



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

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CULTIVOS AXÉNICOS
PARA UNA APLICACIÓN ELECTROGÉNICA EN CELDAS DE
COMBUSTIBLE MICROBIANAS

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: EVELYN MARIBEL GUAMÁN CHANGO

DIRECTORA: Ing. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

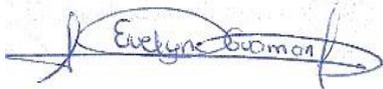
© 2022, Evelyn Maribel Guamán Chango

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

Yo, EVELYN MARIBEL GUAMÁN CHANGO, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 03 de mayo de 2022

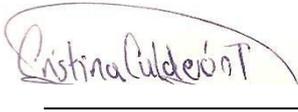
A handwritten signature in blue ink, reading "Evelyn Guaman", with a stylized flourish extending from the end.

Evelyn Maribel Guamán Chango

180514580-0

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; tipo: Proyecto de Investigación, **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CULTIVOS AXÉNICOS PARA UNA APLICACIÓN ELECTROGÉNICA EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS**, realizado por la señorita: **EVELYN MARIBEL GUAMÁN CHANGO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Juan Carlos González García PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-05-03
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-05-03
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-05-03

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en cada paso que doy y brindarme sabiduría para afrontar cada obstáculo de la manera más satisfactoria. A mis padres Carlos y Delia por su amor y apoyo absoluto en cada una de mis metas, siendo así un pilar fundamental en mi vida. A mi abuelita Julia por su impulso y motivación en los momentos difíciles. A mis hermanos Vinicio, Mónica y Stephanie por la motivación y apoyo.

Evelyn

AGRADECIMIENTO

A cada uno de los docentes que integran la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su contribución clave en mi formación profesional. A cada uno de los miembros del Grupo de Investigación y Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático (GIDAC) por su apoyo durante la investigación, en especial al Ing. Alex Guambo y Msc. Cristina Calderón por encaminarme en el transcurso de mi trabajo de titulación. A los integrantes que conforman el Laboratorio IDgen por los conocimientos brindados y su hospitalidad. Así como al PhD. Cesar Puentes gerente de la fábrica de curtiembre “El Alce” por brindar las facilidades para el muestreo de aguas contaminadas con cromo hexavalente.

Evelyn

TABLA DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Cultivos axénicos.....	4
1.1.1. <i>Bacterias electrogénicas</i>	4
1.2. Metabolismo de bacterias electrogénicas.....	4
1.2.1. <i>Mecanismo de transferencia de electrones</i>.....	5
1.2.1.1. <i>Transferencia directa de electrones al electrodo</i>	5
1.2.1.2. <i>Transferencia indirecta de electrones al electrodo</i>	6
1.3. Técnicas de aislamiento y caracterización de cultivos axénicos	6
1.3.1. <i>Procedimiento para el cultivo de microorganismos</i>	6
1.3.1.1. <i>Diluciones seriadas</i>	6
1.3.1.2. <i>Siembra por vertido en placa</i>	6
1.3.1.3. <i>Siembra por agotamiento</i>	6
1.3.2. <i>Métodos para la identificación de microorganismos</i>.....	7
1.3.2.1. <i>Métodos basados en criterios morfológicos</i>.....	7
1.3.2.2. <i>Métodos basados en tinción diferencial</i>	7
1.3.3. <i>Métodos basados en pruebas bioquímicas</i>	8
1.3.4. <i>Caracterización molecular</i>	9
1.3.4.1. <i>Fases de la identificación molecular</i>.....	9
1.4. Bioenergía.....	14
1.5. Sistemas Bioelectroquímicos.....	14
1.6. Celdas de combustible microbianas	15
1.6.1. <i>Componentes de la celda de combustible microbiana</i>.....	16

1.6.1.1.	<i>Ánodo</i>	16
1.6.1.2.	<i>Cátodo</i>	16
1.6.1.3.	<i>Membranas</i>	17
1.6.1.4.	<i>Conductor externo</i>	17
1.6.1.5.	<i>Sustratos</i>	17
1.6.2.	<i>Materiales de las Celdas de combustible microbiano (CCMs)</i>	18
1.6.3.	<i>Rendimiento de las Celdas de combustible Microbiano (CCMs)</i>	18
1.6.4.	<i>Factores que afectan la eficiencia de las celdas de combustible microbiano</i>	20
1.6.5.	<i>Configuración de celdas de combustible microbianas</i>	20
1.7.	Cromo	22
1.7.1.	<i>Fuentes</i>	22
1.7.2.	Efectos toxicológicos y medioambientales	22
1.7.2.1.	<i>Salud humana</i>	22
1.7.2.2.	<i>Medio ambiente</i>	23
1.7.3.	<i>Industria de Curtiembre</i>	23
1.7.4.	<i>Proceso de curtición en base de sales de cromo</i>	23
1.7.5.	<i>Aguas residuales producto de la industria curtiembre</i>	24
1.7.5.1.	<i>Sistemas de tratamientos para aguas residuales con cromo</i>	25

