de Cultivo Gastado MCG	47
Anexo B. Medios de cultivo	50
Anexo C. Demanda química de oxígeno DQO	52
Anexo D. Método de medición de polisacáridos	54
Anexo E. Método de medición de proteínas	56
Anexo F. Árboles filogenéticos	58
Anexo G. Taxonomía cepas aisladas	65

RESUMEN

TÍTULO: AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

AUTOR: HENRY ANDRÉS MORENO ESPINEL

PALABRAS CLAVE: POLIHIDROXIALCANOATOS, GLICEROL CRUDO, α -FeOOH, WO_3 , CEPAS ELECTROGÉNICAS, CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS.

DESCRIPCIÓN:

La utilización de residuos biotecnológicos ha sido de gran interés en la búsqueda de nuevas formas de producción de energía renovable y de reducción de contaminación generada por efluentes. En esta investigación se estudió el tratamiento de efluentes de la producción de polihidroxicanoatos (PHAs), con celdas de combustible microbianas. Para ello, se realizó la producción de PHAs a partir de glicerol crudo, se caracterizó el medio de cultivo gastado (MCG) obtenido y se confirmó el crecimiento de microorganismos exoelectrogénicos conocidos en el MCG. Posterior a ello se realizó la producción de dos aceptores de electrones, α -FeOOH y WO_3 , con los cuales se aislaron siete bacterias exoelectrogénicas. Luego se probó el crecimiento y actividad electrogénica de las bacterias aisladas en el MCG, seleccionando la cepa *Aeromonas dhakensis* sp. la cual se usó en celdas de combustible microbianas con MCG como sustrato. Se obtuvo una máxima densidad de potencia volumétrica de 647.86 W/m^3 y una eficiencia coulombica (EC) de 11.5%. Además de una producción relativamente estable por casi 30 días, se obtuvo una reducción de hasta el 57% de la demanda química de oxígeno (DQO) y 55% del contenido de carbono orgánico (COT), logrando así reducir la carga orgánica presente en el MCG.

ABSTRACT

TITLE: ELECTROGENIC BACTERIA ISOLATION FOR POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION EFFLUENTS TREATMENT IN MICROBIAL FUEL CELLS

AUTHOR: HENRY ANDRÉS MORENO ESPINEL

KEYWORDS: POLYHYDROXYALKANOATES, CRUDE GLYCEROL, α -FeOOH, WO_3 , ELECTROGENIC STRAIN, MICROBIAL FUEL CELL.

DESCRIPCIÓN:

The biotechnology's wastes utilization has been of great interest in the search for new forms of renewable energy production and effluent pollution reduction. In this research, the treatment of polyhydroxyalkanoates (PHAs) production effluents was studied with microbial fuel cells. Therefore, PHAs were produced from crude glycerol, the spent culture medium (MCG) obtained was characterized and the known exoelectrogenic microorganisms growth in the MCG was confirmed. After that, two electron acceptors, α -FeOOH and WO_3 were produced, with which seven exoelectrogenic bacteria were isolated. Then, the growth and electrogenic activity of the isolated bacteria in MCG were tested, selecting the strain *Aeromonas dhakensis* sp., which was used in microbial fuel cells with MCG as substrate. A maximum volumetric power density of 647.86 W/m³ and a Coulombic Efficiency (CE) of 11.5% were reached. In addition to a relatively stable production for almost 30 days, a reduction of up to 57% of the chemical oxygen demand (COD) and 55% of the total organic carbon (TOC) were obtained, thus achieving an organic load reduction in the MCG.

INTRODUCCIÓN

En la producción de biodiesel se genera glicerol crudo como subproducto. Dado que el glicerol crudo tiene un precio muy bajo en el mercado, se requieren alternativas para su utilización. Una de ellas, es la producción de polihidroxicanoatos (PHAs); sin embargo, en este proceso el Medio de Cultivo Gastado (MCG) queda al final del procedimiento como efluente.

Este efluente con carga orgánica tiene el potencial de ser aprovechado como fuente de carbono para otras aplicaciones biotecnológicas. En la actualidad, se ha incrementado la preocupación por la contaminación generada por efluentes y la necesidad de buscar nuevas formas de producción de energía renovable.

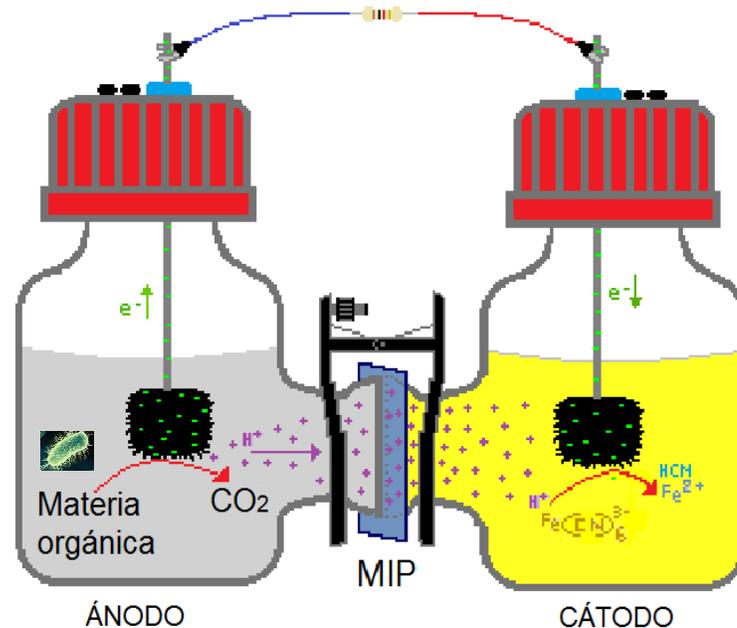
Las celdas de combustible microbianas (CCM) son dispositivos bioelectroquímicos, que pueden aprovechar la energía química de residuos orgánicos al degradarlos a través de reacciones catalíticas de microorganismos, bajo condiciones anaerobias y así convertirla en energía eléctrica ¹. Una CCM usualmente tiene una cámara anódica, una catódica y una membrana de intercambio de protones, MIP, que las separa (Figura 1).

En la cámara anódica ocurre una reacción, donde el microorganismo oxida el sustrato produciendo electrones y protones. Al estar en contacto con el ánodo, el microorganismo le entrega electrones generando una corriente o flujo de electrones que pasa a través de la resistencia hasta el cátodo. Los protones pasan a la cámara

¹ DU, Zhuwei; LI, Haoran y GU, Tingyue. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 2007. Vol. 25, p. 465.

catódica a través de la MIP para luego reaccionar en el cátodo con el oxígeno proveniente del ambiente y así obtener agua ^{2,3}.

Figura 1. Celda de combustible microbiano



Las membranas de intercambio de protones, están compuestas de un material polimérico que posee alta conductividad protónica y muy poca conductividad electrónica. Se caracterizan también por la baja solubilidad del polímero en agua, su estructura molecular que permite absorber agua e impermeabilidad a gases reactantes como el hidrógeno y el oxígeno ⁴.

Los PHAs son poliésteres producidos en forma de gránulos, que se acumulan en el citoplasma dentro de algunos microorganismos que se encuentran bajo condiciones de estrés, donde tienen exceso de la fuente de carbono junto con un déficit de algún

² LOGAN, Bruce. y REGAN, John. Microbial challenges and fuel cells applications. Environmental Science & Technology, Pennsylvania State University. 2006. p. 5173.

³ ZHOU, Minghua, *et al.* Bioelectrochemistry of Microbial Fuel Cells and their Potential Applications in Bioenergy. Bioenergy Research: Advances and Applications. 2014. p. 132.

⁴ MILLET, Pierre. GenHyPEM : an EC-supported STREP program on high pressure PEM water electrolysis. Université Paris-sud XI. France. 2006. p 4.

nutriente. Es considerado un material con características similares al plástico y totalmente biodegradable, que puede ser usado en la producción de bioplásticos, biocombustibles y en el campo de la medicina debido a su biocompatibilidad ⁵.

Diversos óxidos de hierro han sido utilizados previamente para el aislamiento de microorganismos electrogénicos, como el citrato férrico, akaganeite (β -FeOOH), el Fe(III)-pirofosfato y el oxihidróxido de hierro (III) amorfo (α -FeOOH), entre otros. Muchos de los microorganismos o bacterias con la capacidad de reducir el hierro poseen la facultad de generar energía eléctrica en CCM.

El α -FeOOH, de tonalidad anaranjada, se reduce en contacto con los electrones cuando el microorganismo electrogénico oxida el sustrato, produciendo así un cambio de color a un tono negro, de gran utilidad para realizar una detección, a simple vista, de la producción de energía eléctrica ⁶.

El trióxido de tungsteno (WO_3) posee una nanoestructura hexagonal con propiedades colorimétricas únicas, que dependen de las condiciones electroquímicas del ambiente, lo cual permite que sea una excelente herramienta para realizar pruebas bioelectroquímicas.

En el caso de microorganismos electrogénicos, el WO_3 es usado para detectar la liberación de electrones provenientes del sustrato al momento de ser oxidados por el microorganismo. Los electrones se intercalan en el único túnel triangular y hexagonal en la esquina compartida de la red de estructura WO_6 , formando

⁵ SERRANO, Julieth. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. Revista Teoría y Praxis Investigativa Bogotá. 2010. vol. 5, No. 2, p. 80.

⁶ Feng, C, et al. Characterization of exoelectrogenic bacteria *enterobacter* strains isolated from a microbial fuel cell exposed to copper shock load. Xiamen: PLOS ONE. 2014. vol. 9, p 1.

tungsteno azulado. La tonalidad azul permite realizar una detección a simple vista de la producción de energía eléctrica ⁷.

Los residuos del sector biotecnológico han sido considerados una opción de gran interés para ser usados como sustrato en la generación de energía eléctrica y como tratamiento parcial de dichos residuos ⁸, por ejemplo: biomasa residual de maíz ⁹, comida residual ¹⁰, efluentes de aceite de palma ¹¹, acetato ¹² y aguas residuales de diversos orígenes ¹³.

Algunos receptores de electrones comúnmente usados en la solución de la cámara catódica, han sido oxígeno disuelto, permanganato de potasio, dióxido de manganeso y ferricianuro, entre otros ¹⁴.

También se han implementado sistemas de CCM en plantas, en los cuales se observa una remoción de nutrientes y metales pesados en aguas de desecho ¹⁵.

Por otra parte, algunas estrategias de operación incluyen la inhibición de la

⁷ YUAN, Shi-Jie, *et al.* A plate-based electrochromic approach for the high-throughput detection of electrochemically active bacteria. Hefei: Nature protocols. 2014. vol. 9, No. 1, p. 112.

⁸ LI, Yan. Treating wastes with microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs). University of Connecticut. 2014.

⁹ ZUO, Yi.; MANESS, Pin-Ching. y LOGAN, Bruce. Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. Energy and Fuels. 2006. vol. 20.

¹⁰ GOUD, R. Kannaiah; BABU, P. Suresh y MOHAN, S. Venkata. Canteen based composite food waste as potential anodic fuel for bioelectricity generation in single chambered microbial fuel cell (MFC): Bio-electrochemical evaluation under increasing substrate loading condition. International Journal of Hydrogen Energy. 2006. vol. 36.

¹¹ B.C, Jong, *et al.* Performance and microbial diversity of palm oil mill effluent microbial fuel cell. Letters in Applied Microbiology. 2011 vol. 53.

¹² SHEN, Nan, *et al.* Rapid Isolation of a Facultative Anaerobic Electrochemically Active Bacterium Capable of Oxidizing Acetate for Electrogenesis and Azo Dyes Reduction. New York: Appl Biochem Biotechnol, 2014. vol 173.

¹³ Velásquez-Orta, *et al.* Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. Bioresource Technology. 2011. vol. 102.

¹⁴ WEI, Liling; HAN, Hongliang y SHENWEI, Jianquan. Effects of cathodic electron acceptors and potassium ferricyanide concentrations on the performance of microbial fuel cell. Beijing: International journal of Hydrogen Energy. 2012. vol. 37, p. 12980.

¹⁵ LU, Lu; XING, Defeng y REN, Zhiyong. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. Bioresource Technology. 2015 Vol.195.

producción de metano en las CCM ¹⁶ y la selección minuciosa de los receptores de electrones ¹⁷.

En este trabajo se emplearon efluentes de la producción de PHAs como sustrato y se utilizaron dos aceptores de electrones, con el fin de aislar un microorganismo electrogénico, que pueda ser utilizado en las CCM, contribuyendo a la disminución de la carga orgánica de los efluentes y aportando a su vez, un valor agregado al proceso, con la obtención de energía eléctrica.

El objetivo general de esta investigación fue estudiar el uso de celdas de combustible microbianas, para la generación de energía eléctrica a partir de efluentes de la producción de PHAs. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Aislar, al menos, cinco cepas electrogénicas.
- Seleccionar una cepa electrogénica adecuada, para la generación de energía eléctrica a partir de efluentes de la producción de polihidroxicanoatos.
- Establecer una configuración para una celda de combustible microbiana.
- Evaluar la eficiencia del tratamiento del MCG con CCM.

¹⁶ KAUR, Amandeep, *et al.* Inhibition of methane production in microbial fuel cells: Operating strategies which select electrogens over methanogens. *Bioresource Technology*. 2014. vol. 173.

¹⁷ HE, Chuan-Shu, *et al.* Electron acceptors for energy generation in microbial fuel cells fed with wastewaters: A mini-review. *Chemosphere*. 2014. vol. 140.

1. METODOLOGÍA

En este trabajo se obtuvo el MCG luego de realizar la producción de PHAs a partir de glicerol crudo; este fue esterilizado y caracterizado. Posteriormente se llevó a cabo una prueba preliminar del crecimiento de cepas electrogénicas conocidas en el MCG. Después se produjo el α -FeOOH, un receptor de electrones que luego de hacer una prueba preliminar con la cepa *Enterobacter sp.*, fue usado para aislar microorganismos electrogénicos en condiciones microaerobias y estrictamente anaerobias. También se realizó la producción de WO_3 , otro aceptor de electrones que esta vez fue probado con cuatro cepas electrogénicas conocidas, para luego aislar cepas con características electrogénicas en condiciones microaerobias (Figura 2).

Figura 2. Metodología global



Las cepas aisladas fueron identificadas realizando el árbol filogenético para mayor exactitud. Posterior a ello, se realizó una prueba de crecimiento en el MCG y una prueba de actividad electrogénica, donde se escogió la cepa de trabajo. A continuación, se prepararon las CCM para inocularlas con la cepa seleccionada

previamente y se monitoreó la generación de energía eléctrica. Finalmente, se hizo una caracterización fisicoquímica del MCG después del tratamiento con las CCM.

1.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO MCG

1.1.1 Producción de PHAs. El MCG se obtuvo mediante la producción de PHAs (Anexo A) a partir de glicerol crudo, se utilizó la cepa *Rhodococcus sp.* perteneciente al cepario del grupo de investigación Cinbin¹⁸, la cual fue caracterizada en una investigación previa como productora de polihidroxicanoatos¹⁹. *Rhodococcus sp.* se sembró en CYC agar y posteriormente se realizó un precultivo en medio LB (Anexo B) a 180 rpm, temperatura ambiente, por 24 h. Se inoculó ajustando una densidad óptica de 0.1, el cultivo se llevó a cabo en el medio MSMGC (Anexo B) con 10 g/L de glicerol crudo como fuente de carbono a 180 rpm y temperatura ambiente durante 72 h. El glicerol crudo (de la empresa Oleoflores S.A. ubicada en Codazzi Cesar) fue utilizado, sin ningún pretratamiento y fue obtenido como subproducto en la obtención de biodiesel a partir de aceite de palma.

Finalmente, el cultivo se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos, y el sobrenadante se esterilizó en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 minutos, constituyendo el medio de cultivo gastado MCG.

1.1.2 Caracterización fisicoquímica del MCG

1.1.2.1 DQO. La demanda química de oxígeno, DQO, (Anexo C) se midió utilizando el kit para medición de COD (Lian-hua Tech.co Ltd., China) con un reactor digital de

¹⁸ PEÑA, Adriana; HERNÁNDEZ, Jorge y SERNA, Oriana. Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado biología. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2015.

¹⁹ CÁCERES, Carlos y TOLOZA, Dancy. Tamizado de actinobacterias para la producción de polihidroxicanoatos a partir de residuos agroindustriales. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2016.

COD 5B-1 y el analizador rápido de COD portátil 5B-3C (Hangzhou Chincan Trading Co. Ltd, China).

1.1.2.2 Polisacáridos. Los polisacáridos se cuantificaron con la reacción de la antrona, variando la concentración de glucosa para generar la curva de calibración. La lectura de los datos se hizo con un espectrofotómetro de microplacas UV-Vis SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA) ajustado a 620 nm (Anexo D).

1.1.2.3 Proteínas. Para la medición de proteínas se realizó una curva estándar variando la concentración de proteína; la medición del contenido de proteínas se hizo midiendo la absorbancia a 562 nm empleando el espectrofotómetro de microplacas UV-Vis SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA) (Anexo E).

1.1.2.4 Carbono y nitrógeno. Para la medición del carbono total CT, carbono orgánico total COT y el nitrógeno total NT se empleó un analizador TOC-VCSH con un módulo TNM-1 y un automuestreador ASI-V (Shimadzu, Japón).

1.1.2.5 pH. Para la medición de pH se utilizó un pH-metro convencional.

1.2 PRUEBA PRELIMINAR CRECIMIENTO DE CEPAS EN EL MCG

Luego de caracterizar el MCG se utilizaron algunas cepas, conocidas por sus propiedades electrogénicas, disponibles en el laboratorio (***Shewanella sp.***, ***Enterobacter sp.***, ***Escherichia coli sp.*** y ***Bacillus sp.***) para analizar el crecimiento o la afinidad de dichas cepas con el MCG bajo condiciones anaerobias y microaerobias, es decir, purgadas con N₂ y sin purgar respectivamente.

Las cepas fueron sembradas en cajas de Petri con medio sólido LB (Anexo B) y luego precultivadas en Erlenmeyers con 25 mL de medio LB, durante 12 h a 150 rpm y 30 °C. Se inocularon 0.5 mL de precultivo en viales de 25 mL de vidrio sellados

con tapón de caucho, con 10 mL del MCG con y sin purgar, a 30 °C y 150 rpm durante 48 h, donde se analizó el crecimiento midiendo la turbidez o densidad óptica (DO) a 600 nm con un espectrofotómetro de microplacas UV-Vis SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA).

1.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS

1.3.1 α -FeOOH como aceptor de electrones.

1.3.1.1 Producción del α -FeOOH. Se preparó una solución 0.4 M de FeCl₃, se ajustó a un pH de 12 con una solución 1 M de NaOH. Luego se incubó en total oscuridad durante cuatro días, se recuperó el precipitado y finalmente se realizó un lavado con agua destilada ²⁰.

1.3.1.2 Prueba preliminar con *Enterobacter sp.* Se realizó una prueba preliminar utilizando la *Enterobacter sp.* como control positivo debido a su capacidad de reducir el hierro, con el fin de observar el comportamiento del α -FeOOH y establecer las condiciones óptimas de operación. Se agregaron 200 μ L de α -FeOOH en 10 mL de diferentes medios (acetato MA, comida residual CR y medio estándar LB) (Anexo B), probando con la adición de resazurina (0.01 mg), para visualizar la posible presencia de oxígeno y/o de cisteína, (0.01 g), para reducir los niveles de oxígeno y así tener condiciones anaerobias ²¹.

La cepa de prueba fue precultivada en Erlenmeyer con medio LB a 150 rpm y 30 °C durante 12 h, para luego realizar el cultivo en las diferentes combinaciones a 150 rpm y 30 °C durante 72 h. Finalmente se escogieron las condiciones de operación para aislar más microorganismos en diferentes medios. Todos los medios e

²⁰ SHARMA, Subed Chandra, *et al.* Electrochemical characterization of a novel exoelectrogenic bacterium strain scs5, isolated from a mediator-less microbial fuel cell and phylogenetically related to *Aeromonas jandaei*. *Microbes and Environments*. 2016. vol. 31, p 214.

²¹ Feng. *Op. cit.*, p. 2.

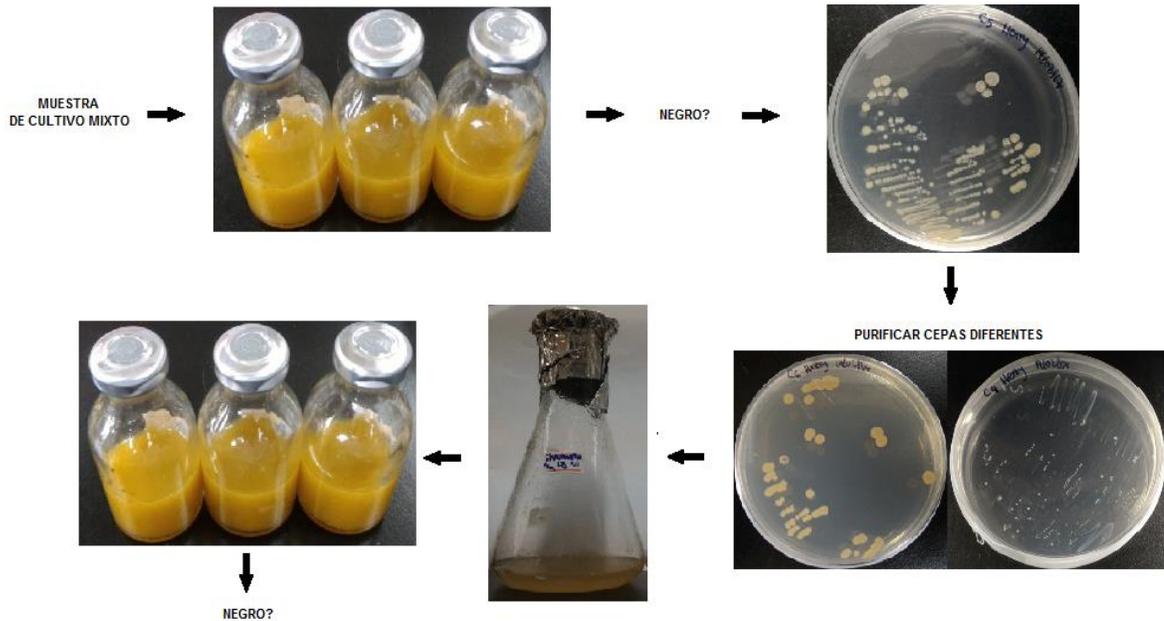
instrumentos fueron esterilizados en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 minutos antes de ser utilizados.

1.3.1.3 Aislamiento en condiciones microaerobias. Las muestras de cultivos mixtos, o de poblaciones con más de un microorganismo, fueron obtenidas de Celdas de Combustible Microbianas con plantas de arroz, CCMP, seleccionando las de mayor producción de electricidad, a tres condiciones diferentes: con fertilizantes orgánicos (FO), fertilizantes orgánicos e inorgánicos (FOI) y sin fertilizantes (SF). Se obtuvo una porción del ánodo de las CCMP, junto con el lodo o tierra de la superficie de este, para ser agregado a viales con 50 mL de tres diferentes medios como enriquecimiento. Los medios de enriquecimiento escogidos fueron a base de acetato MA, medio estándar LB y comida residual MCR (Anexo B).

Para aislar microorganismos con α -FeOOH, se inocularon 0.5 mL de cada muestra de enriquecimiento de cultivo mixto en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, 10 mL del medio correspondiente a los enriquecimientos y las condiciones de operación, previamente purgados con N_2 , los cuales se mantuvieron a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. Luego se agitaron un poco los viales y se tomaron muestras que fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB.