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	26
2.1.	Lugar de la investigación	26
2.2.	Diseño de la investigación	26
2.3.	Fases de la Investigación	27
2.4.	Tamaño y métodos de muestreo	27
2.4.1.	<i>Bacterias</i>	27
2.4.2.	<i>Agua residual</i>	27
2.5.	Obtención de bacterias electrogénicas	28
2.5.1.	<i>Reactivación del biofilm</i>	28
2.5.2.	<i>Aislamiento bacteriano</i>	28
2.6.	Caracterización bacteriana	28
2.6.1.	<i>Morfológica</i>	28
2.6.2.	<i>Bioquímica</i>	29
2.6.3.	<i>Pruebas de Tolerancia y Toxicidad</i>	30
2.6.4.	<i>Molecular</i>	31

2.6.4.1.	<i>Extracción y purificación de ADN</i>	31
2.6.4.2.	<i>Amplificación del ADN mediante la reacción de la polimerasa (PCR)</i>	32
2.6.4.3.	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	33
2.6.4.4.	<i>Secuenciación molecular</i>	33
2.6.4.5.	<i>Identificación molecular bacteriana</i>	33
2.7.	Producción de bioelectricidad	35
2.7.1.	Pruebas de ensayo	35
2.7.1.1.	<i>Limpieza de las CCMs para pruebas de ensayos</i>	35
2.7.1.2.	<i>Pretratamiento del ánodo y cátodo</i>	35
2.7.1.3.	<i>Montaje de las CCMs</i>	36
2.7.2.	Diseño y Construcción de las CCMs	37
2.7.3.	Operación de las CCMs	38
2.7.3.1.	<i>Sistema de bombeo</i>	38
2.7.3.2.	<i>Monitoreo de CCMs</i>	38
2.7.4.	Tratamiento del cromo hexavalente	39
2.7.4.1.	<i>Inóculos</i>	39
2.7.4.2.	<i>Sustratos</i>	39
2.7.4.3.	<i>Análisis de laboratorio</i>	39
2.8.	Materiales experimentales	40
2.9.	Planteamiento de hipótesis	41
2.9.1.	<i>Hipótesis Textual</i>	41
2.9.2.	<i>Hipótesis estadística</i>	41

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	Identificación bacteriana fenotípica y genotípica	42
3.1.1.	<i>Identificación fenotípica</i>	42
3.1.2.	<i>Identificación molecular</i>	43
3.1.2.1.	<i>Extracción y purificación de ADN bacteriano</i>	43
3.1.2.2.	<i>Amplificación del Gen ARNr 16S</i>	43
3.1.2.3.	<i>Secuenciación e identificación molecular</i>	44
3.2.	Pruebas de tolerancia y toxicidad	44
3.3.	Producción de bioelectricidad	45
3.3.1.	<i>Pruebas de ensayo</i>	45
3.3.2.	<i>Pruebas con CCMs de flujo continuo</i>	46

3.3.3.	<i>Remoción de contaminantes</i>	48
3.3.4.	<i>pH</i>	50
3.4.	Análisis Estadístico	50
3.4.1.	<i>Análisis de normalidad</i>	50
3.4.2.	<i>Prueba U de Mann-Whitney</i>	51
	CONCLUSIONES	53
	RECOMENDACIONES	54
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Identificación bacteria a nivel macroscópico y microscópico	7
Tabla 2-1:	Identificación bacteriana basada en métodos de tinción diferencial	8
Tabla 3-1:	Identificación bacteriana basada en pruebas bioquímicas	8
Tabla 4-1:	Reactivos empleados en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	11
Tabla 5-1:	Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
Tabla 6-1:	Base de datos que forma parte de la INSDC	14
Tabla 7-1:	Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos.....	15
Tabla 8-1:	Materiales de las Celdas de combustible microbiano (CCMs).....	18
Tabla 9-1:	Factores que inciden en la eficiencia de las CCMs.....	20
Tabla 10-1:	Proceso de curtición	24
Tabla 11-2:	Pruebas bioquímicas.....	29
Tabla 12-2:	Materiales y equipos empleados dentro de la investigación.....	40
Tabla 13-3:	Identificación bacteriana morfológica y bioquímica	42
Tabla 14-3:	Identificación molecular bacteriana.....	44
Tabla 15-3:	Pruebas de tolerancia y Toxicidad para Cr (VI), Zn y Pb.....	45
Tabla 16-3:	Análisis Físico-químico del agua residual del proceso de curtición.....	49
Tabla 17-3:	Análisis Físico-químico del agua residual sintética de Cr (VI)	49
Tabla 18-3:	Pruebas de normalidad : Kolmogorov-Smirnov ^a y Shapiro-Wilk.....	51
Tabla 19-3:	Rango de la Prueba U de Mann-Whitney	51
Tabla 20-3:	Prueba de hipótesis	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Mecanismos de transferencia de electrones de microorganismos electrogénicos.	5
Figura 2-1:	Fases de la extracción de ADN	10
Figura 3-1:	Electroforesis en gel de agarosa.....	12
Figura 4-1:	Electroferograma de la secuenciación de ADN	13
Figura 5-1:	Principio de funcionamiento de CCMs	16
Figura 6-1:	CCM con cámara única.....	21
Figura 7-1:	CCM de doble cámara.....	21
Figura 8-1:	CCM de flujo ascendente.....	22
Figura 9-2:	Estructura de las Pruebas de tolerancia y toxicidad	31
Figura 10-2:	Amplificación de ADN- PCR	32
Figura 11-2:	Electroforesis en gel de agarosa.....	33
Figura 12-2:	Electroferograma de las secuencias de ADN	34
Figura 13-2:	NCBI, A: Comparación de la secuencia consenso B: Determinación del microorganismo.....	34
Figura 14-2:	A: CCM de las pruebas de ensayo B: Limpieza de las CCMs.....	35
Figura 15-2:	A: Pre tratamiento del ánodo. B: Pre tratamiento del cátodo.....	36
Figura 16-2:	Monitoreo de las pruebas de ensayo	36
Figura 17-2:	Diseño de la CCM A: Diseño en tiempo real. B: Diseño en 3D	37
Figura 18-2:	Monitoreo de las CCMs A: Voltaje (mV) B: pH	38
Figura 19-3:	Análisis del ADN a través de NanoDrop One	43
Figura 20-3:	Electroforesis en gel de agarosa de los cultivos axénicos.	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2:	Diagrama de las fases de la investigación	27
Gráfico 2-3:	Voltajes de las pruebas de ensayo	46
Gráfico 3-3:	Voltaje generado por las CCMs	47
Gráfico 4-3:	Voltaje máximo generado en las CCMs con AR y AS.....	48
Gráfico 5-3:	pH de las CCM's	50

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN – IDGEN –MODIFICADO DE BARRENDERO (2008)
- ANEXO B:** ANÁLISIS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA
- ANEXO C:** ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL CRUDA DE LA INDUSTRIA DE CURTIEMBRE ANTES DE LAS CCMs
- ANEXO D:** ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL CRUDA DE LA INDUSTRIA DE CURTIEMBRE DESPUÉS DE LAS CCMs
- ANEXO E:** ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA DESPUÉS DE LAS CCMs
- ANEXO F:** MEDICIÓN DE VOLTAJE DE LAS CCMs DE FLUJO CONTINUO

ÍNDICE ABREVIATURAS

GEI	Gases de efecto invernadero
CCMs	Celdas de Combustible Microbiano
ITS	Espaciador intergénico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
dNTPs	Deoxinucleótidos tri-fosfato
ddNTPs	Dideoxinucleótidos tri-fosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DQO	Demanda Química de Oxígeno
RVC	Carbón vítreo reticulado
SBE	Sistemas Bioelectroquímicos
CEM	Membrana de Intercambio catiónico
AEM	Membranas De Intercambio Aniónico
BPM	Membranas Bipolares
PEM	Membrana de intercambio protónico
DP	Densidad de potencia
EC	Eficiencia coulombica
RI	Resistencia interna
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
INSDC	International Nucleotide Sequence Database Collaboration

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente cultivos axénicos para desarrollar una aplicación electrogénica relacionada a la remoción de cromo hexavalente (VI) en aguas residuales de la Industria de Curtiembre " El Alce" cantón Guano, provincia de Chimborazo; y generar voltaje de corriente directa de manera simultánea a través de celdas de combustible microbianas (CCMs). Para la selección de la bacteria como inóculo se realizaron pruebas de tolerancia y toxicidad frente al Cr, Pb y Zn. Para la remoción de contaminantes y generación de bioelectricidad se diseñó y se construyó seis celdas de combustible microbianas (CCMs) de cámara simple, con un volumen de 400 ml que operaron con un flujo continuo de 24 horas, las CCMs se distribuyeron de la siguiente manera: tres para el agua residual industrial cruda (AR) y tres para el agua residual sintética (AS). Para monitorear el voltaje generado (mV) se instaló un sistema de monitoreo, durante 15 días, además, se utilizó una mini bomba de diafragma para mantener el flujo continuo de 24 horas. Mediante técnicas moleculares se logró identificar las bacterias: *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas geniculate*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Citrobacter freundii* y se seleccionó *Delftia acidovorans* como inóculo dada su capacidad de resistir y remover Cr (VI). Las CCMs con AR produjeron un porcentaje de reducción de DBO, DQO y Cr (VI) de 75,20%, 74,82% y 50 % respectivamente, con respecto al AS se redujo un 81,30% en un periodo de 15 días en ambos casos. Además, con respecto al voltaje, las CCMs AR2 y AS2 generaron un voltaje máximo de 395,63 mV y 224,39 mV correspondientemente. Se sugiere plantear estudios relacionados a la sinergia entre métodos convencionales y CCMs para el tratamiento de aguas residuales.