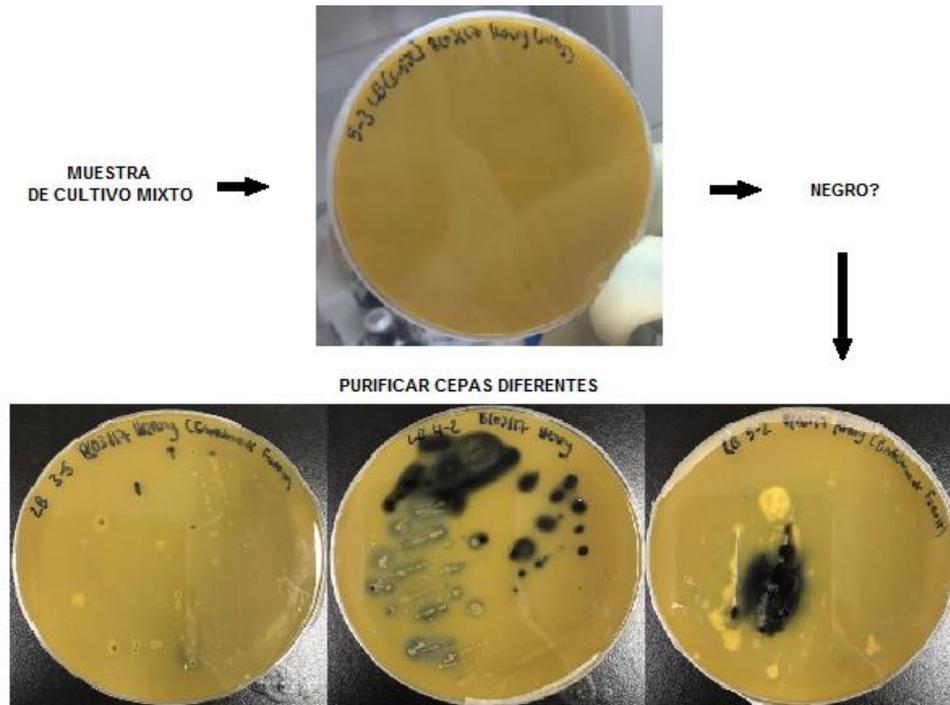
Se purificaron las diferentes cepas presentes tomando una sola colonia y sembrándola en nuevas cajas de Petri, repitiendo dos o tres veces este paso para asegurar la pureza. Después se precultivaron en Erlenmeyers con medio LB a 30 °C y 150 rpm durante 12 h para luego inocular 0.5 mL en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, 10 mL del medio correspondiente al enriquecimiento y las condiciones de operación con α -FeOOH, previamente purgados con N_2 , los cuales se mantuvieron a 30 °C y 150 rpm durante 72 h. Finalmente se observó la tonalidad para verificar las características electrogénicas de las cepas (Figura 3).

Figura 3. Aislamiento condiciones microaerobias y α -FeOOH



1.3.1.4 Aislamiento en condiciones anaerobias estrictas. Se buscó aislar microorganismos en condiciones estrictamente anaerobias y reducir el número de pasos al momento de aislar microorganismos (Figura 4). Se utilizó el medio sólido estándar LB a las condiciones de operación en cajas de Petri, se sembraron las muestras del enriquecimiento de cultivo mixto de CCMP y se mantuvieron a 30 °C durante 72 h. Luego se observó el cambio de la tonalidad a negro y se purificaron las colonias cercanas al medio de ese color en nuevas cajas de Petri a las mismas condiciones.

Figura 4. Aislamiento condiciones anaerobias estrictas y α -FeOOH



1.3.2 WO_3 como aceptor de electrones

1.3.2.1 Producción del WO_3 . A continuación, las nanopartículas de WO_3 ²² se obtuvieron diluyendo 0.825 g de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ y 0.290 g de NaCl en 20 mL de agua desionizada, ajustando la solución a un pH de 2 mediante la adición, gota a gota, de una solución 3 M de HCL. Posteriormente se introdujo la solución en un reactor de teflón de 45 mL con cubierta de acero y se calentó a 180 °C por 16 h en un horno; se dejó enfriar y se realizó un lavado con agua desionizada centrifugando varias veces a 13,000 rpm por 20 minutos, luego se recolectó el precipitado y se secó en un horno a 60 °C, obteniendo así las nanopartículas de WO_3 con apariencia de un polvo blanco.

²² YUAN. Op. cit., p. 115.

1.3.2.2 Prueba preliminar del WO₃. Para la prueba preliminar del WO₃ se utilizaron las cepas *Shewanella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* para observar su comportamiento en un medio estándar LB a condiciones anaerobias, es decir, purgado con N₂. Esto debido a que se quiso evitar la interferencia del oxígeno como segundo aceptor de electrones.

Las cepas fueron sembradas en cajas de Petri con medio sólido LB y luego precultivadas en Erlenmeyers con 25 mL de medio LB durante 12 h a 150 rpm y 30 °C. Se inocularon 0.5 mL de precultivo en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, con 10 mL de medio LB y 0.025 g de WO₃ previamente purgados con N₂, a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. Luego se tomaron los viales y se agitaron un poco para evitar precipitación de partículas de WO₃ y poder comparar el color. Todos los medios e instrumentos fueron esterilizados en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 minutos antes de ser utilizados.

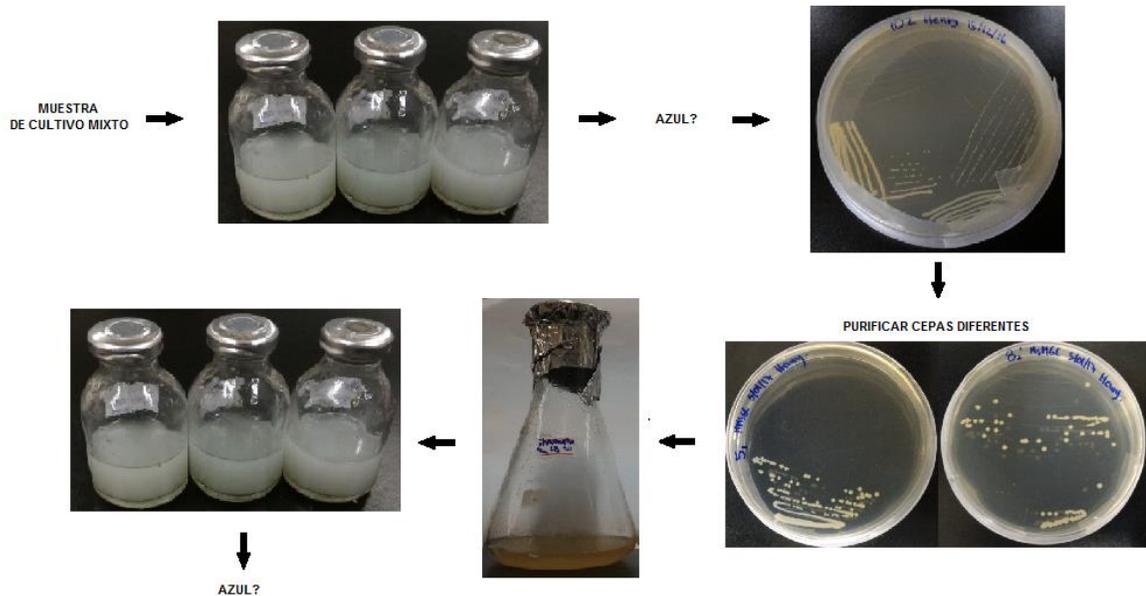
1.3.2.3 Aislamiento con WO₃. Se tomaron muestras de cultivos mixtos de CCM operacionales en la zona cercana al ánodo, donde el medio utilizado tiene comida residual como sustrato, MCR en dos condiciones diferentes, con vitaminas y minerales, VM y sin vitaminas o minerales, SVM.

Las muestras de cultivo mixto se inocularon en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, con 10 mL de MCR y 0.025 g de WO₃ previamente purgados con N₂, a 30°C y 150 rpm durante 48 h. Luego se agitaron un poco los viales y se tomaron muestras que fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB. Se purificaron las diferentes cepas presentes, tomando una sola colonia y sembrándola en nuevas cajas de Petri, repitiendo dos o tres veces este paso para asegurar la pureza.

Después se precultivaron en Erlenmeyers con medio LB a 30 °C y 150 rpm durante 12 h para luego ser inoculadas en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de

caucho, con 10 mL de MCR y 0.025 g de WO_3 previamente purgados con N_2 , a 30 °C y 150 rpm durante 72 h. Finalmente, se agitaron los viales para evitar la precipitación de WO_3 y poder observar la tonalidad para verificar las características electrogénicas de las cepas (Figura 5).

Figura 5. Aislamiento condiciones microaerobias y WO_3



1.3.3 Identificación molecular de las cepas aisladas. A continuación, se realizó la identificación de las cepas aisladas. Para esto primero se hizo la secuenciación del gen 16S rRNA, el ADN genómico fue extraído tocando levemente una colonia de la cepa pura aislada con una punta de 10 μ L y con su respectiva Micropipeta. Se preparó una solución con 0,5 μ L del “primer” o iniciador 27F (59-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-39), 0,5 μ L del “primer” o iniciador 1492R (59-GGTTACCTTTGTTACGACTT- 39), 12,5 μ L de una solución Premix Ex Taq (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd, Dalian, China) y 11,5 μ L de agua desionizada esterilizada, con un volumen total de 25 μ L, para luego tomar la punta previamente mencionada y mezclar dicha solución, liberando el ADN extraído con la punta en la mezcla.

La amplificación del gen se llevó a cabo en una Gene ProThermal Cyclor TC-E (Bioer Technology Co.,Ltd, Zhejiang, China), donde primero se hizo una desnaturalización del ADN a 94 °C por 5 minutos, luego se realizaron 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 1.5 minutos a 72 °C, después de los ciclos se mantuvo por 7 minutos a 72 °C ²³.

La secuencia del gen 16S rRNA que se obtuvo para cada cepa aislada fue comparada con las secuencias de las cepas válidas más cercanas o similares, a través de la base de datos EZbiocloud (www.ezbiocloud.net) donde se descargaron las secuencias en un archivo FASTA.

Después se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa ClustalW para realizar el árbol filogenético, usando un algoritmo de Maximum Likelihood, todo esto mediante el uso del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7). Tendiendo los árboles filogenéticos se identificaron las cepas aisladas.

1.4 CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

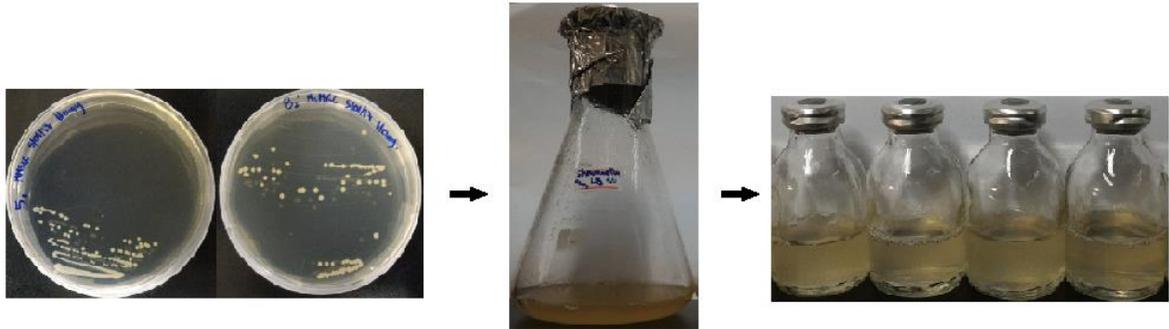
1.4.1 Selección de la cepa electrogénica. Se realizaron dos pruebas diferentes, con el fin de seleccionar la cepa con mejores características o potencial para producir electricidad en el MCG.

1.4.1.1 Prueba de crecimiento en MCG. Se hizo una prueba de crecimiento en MCG (Figura 6), donde se precultivaron las cepas en Erlenmeyers con medio LB a 30°C y 150 rpm durante 12 h, para luego inocular 0.5 mL en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, con 10 mL de MCG, previamente purgados con N₂, a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. El crecimiento se analizó midiendo el DO

²³ Feng. Op. cit., p. 6.

con un espectrofotómetro UV-Vis de alto rendimiento con lector de microplato (SpectraMax 190) ajustado a 600 nm.