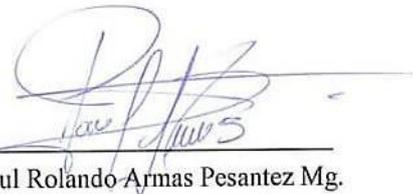
Palabras clave: <BIOELECTRICIDAD>, <CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS (CCMs)>, <CROMO>, <MICROORGANISMOS>, <SECUENCIACIÓN GENÉTICA >.



ABSTRACT

The aim of the current research was to characterize axenic cultures in a molecular way to develop an electrogenic application related to the removal of hexavalent chromium (VI) in wastewater from "El Alce" Tannery Industry, located in Guano county, Chimborazo province to generate direct current voltage simultaneously through microbial fuel cells (MFCs). For the selection of the bacterium as inoculum, tolerance and toxicity tests for Cr, Pb and Zn were carried out. For the removal of contaminants and generation of bioelectricity, six single-chamber microbial fuel cells (MFCs) with a volume of 400 ml were designed and constructed, which worked with a 24-hour continuous flow, the MFCs were distributed as follows: three for raw industrial wastewater (RW) and three for synthetic wastewater (SW). To monitor the generated voltage (mV), a monitoring system was installed during 15 days; in addition, a mini diaphragm pump was used to maintain the 24-hour continuous flow. Molecular techniques were used to identify the following bacteria: *Delfia acidovorans*, *Pseudomonas geniculata*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Citrobacter freundii*. *Delfia acidovorans* was selected as inoculum due to its ability to resist and remove Cr (VI). The MFCs with RW produced a reduction percentage for BOD, COD and Cr (VI) of 75.20%, 74.82% and 50% respectively; regarding the SW, it was reduced by 81.30% in a 15-day period in both cases. In addition, regarding voltage, RW2 and SW2 MFCs generated a maximum voltage of 395.63 mV and 224.39 mV respectively. Thus, it is recommended to propose studies related to the synergy between conventional methods and MFCs for wastewater treatment.

Keywords: <BIOELECTRICITY>, <MICROBIAN FUEL CELLS (MFCs)>, <CHROMIUM>, <MICROORGANISMS>, <GENETIC SEQUENCING>.



Lic. Paul Rolando Armas Pesantez Mg.

060328987-7

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de las necesidades humanas a nivel global ha impulsado el crecimiento paralelo de la manufactura y con ello el progresivo aumento del consumo de energía. La combustión de fuentes fósiles para la producción de energía eléctrica genera gases de efecto invernadero (GEI), estos a su vez conducen al deterioro ambiental y al cambio climático (Umbarila et al., 2015: p. 231). La crisis energética mundial que hoy en día se vive, no solo se debe por la falta de tecnologías, políticas y planificación o un acceso restringido a las mismas; sino también al consumo de combustibles fósiles que magnifica la contaminación de los ambientes debido a la dependencia, las metodologías ineficientes y los conflictos de intereses de actores con poder diferencial (Nogar y Flensburg, 2016).

Además, el aumento demográfico ha desatado un alto índice de contaminación de los cuerpos hídricos; una de las causas es el vertido incontrolado del sector industrial que en su mayoría no cuentan con sistemas colectores de aguas residuales que posibiliten una remoción eficiente de la carga contaminante de los efluentes (Castiblanco y Perilla, 2019: pp. 7-8). Procesos industriales tales como el cromado electrolítico, curtido de pieles, aleación de metales, conservación de madera y fabricación de colorantes y pigmentos utilizan en sus procesos cromo hexavalente, ya que posee propiedades ácidas y una capacidad de formar sales coloreadas e insolubles.

En el caso de la industria de curtido de piel se emplea el Cr (VI), puesto que genera un curtido más uniforme con una mayor superficie en un periodo de tiempo corto en comparación con las sales de aluminio y dióxido de silicio (SiO_2); estos compuestos hacen que el material se hinche y se forme cueros duros, con menor resistencia al desgarre respectivamente (Chávez, 2010, p.43). Sin embargo, a pesar de los beneficios que aporta a este sector productivo, también es un contaminante tóxico en concentraciones altas, y en tiempos de exposición prolongados ocasiona efectos agudos y crónicos tales como irritación en la piel y en la mucosa nasal, debilitación del sistema inmune, daños en hígado y riñones e incluso cáncer de pulmón y la muerte (Cabrera, 2017, pp. 16-20). En Guano existen industrias de curtiembres cuyas aguas residuales se depositan sobre fuentes naturales de agua como los ríos, constituyéndose en un problema ambiental debido al desconocimiento en gran medida de la utilización de Cr, que en los procesos de curtido acelera la movilidad de este, excediendo las tasas del ciclo natural renovable (Arun et al., 2020).

En este contexto, es de gran importancia dedicar esfuerzos en corregir este tipo de problemática, puesto que con frecuencia varias de las tecnologías de purificación de agua no sólo se realizan químicamente, sino que también son energética y operacionalmente costosas (Revelo et al., 2013: p.24).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas las investigaciones se han centrado en sustituir la dependencia creciente de combustibles de origen fósil en fuentes de energías limpias con eficiencia similar, favoreciendo a la reducción de emisiones tóxicas al ambiente, buscando iniciativas de generación energética renovable vinculadas al tratamiento de residuos y biorremediación de contaminantes (Guambo, et al., 2016).

Así nace la necesidad de investigar un método más robusto y sostenible; y las Celdas de Combustible Microbianas son una tecnología emergente que contribuye a solucionar dos de los problemas más críticos que afronta la sociedad actual: la crisis energética y la disponibilidad de agua no contaminada (Revelo et al., 2013: p. 24).

Las CCMs son consideradas como una de las tecnologías propicias para la producción de energía sostenible, dado que además de emplear la reacción electroquímica entre el hidrógeno del sustrato y el oxígeno del aire para producir electricidad, agua y calor, posee una alta flexibilidad para aceptar gran variedad de sustratos como desechos orgánicos, complejos solubles o disueltos, metales pesados y biomasa (Morales y Cabrera, 2006, p.141).

La importancia de esta investigación radica en la caracterización molecular de cultivos axénicos de *Delftia acidovorans*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Citrobacter freundii*, *Providencia alcalifaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, resultantes de una biopelícula formada en una CCM; inóculo proveniente de suelo alto andino ubicado en la parroquia Villa La Unión, Cantón Colta, provincia de Chimborazo, constatando sus características y funcionalidades mediante ensayos de pruebas bioquímicas, permitieron determinar su aplicabilidad y eficiencia en un sistema de tratamiento de aguas residuales contaminadas con Cromo (VI) de una Industria de Curtiembre del Cantón Guano.

Por ello es evidente la importancia tanto del aislamiento bacteriano como de herramientas de identificación molecular para la caracterización de microorganismos, dado que estos últimos brindan una total veracidad en sus resultados, permitiendo así establecer una técnica fija para su uso y aplicación de acuerdo a los requerimientos nutricionales, metabólicos y condiciones del medio.

En relación con lo antes mencionado dicha tecnología tiene como principio de funcionamiento la utilización del metabolismo de microorganismos electrogénicos para generar bioenergía a partir de la reducción de los diferentes tipos de contaminante como por ejemplo las aguas residuales; por tanto se perfilan como una solución a los problemas ambientales ocasionados por las descargas incontrolada de efluentes industriales a cuerpos hídricos, así como al cambio de la matriz energética del país (Logan, 2009, p. 375-381).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Caracterizar molecularmente cultivos axénicos para establecer una aplicación electrogénica en celdas de combustible microbianas, relacionada a remoción de cromo (VI) en aguas residuales de una Industria de Curtiembre.

Objetivos Específicos

- Identificar bacterias provenientes de cultivos axénicos mediante técnicas moleculares.
- Construir celdas de combustible microbianas de configuración simple con propósitos bioelectrogénicos.
- Aplicar y monitorear las bacterias identificadas en la remoción de cromo (VI) en agua residual de una Industria de Curtiembre dentro de Celdas de Combustible Microbianas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Cultivos axénicos

Los cultivos axénicos o puros son aquellos que provienen de una sola célula. En ambientes naturales los microorganismos se encuentran generalmente como comunidades mixtas. Por tanto, es de vital importancia la implementación de técnicas de aislamiento, las cuales consisten en separar los diferentes tipos de microorganismos de un cultivo mixto hasta obtener cultivos axénicos para así poder identificarlos, caracterizarlos y emplearlos en investigaciones de diferentes áreas de interés (Cornejo, 2017, pp. 20-21).