Figura 6. Crecimiento cepas aisladas



1.4.1.2 Prueba de actividad electrogénica en MCG. Posteriormente se realizó una prueba de la actividad electrogénica con α -FeOOH en MCG para finalmente seleccionar la cepa a trabajar, donde se precultivaron las cepas en Erlenmeyers con medio LB y a condiciones de operación a 30°C y 150 rpm durante 12 h para luego inocular 0.5 mL en viales de 25 mL de vidrio sellados con tapón de caucho, con 10 mL de MCG, previamente purgados con N_2 , a 30 °C y 150 rpm durante 72 h.

1.4.2 Preparación de las celdas de combustible microbianas

1.4.2.1 Pretratamiento de la membrana de intercambio protónico. La Membrana de Intercambio de Protones, MIP, se sometió a un pretratamiento para esterilizarla, donde primero se sumergió en agua destilada y se mantuvo a 60 °C en un horno durante una hora. Luego en una solución al 3% de H_2SO_4 con agua destilada y se mantuvo a 60 °C durante una hora; finalmente en agua destilada a 60 °C durante una hora. El agua destilada usada fue esterilizada en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 minutos antes de usarse.

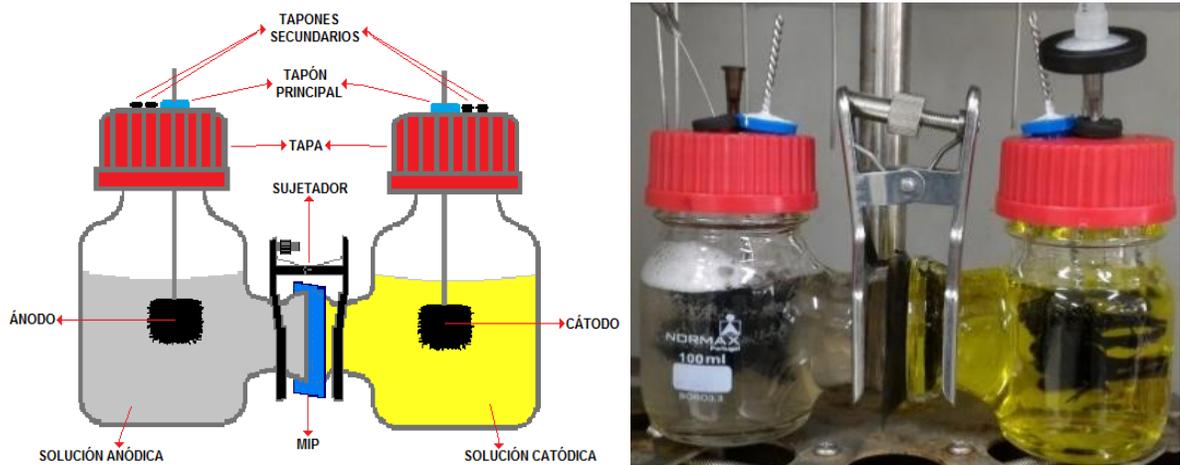
1.4.2.2 Montaje de las celdas de combustible microbianas. Se utilizaron celdas conformadas por dos cámaras principales de vidrio, las cuales tienen dos orificios

principales, uno superior de 3 cm de diámetro y uno lateral de 3.5 cm de diámetro. La parte superior de las cámaras tiene forma de rosca donde encaja una tapa autoclavable con tres orificios, uno con 1.2 cm de diámetro donde se ajusta un tapón principal y otros dos con 0.6 cm de diámetro para tapones secundarios.

Los electrodos usados como ánodo y cátodo tienen dos partes principales, el cepillo de fibra de carbono y el cable de acero inoxidable; dichos electrodos permanecen dentro de las cámaras anódica y catódica mientras que parte del cable de acero inoxidable atraviesa el tapón principal y una pequeña parte permanece afuera, por lo que la función del tapón principal es permitir el flujo de electrones a través del cable de acero inoxidable.

Los tapones secundarios tienen como función permitir el paso de agujas, uno de ellos para inyectar nitrógeno o para inocular mientras que el otro, habilita el flujo de oxígeno hacia el exterior. El orificio lateral de las celdas permite juntar ambos compartimientos poniendo una membrana de intercambio de protones, MIP, en la mitad y sosteniendo ambos compartimientos con un sujetador metálico, el cual puede ajustarse por medio de una rosca (Figura 7).

Figura 7. Elementos de las CCM



1.4.3 Operación de las celdas microbianas. Luego de realizar el montaje de las celdas, se procedió a inyectar la solución anódica MCG y la solución catódica de Ferricianuro de Potasio, con 16.46 g de $K_3[Fe(CN)_6]$, 6.7 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1.5 g de KH_2PO_4 , para 1 L de agua destilada.

Tanto la cámara anódica como la catódica fueron purgadas con nitrógeno, con el fin de evitar interferencia del oxígeno como aceptor de electrones.

Se precultivaron dos colonias de la misma cepa en Erlenmeyers con medio LB a 30 °C y 150 rpm durante 12 h, para luego inocular 1 mL de precultivo en cada CCM, donde se usaron celdas en circuito abierto y circuito cerrado con duplicado de la misma colonia.

Se conectó una resistencia de 1 k Ω a los electrodos de ambos compartimientos para así cerrar el circuito de las celdas respectivas. Las celdas en circuito cerrado fueron conectadas a un sistema de adquisición de datos (USB7660-B, ZTIC, China), almacenando el voltaje producido cada 10 minutos, mientras que las celdas en circuito abierto fueron medidas cada 12 horas con un multímetro convencional.

Posterior a ello, se calculó la corriente eléctrica I (mA) usando la fórmula $I = V/R$, donde V (mV) es el voltaje obtenido y R (1000 Ω) es la resistencia utilizada. Luego se halló la potencia P (W) = $I \cdot V / 1000^2$, la densidad de potencia volumétrica P_v (W/m³) fue calculada de la ecuación $P_v = P/V_{An}$, donde V_{An} es el volumen de la cámara anódica. Finalmente se calculó la eficiencia coulombica (EC), de acuerdo con la literatura²⁴. Por otro lado, el voltaje obtenido por las celdas en circuito abierto, representan un máximo teórico, de energía eléctrica, que podría ser obtenido de no ser por las pérdidas internas que hay en la práctica.

²⁴ LUO, Yong, *et al.* Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol.176 p 760.

1.4.4 Caracterización fisicoquímica del MCG final. Por último, se caracterizó el MCG final, realizando las mismas mediciones que se hicieron inicialmente: polisacáridos, proteínas, demanda química de oxígeno (DQO), pH, carbono total (CT), carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT). Se utilizaron los mismos métodos y protocolos ya mencionados y se compararon los resultados.

2. RESULTADOS

2.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO MCG

Se obtuvieron los siguientes datos de caracterización del medio (Tabla 1).

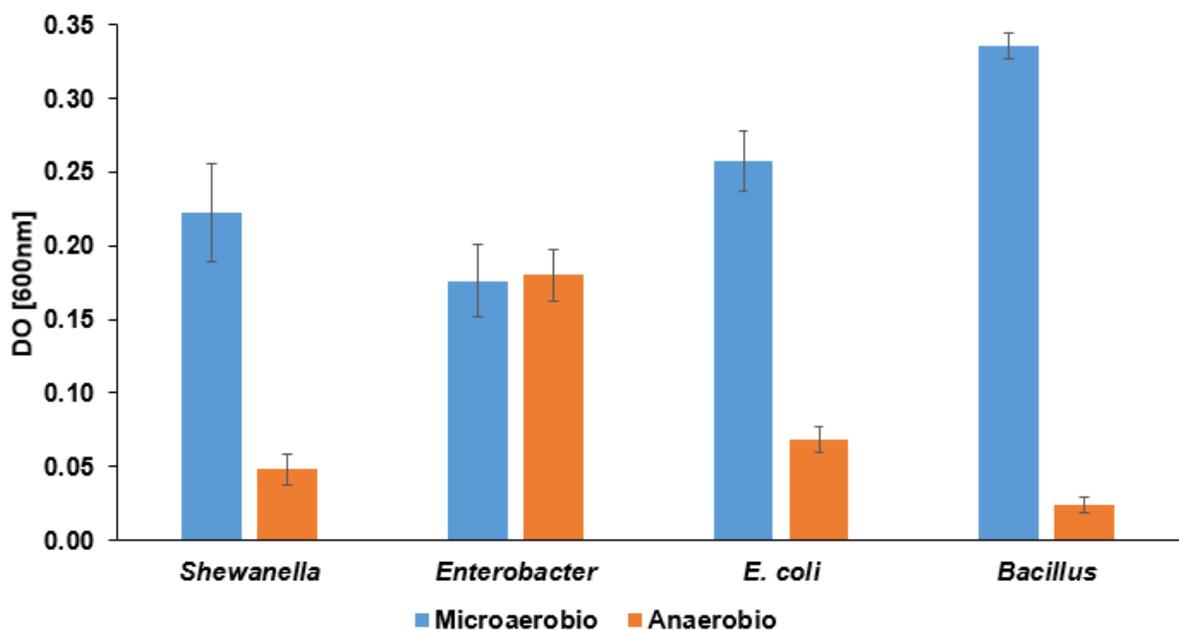
Tabla 1. Datos MCG caracterizado

DQO [g/L]	CT [g/L]	COT [g/L]	NT [g/L]	GLUCOSA [g/L]	PROTEÍNA [g/L]	pH
9.67	3.03	3.02	0.16	0.4784	8.34E-04	6.09

2.2 PRUEBA PRELIMINAR CRECIMIENTO DE CEPAS EN EL MCG

En la prueba de crecimiento se comprobó que algunos microorganismos electrogénicos conocidos pueden crecer en el MCG, por lo cual dicho medio tiene el potencial de ser usado para producir electricidad CCM (Figura 8).

Figura 8. Resultado prueba preliminar de crecimiento



2.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ELECTROGÉNICAS

2.3.1 α -FeOOH como aceptor de electrones

2.3.1.1 Prueba preliminar con *Enterobacter sp.* Se encontraron las condiciones de operación óptimas para reducir el hierro en diferentes medios, donde Resazurina no fue necesaria. Agregando 200 μ L de α -FeOOH y 0.005 g de cisteína para 10 mL de medio de cultivo. El medio tendrá un color anaranjado, que se torna negro fuerte al darse la liberación de electrones por acción de las bacterias (Figura 9).

Figura 9. Resultado prueba preliminar del α -FeOOH



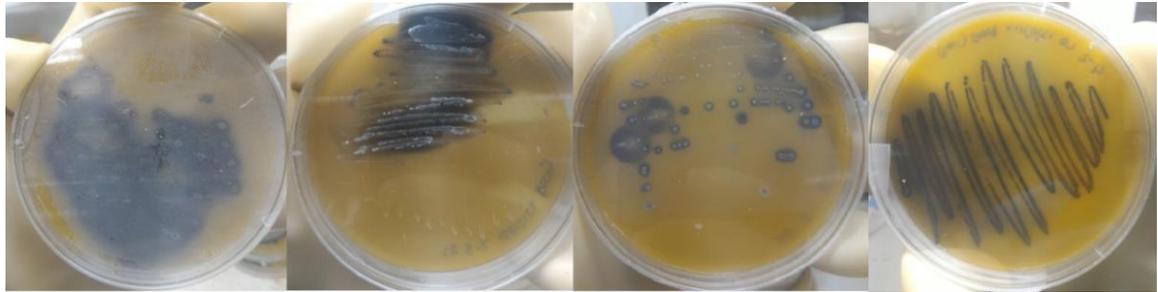
2.3.1.2 Aislamiento en condiciones microaerobias. Todas las muestras del cultivo mixto mostraron presencia de al menos un microorganismo electrogénico. Después, se purificaron siete microorganismos que finalmente mostraron características electrogénicas. (Figura 10).