1.1.1. Bacterias electrogénicas

Las bacterias electrogénicas o también denominados exoelectrógenos son una clase de microorganismos que, en condiciones anaeróbicas o microaeróbicas, tienen la capacidad de generar electricidad transfiriendo electrones procedentes de su metabolismo a un aceptor terminal de electrones extracelular, incluyendo electrodos, minerales de óxido y otras bacterias (Redondo, 2018, p.18).

A través de este mecanismo, algunos microorganismos obtienen energía para su crecimiento y comunicación de célula a célula para las interacciones sintróficas esenciales dentro de las comunidades microbianas (Tahernia, 2020, p.29439).

Entre las bacterias estudiadas por su capacidad de bioelectrogénesis, destacan los géneros *Shewanella* y principalmente *Geobacter*, dado que posee una amplia gama de aceptores terminales de electrones. De hecho *G. sulfurreducens* posee una mayor habilidad de producir una alta densidad de corriente en cultivos puros y mixtos convirtiéndolo así, en el representante de los microorganismos electrogénicos (Redondo, 2018, pp.19-21).

1.2. Metabolismo de bacterias electrogénicas

En términos generales, el metabolismo celular de los microorganismos para degradar los contaminantes depende de la forma de obtención de energía y nutrientes, en este caso el metabolismo celular de los microorganismos electrogénicos es quimioorganótrofo anaerobio, es decir, utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono para su crecimiento y desarrollo (Romero et al., 2012, p. 120).

En este contexto se toma como ejemplo el metabolismo del género *Geobacter*, el cual es el microorganismo representativo de este tipo de bacterias, donde para obtener los electrones utilizan la respiración e internamente aplican el ciclo Krebs, donde se desarrolla una sucesión de reacciones químicas que oxidan completamente la materia orgánica hasta producir dióxido de carbono, agua, electrones y ATP. Además, la red de proteínas denominadas citocromos tipo c, se encuentran distribuidas entre la membrana interna, periplasma y membrana externa que permiten la transferencia de electrones desde el citoplasma hacia el exterior de la célula para respirar sustratos extracelulares como Fe (III), de la misma manera, actúa como un capacitor almacenando energía para mantener la célula activa en su búsqueda de nuevos aceptores de electrones (Núñez, 2008, p-35).

1.2.1. Mecanismo de transferencia de electrones

En términos generales se distingue dos mecanismos de transferencia de electrones: directo e indirecto. Cabe recalcar que estos mecanismos no son excluyentes entre sí, por ende, los microorganismos pueden usar ambos simultáneamente (Figura 1-1).

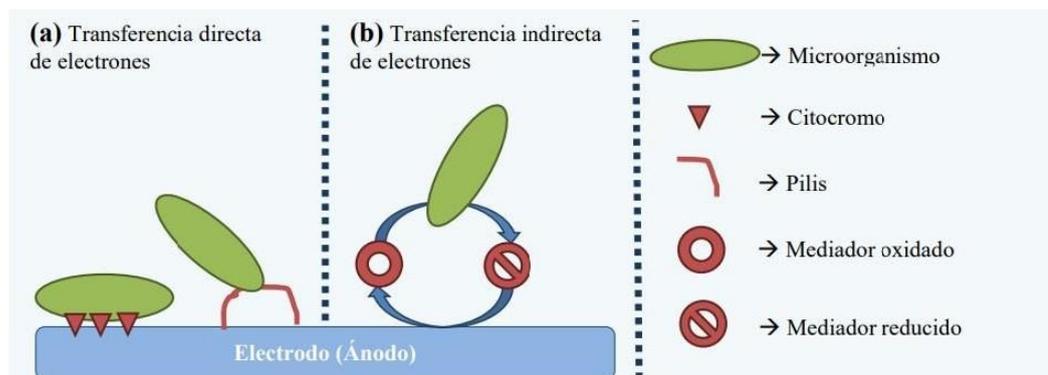


Figura 1-1: Mecanismos de transferencia de electrones de microorganismos electrogénicos.

Fuente: Cornejo, 2017, p.17.

1.2.1.1. Transferencia directa de electrones al electrodo

Las bacterias electrogénicas son capaces de reaccionar de forma directa con el electrodo, debido a que cuentan con un mecanismo donde están implicados transportadores de electrones unidos a la membrana que expanden la cadena de electrones desde la membrana interna hasta el ambiente extracelular y por tanto no requieren de mediadores para liberarlos, este proceso está mediado por la presencia de los citocromos tipo C, mismos que se encuentran en la membrana externa como parte de la cadena de transporte electrónico, un claro ejemplo es el género *Geobacter* (Redondo, 2018, p. 23).