Figura 10. Resultados aislamiento condiciones microaerobias y α -FeOOH



2.3.1.3 Aislamiento en condiciones anaerobias estrictas. Se purificaron siete microorganismos electrogénicos, este método fue de gran utilidad para aislar microorganismos anaerobios estrictos, sencillo y eficaz (Figura 11).

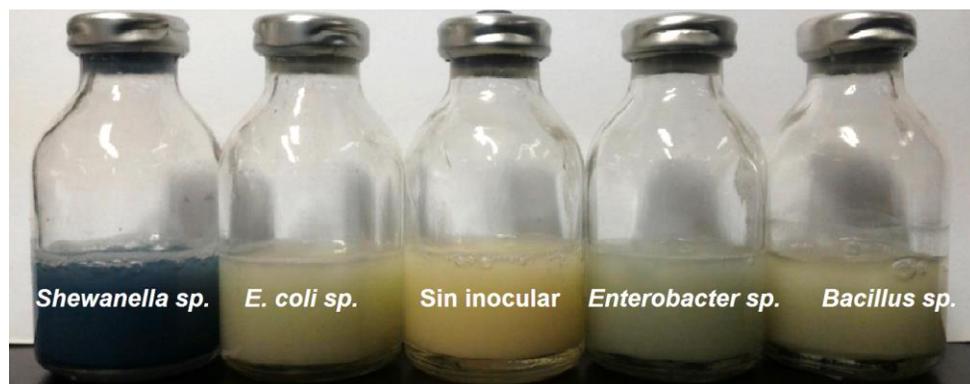
Figura 11. Resultados aislamiento condiciones anaerobias estrictas y α -FeOOH



2.3.2 WO_3 como aceptor de electrones

2.3.2.1 Prueba preliminar del WO_3 . Presentó un comportamiento muy bueno, donde el medio inicialmente blanco se torna azul en diferentes tonalidades, las cuales pueden ser tomadas como un punto de comparación entre cepas electrogénicas. *Shewanella* mostró la tonalidad más fuerte (Figura 12).

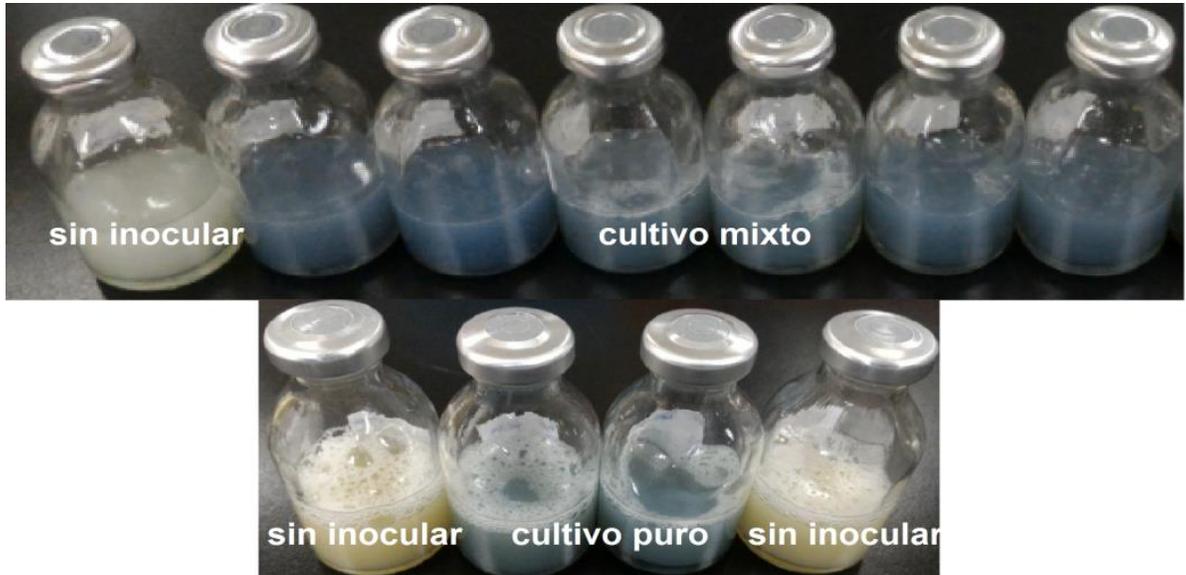
Figura 12. Resultado de la prueba preliminar del WO_3



2.3.2.2 Aislamiento con WO_3 . Todas las muestras de cultivo mixto presentaron coloración azul, pero luego de purificar no todas presentaron coloración. Se

escogieron dos cepas que presentaban la tonalidad más fuerte. El WO₃ es de gran utilidad al momento de descartar aquellos microorganismos no muy eficientes (Figura 13).

Figura 13. Resultados aislamiento condiciones microaerobias y WO₃



2.3.3 Identificación molecular de las cepas aisladas. Luego de realizar el árbol filogenético (Anexo F), algunas de las cepas aisladas fueron identificadas como pertenecientes a la misma especie. En resumen, fueron aisladas siete bacterias diferentes, *Aeromonas dhakensis*, *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Romboutsia lituseburensis*, *Acinetobacter brisouii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Anexo G).

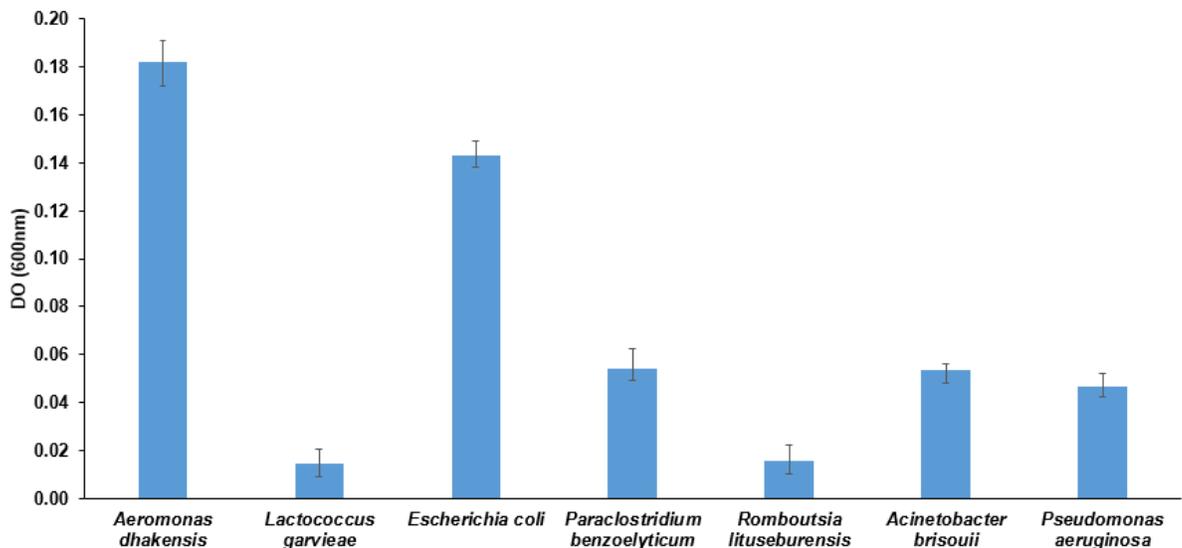
2.4 CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

2.4.1 Selección de la cepa electrogénica

2.4.1.1 Prueba de crecimiento en MCG. En la prueba de crecimiento en MCG se encontró que todas las bacterias aisladas tienen el potencial de producir electricidad

en CCM dado que son capaces de utilizar el MCG como sustrato. Las cepas con mayor crecimiento fueron *Aeromonas dhakensis* sp. y *Escherichia coli* sp. (Figura 14).

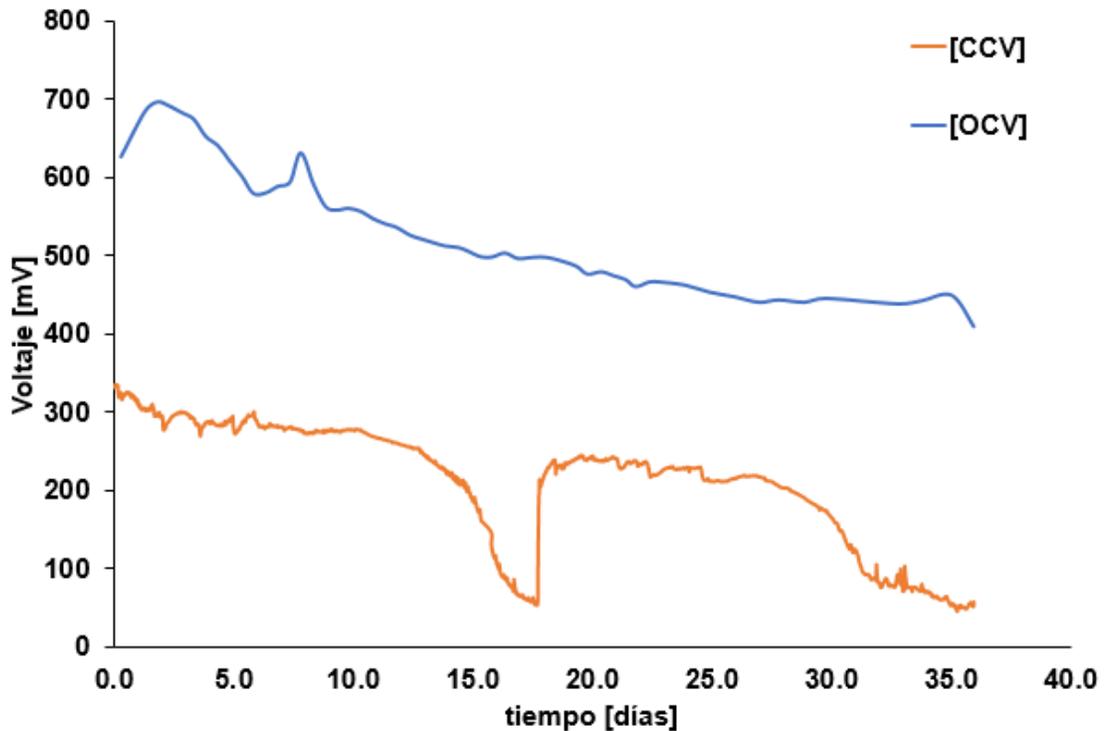
Figura 14. Crecimiento de las cepas aisladas en MCG



2.4.1.2 Prueba de actividad electrogénica en MCG. En la prueba de actividad electrogénica de las cepas aisladas en MCG con α -FeOOH, la cepa *Aeromonas dhakensis* sp. presentó un cambio de tonalidad en menos de 8 h, la cepa *Escherichia coli* sp., en menos de 12 h y las demás cepas en más de 24 h; lo cual es coherente con los resultados de crecimiento obtenidos previamente (Figura 14). Con estos resultados, junto con los de la prueba anterior se decidió trabajar las CCM con la cepa *Aeromonas dhakensis* sp.

2.4.2 Operación de las celdas microbianas. En las CCM de circuito cerrado (CCV), el voltaje tuvo un comportamiento un poco oscilante pero con una tendencia clara, con un máximo de 339.4mV y una producción prácticamente estable por casi 30 días. En el circuito abierto OCV, el voltaje tuvo un comportamiento muy similar pero con una tendencia más estable, se obtuvo un máximo voltaje de 723 mV y una producción de más de 35 días (Figura 15).

Figura 15. Voltaje producido en las CCM con *Aeromonas dhakensis* sp.



Con los datos de voltaje obtenidos, se realizaron los demás cálculos propuestos para evidenciar el máximo desempeño de las CCM en función de la energía eléctrica que se puede generar a partir de MCG como sustrato (Tabla 2).