1.2.1.2. Transferencia indirecta de electrones al electrodo

Las bacterias electrogénicas son capaces de producir sus propios mediadores redox, los cuales son secretados al medio y reaccionan con el electrodo. Es decir, los mediadores redox que pueden ser sustancias solubles o insolubles son reducidos por los microorganismos y se oxidan en el electrodo. Por ejemplo, *Shewanella oneidensis* produce flavinas para la reducción de los óxidos de Fe (III) (Redondo, 2018, pp.22-23).

1.3. Técnicas de aislamiento y caracterización de cultivos axénicos

1.3.1. Procedimiento para el cultivo de microorganismos

1.3.1.1. Diluciones seriadas

La dilución seriada es un procedimiento que consiste en reducir la concentración de una sustancia en otra de manera consecutiva; donde se toma 1 ml de la muestra y coloca en un tubo que contiene 9 ml de solución diluyente, esa es la dilución 10^{-1} , posteriormente se toma 1 ml de este tubo y se coloca en otro que contenga 9 ml de solución diluyente, esta es la dilución 10^{-2} y así sucesivamente. Permitiéndonos tanto sembrar cantidades conocidas de las mismas en una serie paralela de cajas Petri, como evaluar el número de bacterias viables en la muestra original al conocer el número de colonias, la cantidad sembrada y la dilución correspondiente (Negroni, 2009, p.557).

1.3.1.2. Siembra por vertido en placa

Esta técnica consiste en la suspensión de microorganismos sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, cuyo inóculo debe estar previamente diluido, se emplea movimientos en todos los sentidos, con el fin de conseguir una distribución homogénea sobre la superficie del agar, todo este proceso se debe desarrollar sobre una superficie plana y sin levantar la caja. Se emplea para conocer las unidades formadoras de colonias (UFC), dado que es más fácil observar reacciones metabólicas bacterianas, tales como lipólisis, proteólisis y fermentaciones (Gómez y Acevedo, 2001, p.39).

1.3.1.3. Siembra por agotamiento

El método más empleado es el agotamiento por estría, el cual consiste en la separación e inmovilización de microorganismos de manera progresiva y continua sobre la superficie del

medio nutritivo solidificado, para ello se utiliza un asa para sembrar el inóculo. A medida que se realizan las estrías, los microorganismos pasan al medio en un número cada vez menor, es decir, en las estrías iniciales se observará un crecimiento mixto de bacterias, mientras que en las últimas estrías existirá colonias bien aisladas que van a constituir un cultivo puro (Negroni, 2009, p.557).

1.3.2. Métodos para la identificación de microorganismos

1.3.2.1. Métodos basados en criterios morfológicos

Son métodos que utilizan características estructurales de los microorganismos para poder distinguir a un microorganismo de otro, tanto a nivel microscópico por la presencia de diferentes organelos, como macroscópico por su tamaño, forma, superficie, borde (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Identificación bacteria a nivel macroscópico y microscópico.

MACROSCÓPICA	
Forma	Circular, irregular, filamentosa, rizoidal, puntiforme, fusiforme.
Elevación	Plana y extendida, elevada y limitada, convexa, umbilicada.
Superficie	Lisa, plegada, sectorizada, cerebroide, con surcos radiales
Borde	Entero, Ondulado, Lobulado, filamentoso
Luz	Translúcida, opaca
MICROSCÓPICAS	
Forma celular	-Cocos: diplococos, estreptococos, estafilococos, tétradas, sarcinas. -Bacilos: diplobacilos, estreptobacilos, empalizada. -Espirilos: vibrios, espiroqueta, espirilo.
Estructuras	Esporas, flagelos, cilios, capsula

Fuente: Forbes, B. et al., 2009

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.3.2.2. Métodos basados en tinción diferencial

En este método se emplea más de un colorante y sirven para poner de manifiesto las características de afinidad por ciertos colorantes de microorganismos. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción. En la tabla 2-1 se observa los tipos de tinciones diferenciales:

Tabla 2-1: Identificación bacteriana basada en métodos de tinción diferencial.