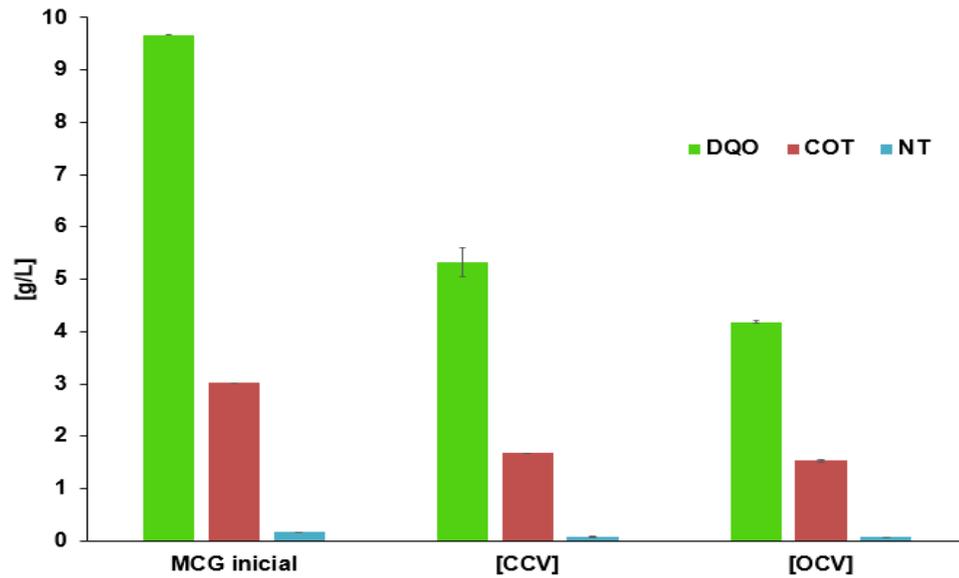
Tabla 2. Desempeño eléctrico de las celdas

V (mV)	I (mA)	P (W)	P_v (W/m ³)	EC (%)
326.95	0.33	1.07E-04	647.86	11.50

2.4.3 Caracterización fisicoquímica del medio MCG final. La caracterización final del MCG (Figura 16), muestra que los niveles de DQO se redujeron hasta 45% en las celdas de circuito cerrado, y hasta 57% de circuito abierto, lo cual permite ver cómo las CCM además de producir electricidad, realizaron un tratamiento del MCG, puesto que la DQO es una medida indirecta de la carga orgánica presente en el

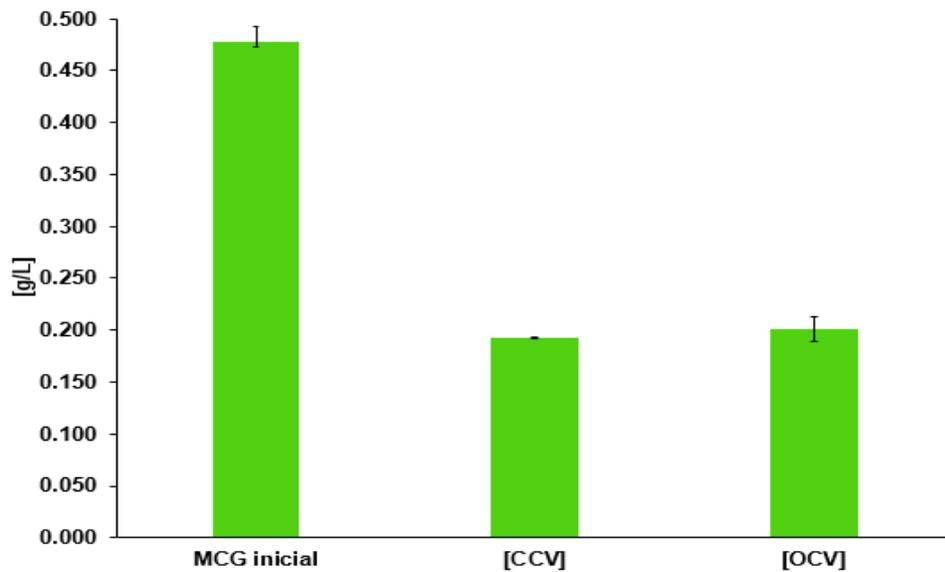
líquido y el contenido de COT también presentó una máxima reducción de hasta 55%. El NT también tuvo una reducción de hasta 57%.

Figura 16. Eficiencia del tratamiento del MCG con las CCM



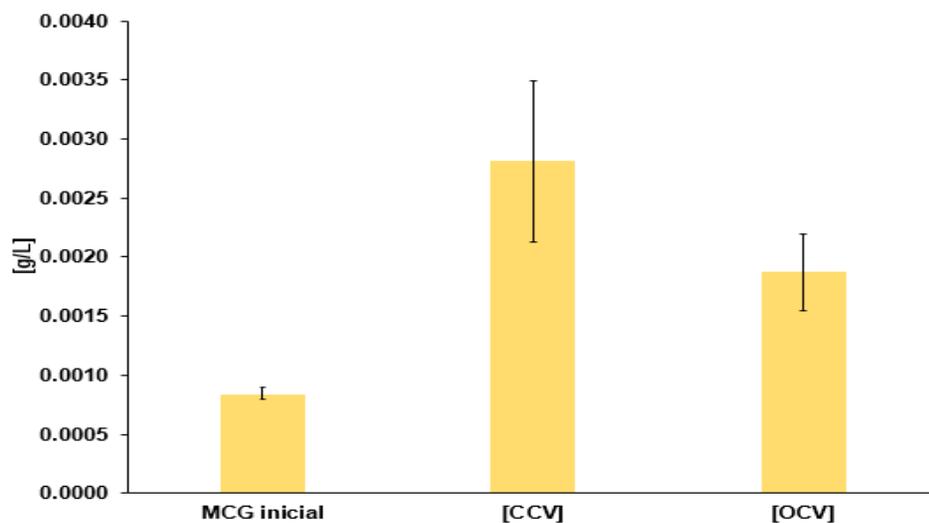
También se puede apreciar una reducción en el contenido de polisacáridos de hasta un 60%, cabe resaltar que el contenido de polisacáridos se reduce más en las CCM con CCV (Figura 17.)

Figura 17. Efecto del tratamiento con CCM en el contenido de polisacáridos en el MCG



Generalmente el contenido de proteínas es muy bajo, debido a esto, a pesar de un incremento de hasta el 296% de su contenido en las CCM con CCV, dicho aumento no representa una contribución significativa al DQO. (Figura 18.)

Figura 18. Efecto del tratamiento con CCM en el contenido de proteínas en el MCG



Una revisión a simple vista de la cámara anódica sugiere que hubo un crecimiento bacteriano mucho mayor en CCV, mientras que en las OCV sugiere un crecimiento moderado; A su vez, las CCM con mayor crecimiento bacteriano supondrían un mayor consumo de carbono, pero a su vez una tasa de reproducción muy alta que puede conllevar a una mayor disminución de los niveles de polisacáridos, pero a un aumento en los niveles de proteína celular, siendo una posible explicación de los porcentajes previamente mencionados (Figura 19).

Figura 19. Cámara anódica al final del experimento



3. CONCLUSIONES

- El α -FeOOH es una herramienta muy útil para aislar microorganismos con características electrogénicas, mientras que el WO_3 permite también comparar el nivel de actividad electrogénica directamente para obtener mejores resultados.
- Se aislaron siete (7) cepas diferentes: *Aeromonas dhakensis*, *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *Paraclostridium benzoelyticum*, *Romboutsia lituseburensis*, *Acinetobacter brisouii* y *Pseudomonas aeruginosa*, que, sometidas a dos pruebas en MCG, crecieron exitosamente y se comprobó, además, que tienen actividad electrogénica en él.
- La cepa *Aeromonas Dhakensis sp.* logró reducir hasta el 57% de la DQO del MCG utilizado en CCM, obteniendo a su vez una máxima densidad de potencia volumétrica de 647.86 W/m³.

BIBLIOGRAFÍA

ALI, Amr El-Hag, et al. Optimization of double chamber microbial fuel cell for domestic wastewater treatment and electricity production. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*. 2015. vol. 43.

AYYARU, Sivasankaran y DHARMALINGAM, Sangeetha. Development of MFC using sulphonated polyether ether ketone (SPEEK) membrane for electricity generation from waste water. India: *Bioresource Technology*. 2011 vol. 102.

B.C, Jong, et al. Performance and microbial diversity of palm oil mill effluent microbial fuel cell. *Letters in Applied Microbiology*. 2011 vol. 53.

CÁCERES, Carlos y TOLOZA, Dancy. Tamizado de actinobacterias para la producción de polihidroxicanoatos a partir de residuos agroindustriales. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2016.

DU, Zhuwei; LI, Haoran y GU, Tingyue. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 2007. Vol. 25, p. 465.

FANGZHOU, Du., et al. Electricity generation directly using human feces wastewater for life support system. Beijing: *Acta Astronautica*. 2011. vol. 68.

Feng, C, et al. Characterization of exoelectrogenic bacteria enterobacter strains isolated from a microbial fuel cell exposed to copper shock load. Xiamen: *PLOS ONE*. 2014. vol. 9, p 1.

GOUD, R. Kannaiah; BABU, P. Suresh y MOHAN, S. Venkata. Canteen based composite food waste as potential anodic fuel for bioelectricity generation in single

chambered microbial fuel cell (MFC): Bio-electrochemical evaluation under increasing substrate loading condition. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006. vol. 36.

HE, Chuan-Shu, et al. Electron acceptors for energy generation in microbial fuel cells fed with wastewaters: A mini-review. *Chemosphere*. 2014. vol. 140.

HUANG, Jiexun; SUN, Baolin y ZHANG, Xiaobo. Electricity generation at high ionic strength in microbial fuel cell by a newly isolated *Shewanella marisflavi* EP1, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010. vol. 85.

KAUR, Amandeep, et al. Inhibition of methane production in microbial fuel cells: Operating strategies which select electrogens over methanogens. *Bioresource Technology*. 2014. vol. 173.

LI, Shan-Wei, et al. Chitin degradation and electricity generation by *Aeromonas hydrophila* in microbial fuel cells. *Chemosphere*. 2017. vol. 168.

LI, Yan. Treating wastes with microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs). University of Connecticut. 2014.

LOGAN, Bruce. y REGAN, John. Microbial challenges and fuel cells applications. *Environmental Science & Technology*, Pennsylvania State University. 2006. p. 5173.

LU, Lu; XING, Defeng y REN, Zhiyong. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2015 Vol.195.

LUO, Yong, et al. Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol.176 p 760

MILLET, Pierre. GenHyPEM : an EC-supported STREP program on high pressure PEM water electrolysis. Université Paris-sud XI. France. 2006. p 4.

NIMJE, Vanita Roshan, et al. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*. 2009. vol. 190.

PANT, Deepak, et al. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bélgica: Bioresource Technology*. 2010. vol. 101.

PEÑA, Adriana; HERNÁNDEZ, Jorge y SERNA, Oriana. Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado biología. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2015.

RINGEISEN, Bradley, et al. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science and Technology*. 2006. vol. 40.

SERRANO, Julieth. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Revista Teoría y Praxis Investigativa Bogotá*. 2010. vol. 5, No. 2, p. 80.

SHARMA, Subed Chandra, et al. Electrochemical characterization of a novel exoelectrogenic bacterium strain scs5, isolated from a mediator-less microbial fuel cell and phylogenetically related to *Aeromonas jandaei*. *Microbes and Environments*. 2016. vol. 31, p 214.

SHEN, Nan, et al. Rapid Isolation of a Facultative Anaerobic Electrochemically Active Bacterium Capable of Oxidizing Acetate for Electrogenesis and Azo Dyes Reduction. New York: Appl Biochem Biotechnol, 2014. vol 173.

VELÁSQUEZ-ORTA, Sharon, et al. Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. Bioresource Technology. 2011. vol. 102.

WEI, Liling; HAN, Hongliang y SHENWEI, Jianquan. Effects of cathodic electron acceptors and potassium ferricyanide concentrations on the performance of microbial fuel cell. Beijing: International journal of Hydrogen Energy. 2012. vol. 37, p. 12980

WEN, Qing, et al. Electricity generation from synthetic penicillin wastewater in an air-cathode single chamber microbial fuel cell. Harbin: Chemical Engineering Journal. 2011. vol. 168.

YUAN, Shi-Jie, et al. A plate-based electrochromic approach for the high-throughput detection of electrochemically active bacteria. Hefei: Nature protocols. 2014. vol. 9, No. 1, p. 112.

ZHAENG, Tao, et al. Endogenously enhanced biosurfactant production promotes electricity generation from microbial fuel cells. Bioresource Technology. 2015. Vol. 197.

ZHOU, Minghua, et al. Bioelectrochemistry of Microbial Fuel Cells and their Potential Applications in Bioenergy. Bioenergy Research: Advances and Applications. 2014. p. 132.

ZUO, Yi.; MANESS, Pin-Ching. y LOGAN, Bruce. Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. Energy and Fuels. 2006. vol. 20.

ANEXO A

OBTENCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO GASTADO (MCG)

I. CULTIVO DEL MICROORGANISMO

Procedimiento:

1. Preparar 60mL del medio CYC (medir los componentes en una balanza) en un Erlenmeyer (cubrir la boquilla con aluminio).
2. El medio, las azas y las puntas se ponen en la autoclave en modo “*Slow (Líquids)*” durante 20 minutos, si es manual a 120 voltios se aumenta la presión hasta llegar a 15 psi y se mantiene por 15 minutos.
 - Se vierte el medio en cada caja (30mL cada una, es decir la mitad del medio preparado) y se espera hasta que se solidifique.
 - Se realiza el método de agotamiento para el sembrado, es decir, se toma una punta con la Micropipeta y se saca una muestra del microorganismo del vial, se deposita en una caja de Petri; luego con un aza se esparce en líneas por la superficie del medio y se cierra la caja de Petri. Se repite el procedimiento para la otra caja.

II. PRECULTIVO

Procedimiento:

1. Se preparan 120 mL del medio LB (medir los componentes en una balanza) y se separan en 2 Erlenmeyer (purgarlos con agua destilada antes de usarlos) y, se cubren las boquillas con aluminio.
2. El medio y las azas se ponen en la autoclave en modo “*Slow (Líquids)*” durante 20 minutos (si fuese mucho medio, 40 minutos); si es manual, a 120

voltios se aumenta la presión hasta llegar a 15 psi, se apaga y luego de 15 minutos (si fuese mucho medio, 30 minutos).

- Poner los Erlenmeyer en un agitador a 180 rpm y temperatura ambiente durante 1 día o máximo 2.

III. CULTIVO

Procedimiento:

1. Preparar el medio MSMGC y separar de a 100 mL por y cubrir las boquillas con aluminio.
2. Preparar 50 mL de medio LB (medir los componentes en una balanza) en un vaso pequeño y tapar con aluminio.
3. El medio MSMGC, el medio LB y las puntas se ponen en la autoclave en modo “*Slow (Líquids)*” durante 40 minutos (si fuese poco medio, 20 minutos); si es manual, a 120 voltios se aumenta la presión hasta llegar a 15 psi, se apaga y luego de 30 minutos (si fuese poco medio, 15 minutos) se libera el vapor con cuidado.
 - Se debe inocular el cultivo con una DO=0,1, por lo cual se calcula cuánto volumen de precultivo hay que adicionar al cultivo para obtener esa DO.

$$DO_{precultivo} * Vinoculacion = DO_{cultivo} * V_{cultivo}$$

- Si el volumen de inoculación es muy grande, $V_{inoculación} > 2\text{mL}$ entonces, ese volumen de precultivo se centrifuga en Eppendorf (1,5mL) a 5000 rpm por 2 minutos y luego se disuelve en 500 μL de NaCl al 85%.
- Poner los Erlenmeyer en un agitador a 180 rpm y temperatura ambiente durante 72 horas.

IV. PHB y Efluente

1. Retirar los Erlenmeyer de cultivo del agitador.
2. Se depositan en los recipientes para centrifugar y, se ajustan los volúmenes de tal manera que pesen igual los 4 $v_1=v_2=v_3=v_4$, o que dos pesen un valor $V_1=V_2$ y los otros dos otro valor $V_3=V_4$.
3. Se introducen en la centrífuga de tal manera que los opuestos pesen igual, es decir el que está enfrente debe pesar lo mismo y luego se cierra bien la centrífuga.
4. Se centrifuga a 10.000 G por 6 minutos, se pasa el efluente en un contenedor.
Nota: el contenedor no debe quedar lleno, debe tener cierto espacio que contemple la expansión del líquido.
5. Se introducen los recipientes con PHB y el contenedor con el efluente en el congelador para preservarlo.

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVO

Medio CYC (Para 1 L):

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
KClO ₃	0,5 g
Agar	15 g
Casaminoácidos	6 g
Extracto de levadura	2 g
Aqua destilada	1 L

Medio LB (Para 200 mL):

Triptona	2 g
Extracto de levadura	1 g
NaCl	2 g
Agua destilada	200 mL

Medio MSMGC (Para 1L):

Glicerol crudo	12,5 g			Elementos traza (1 L)	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6,7 g	ó Na ₂ HPO ₄	3,55 g	H ₃ BO ₃	0,3 g
NaCl	10 g			CaCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g			ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
NH ₄ Cl	0,1 g			MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g			NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g			NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
Citrato Amonio Ferroso	0,06 g	ó FeSO ₄	0,034 g	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
Elementos traza	1 mL			Agua destilada	1 L

Medio MCR (Para 560 mL):

Buffer	475 mL
Solución de comida residual	60 mL
Vitaminas	12.5 mL
Minerales	12.5 mL
Buffer (1 L)	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	11.55 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2.77 g

Medio MA (1 L):

NH ₄ Cl	0.115 g
KH ₂ PO ₄	0.026 g
Extracto de levadura	0.2 g
Cisteína	0.5 g
Resazurina	1 mg
Acetato de sodio	20 mM
α-FeOOH	20 mM
Trazas de minerales	10 mL
Vitaminas	1 mL
Agua destilada	1 L

Para medios sólidos agregar agar a una concentración de 15g de agar, por litro de medio.

ANEXO C

DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO)

“CHEMICAL OXYGEN DEMAND” (COD)

Materiales	Equipos:
Muestras	5B-1 Reactor digital de COD
Tubos	5B-3C Analizador rápido de COD portátil
Micropipeta y puntas (1000-5000 μ L)	
Agua destilada	
“Agent D (LH-D)” y “Agent E (LH-E)”	
Pipeta y pera de succión	
Celdas para medir el COD	
Base para tubos	
Base para tubos con agua de enfriamiento	
Recipiente para limpieza de las celdas	
Recipiente desechos	

Procedimiento:

1. Encender la máquina de COD 2 horas antes de usarla.
2. Hacer el “Agent D (LH-D)” y “Agent E (LH-E)” según las indicaciones del proveedor.
3. Usando la micropipeta y las puntas, poner 2,5mL de agua destilada en un tubo (blanco) y 2,5mL de cada muestra en su tubo respectivo (marcado).
4. Guardar las muestras restantes en el refrigerador.
5. Usando la micropipeta y las puntas, poner 700 μ L de “Agent D (LH-D)” en cada tubo (incluido el blanco).
6. Encender el 5B-1 Reactor digital de COD

7. Usando la pipeta y la pera de succión, poner 4,8mL de “Agent E (LH-E)” en cada tubo (incluido el blanco).
8. Mezclar cada tubo y ponerlo en el 5B-1 Reactor digital de COD.
9. Presionar el botón para comenzar la reacción ”消解” y esperar 10 minutos.
10. Ponerlos en la base para tubos sencilla y agregar 2,5mL de agua destilada a cada tubo.
11. Cuando ya ha bajado un poco la temperatura, se pasan a la base con agua para que se enfríen más rápido.
12. Purgar la celda (con blanco) y agregar el blanco, introducir la celda en la máquina de COD.
13. Presionar el botón 4 y esperar a que se estabilice, luego presionar el botón 1 y esperar a que el valor llegue a cero.
14. Sacar la celda, desechar el líquido en un recipiente, purgar la celda con agua destilada y poner la nueva muestra, esperar a que se estabilice y anotar el valor. Repetir para cada muestra.
15. Poner los tubos en ácido para su posterior limpieza, lavar los instrumentos (lo que tenía ácido lavarlo 3 veces).

ANEXO D

MÉTODO DE MEDICIÓN DE POLISACÁRIDOS

Propósito: guía para estudiantes del laboratorio en Institute of Urban Environmental, IUE, Chinese Academy of Sciences, CAS, para medir los polisacáridos presentes en una muestra. (Elaborada en el IUE, CAS, el 21 de noviembre de 2016).

I. SOLUCIONES GLUCOSA Y ANTHRONE

GLUCOSA

Solución de glucosa (1L)		Número de tubos (Nt)	
Glucosa	0,1 g	Curva estándar	7 tubos
Agua destilada	1 L	Muestras	2 tubos por muestra

ANTRONA

Solución de "Antrona"	
Cantidad por tubo	4 mL

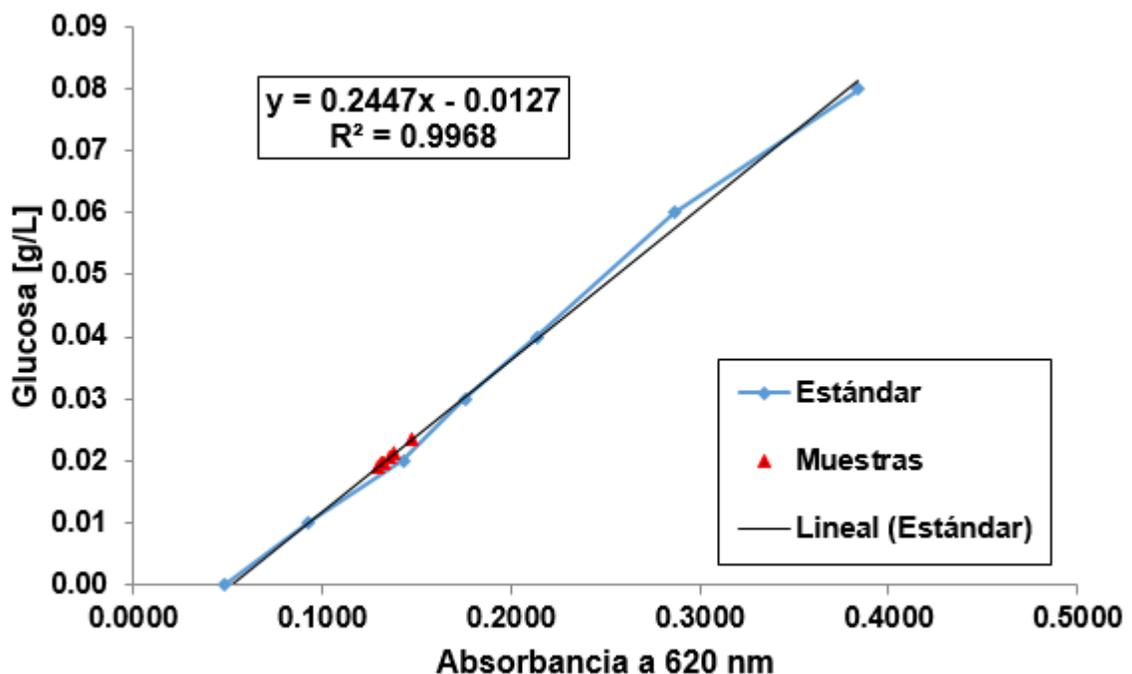
Receta solución de Antrona (100 mL)	
Antrona	0,2 g
H ₂ SO ₄	100 mL

Procedimiento:

1. Encender el equipo de baño de agua de alta precisión y ajustar su temperatura a 100 °C.
2. Llenar los tubos de la siguiente manera:

Nota: agregar la solución de Antrona al final e inmediatamente después poner los tubos en el *Ice pack* debido a la reacción exotérmica que se lleva a cabo.

3. Luego de ponerlos en el *Ice Pack* por un par de minutos, hay que poner los tubos en el baño de agua a 100 °C por 10 minutos.
4. Sacar los tubos y ponerlos en el *Ice Pack* por 2 minutos.
5. agregar la solución de glucosa para la curva estándar variando la concentración en cada celda, completar 1 mL con agua desionizada para cada celda, luego agregar en cada celda 1 mL de cada muestra con 4 mL la solución de Antrona.
6. Leer en el Espectrofotómetro a 620 nm.



ANEXO E

MÉTODO DE MEDICIÓN DE PROTEÍNAS

I. Componentes para Estándar

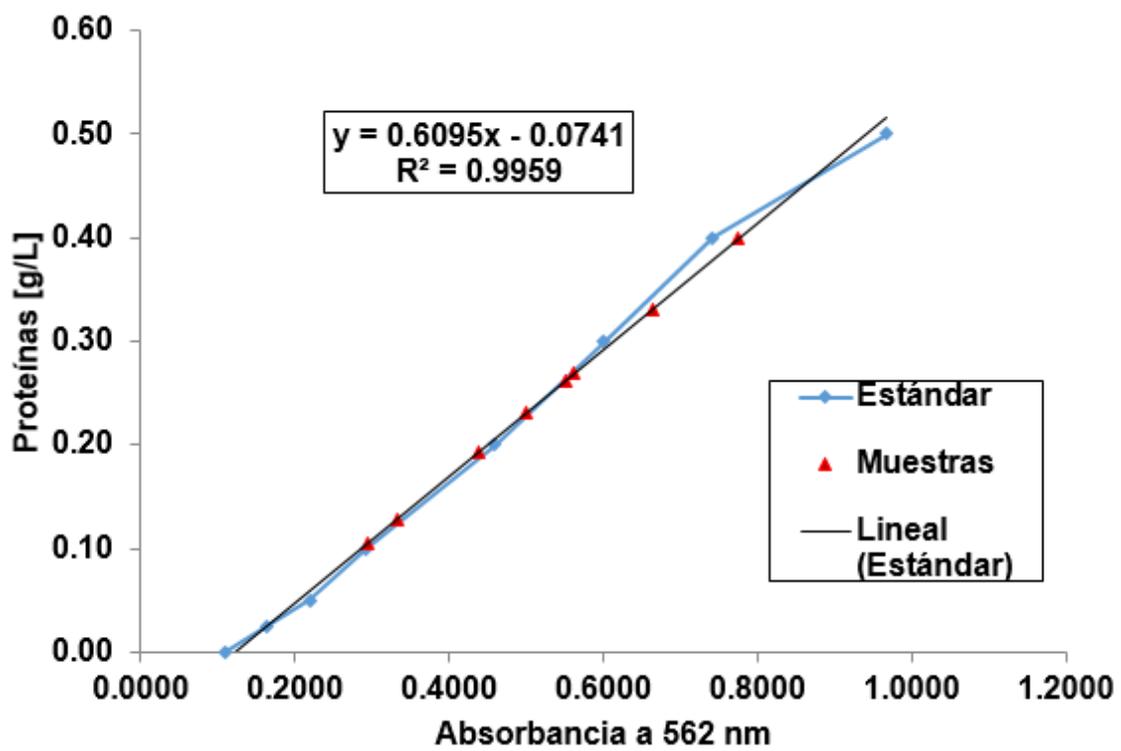
Solución de NaCl (100 mL)	
NaCl	0,9 g
Agua destilada	100 mL

Solución de Proteína Concentrada (25 mg/L)	
PSSW P0010-4	1.2 mL
Proteína	Todo (Aprox. 0.03 mg)

Solución de Proteína Diluida (0,5 mg/L)	
Solución de proteína concentrada(25 mg/L)	20 µL
Solución de NaCl	980 µL

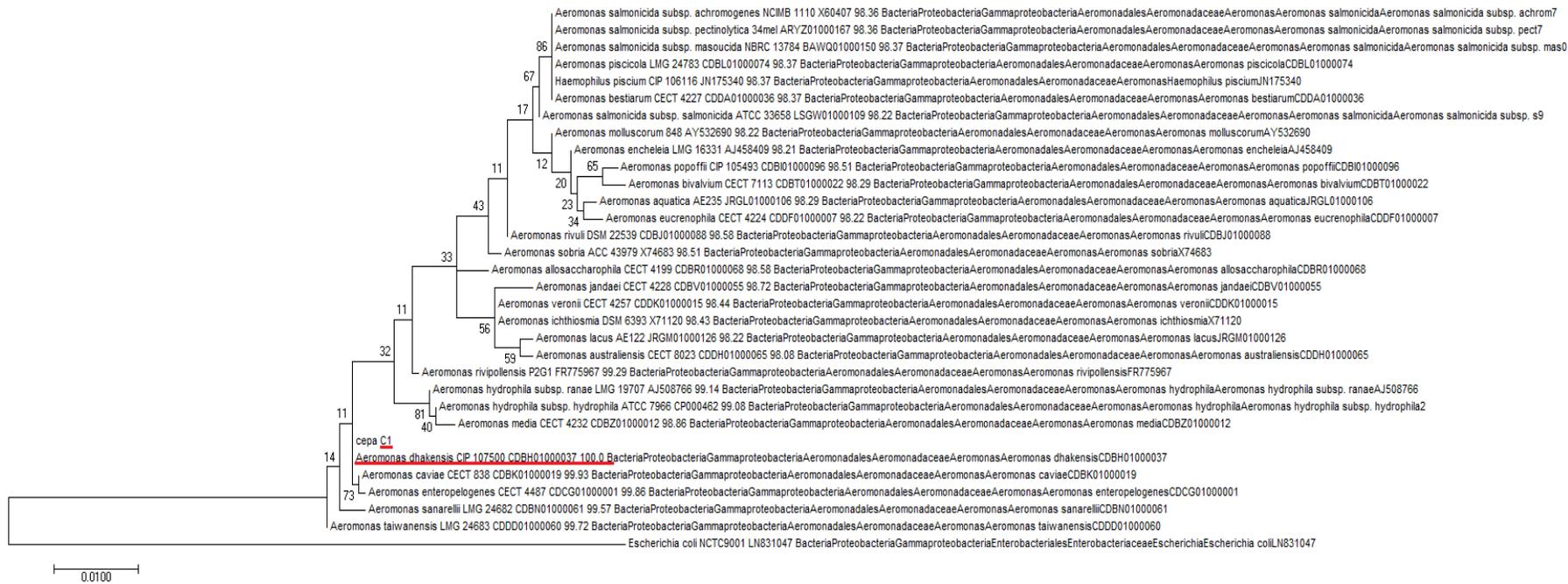
Procedimiento:

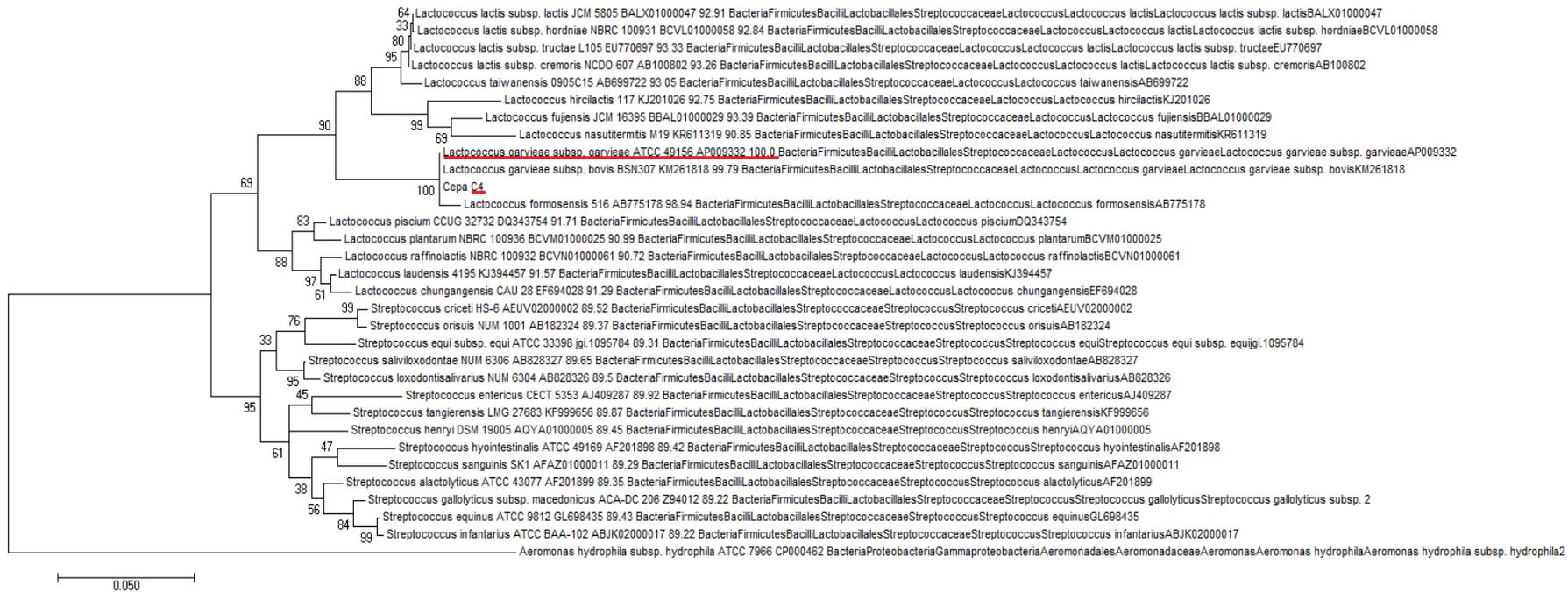
7. Hacer la solución de NaCl (100mL).
8. Hacer la solución de proteína concentrada con el kit, y luego preparar proteína diluida usando la solución de NaCl.
9. Hacer el BCA “*working agent*” :cumpliendo la relación $\frac{BCA-A}{BCA-B} = \frac{50}{1}$
10. Primero agregar la proteína para la curva estándar variando la concentración en cada celda, completar 20 µL con la solución de NaCl para cada celda, luego agregar en cada celda 20 µL de cada muestra con 200 µL del BCAWA.
11. Dejar reposar 30 minutos en el horno a 60°C o 2 horas a condiciones ambiente.
12. Leer la absorbancia a 562 nm.



ANEXO F

ÁRBOLES FILOGENÉTICOS















ANEXO G
TAXONOMÍA CEPAS AISLADAS

PORCENTAJE DEL GEN (%)	NOMBRE DEL TAXÓN	NOMBRE DE LA CEPA	SIMILARIDAD (%)	TAXONOMÍA	CULTIVO MIXTO / MEDIO / MÉTODO USADO
96	<i>Aeromonas dhakensis</i>	CIP 107500(T)	100	Bacteria;Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas	CCM (MCR) / MCR / WO ₃ cond. Microaerobias
96.4	<i>Lactococcus garvieae subsp. garvieae</i>	ATCC 49156(T)	99.86	Bacteria;Firmicutes; Bacilli;Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus; Lactococcus garvieae	CCMP (SF) / LB / α-FeOOH cond. Microaerobias
96	<i>Escherichia coli</i>	NCTC9001(T)	99.57	Bacteria;Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia	CCMP (FOI) / MCR / α-FeOOH cond. Microaerobias
96.1	<i>Paraclostridium benzoelyticum</i>	JC272(T)	100	Bacteria;Firmicutes; Clostridia;Clostridiales; Peptostreptococcaceae; Paraclostridium	CCMP (FO) / LB / α-FeOOH cond. Anaerobias
96.1	<i>Romboutsia lituseburensis</i>	ATCC 25759(T)	99.85	Bacteria;Firmicutes; Clostridia;Clostridiales; Peptostreptococcaceae; Romboutsia	CCMP (SF) / LB / α-FeOOH cond. Anaerobias
96.2	<i>Acinetobacter brisouii</i>	CIP 110357(T)	99.79	Bacteria;Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter;	CCMP (FOI) / MA / α-FeOOH cond. Anaerobias
96	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962(T)	99.93	Bacteria;Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas;	CCMP (FOI) / LB / α-FeOOH cond. Anaerobias