Método	Fundamento	Resultado
Tinción Gram	Esta técnica permite clasificar a los microorganismos en dos grandes grupos: Gram positivos y Gram negativos. Se basa en la composición y estructura de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo.	Las bacterias se tiñen de color rojo-rosa (Gram negativas:), mientras que si permanecen de color azul-violeta (Gram positivas)
Tinción de Ziehl Neelsen o ácido resistente	Técnica donde se emplea el calor para solubilizar ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular con el fin de obtener una mayor penetración del colorante primario (carbolfucsina) y formar complejos con el colorante; de esta manera se puede distinguir las bacterias que resisten dicha coloración.	Las bacterias ácido-alcohol resistentes positivas mantienen color rosa intenso, mientras que las bacterias ácido-alcohol resistentes negativas se tiñen de azul
Tinción de Kinyoun	Es una técnica modificada de la tinción de Ziehl Neelsen se denomina "método frío", dado que utiliza un detergente tensoactivo como el tergitol, en lugar de tratamiento con calor. Esta coloración permite una tinción más rápida que el clásico procedimiento y evita la necesidad de calentamiento.	Bacterias ácido-alcohol resistentes positivas mantienen color rosa intenso, mientras que las bacterias ácido-alcohol resistentes negativas se tiñen de azul

Fuente: González et al., 2020

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.3.3. Métodos basados en pruebas bioquímicas

Las propiedades nutricionales y metabólicas de un aislamiento bacteriano son los parámetros más empleados para establecer el género y especie de un microorganismo. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, degradar compuestos, gracias a la presencia de enzimas (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Identificación bacteriana basada en pruebas bioquímicas

TÉCNICAS	FUNDAMENTO	RESULTADOS
PRUEBA DE LA CATALASA	La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas.	Formación inmediata de una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas (positivo).
PRUEBA DE LA OXIDASA	Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteria.	Cambio de color a púrpura en 10 - 20 segundos (Positivo).

PRUEBA DE LA UREASA	Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando una molécula de dióxido de carbono y dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.	Las bacterias que hidrolizan la urea hacen que el medio de cultivo tome color fucsia, debido a la alcalinización del mismo por producción de amonio(Positivo).
PRUEBA DE SIM	Es un medio semisólido destinado para verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos. Es útil para diferenciar miembros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra (Positivo).
PRUEBA KLIGLER	Permite la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de hidratos de carbono y a la producción de ácido sulfhídrico. Además, determina la producción o no de gases: CO ₂ e H ₂ como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono.	Una coloración amarillo=acidez; rosa= alcalinidad; negro = SH ₂ ; por otro lado si presenta fractura o desplazamiento del medio se debe a la presencia de gases.
PRUEBA COAGULASA	Permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar <i>S. aureus</i> (coagulasa positiva) de otras especies de <i>Staphylococcus</i> .	Formación de grumos al añadir gotas de suero fisiológico (Positivo)
PRUEBA CAMP	Determina la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP (factor de monofosfato de adenina cíclica). Es una prueba presuntiva de identificación del <i>Staphylococcus</i> β – hemolítico del grupo B, de otras especies de <i>Staphylococcus</i> .	La presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías, (Positivo).
PRUEBA CITRATO DE SIMMONS	Medio de cultivo diferencial para la identificación de bacilos Gram negativos según su capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono y el amonio como fuente de nitrógeno.	El cultivo presenta un viraje de pH dado a la alcalinidad, por ende cambia de color de verde a azul (Positivo).
PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS	Se basa en la capacidad de determinadas especies bacterianas de lisarse en presencia de sales biliares, las más utilizadas de las cuales son el taurocolato y el desoxicolato de sodio. Ambas provocan un descenso de la tensión superficial, que, unido a la actuación de enzimas autolíticas, destruyen la célula	Las cepas en las que la suspensión en el tubo se torna clara en la prueba de solubilidad en bilis deben ser notificadas como “solubles en bilis.”

Fuente: Forbes, B. et al., 2009

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.3.4. Caracterización molecular

1.3.4.1. Fases de la identificación molecular

- **Extracción y purificación de ADN**

La extracción y purificación de ADN de un cultivo axénico es el primer paso para la identificación de bacterias. Para este proceso se debe considerar que el tipo de protocolo o kit comercial que se va a aplicar va a depender del tipo de muestra a tratar. En la actualidad existen protocolos estandarizados y kits comerciales, siendo estos últimos, la mejor opción debido a que brindan fragmentos de ADN con mayor integridad y pureza en un corto tiempo (Carrasco et al., 2020, p. 163). Según Pinilla (2019) este proceso abarca los siguientes pasos de forma consecutiva (Figura 2-1):

- **Lisis celular:** Se basa en la ruptura de la pared y membrana celular para lo cual se emplea detergentes anódicos como SDS (dodecil sulfato de sodio) que provoca una acción desnaturante en las proteínas; agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiamino tetracético) que inhibe la acción de las ADNasas.
- **Remoción de proteínas:** A continuación, el ADN liberado debe ser separado de contaminantes como proteínas y lípidos, a través de tratamientos con proteasas como la proteinasa K. El uso de solventes orgánicos como el fenol y cloroformo es de vital importancia dado que son desnaturantes activos de proteínas, lo que contribuye a que se resuspendan en la solución. Además, el uso de ciclos de centrifugación genera una fase acuosa (ADN), orgánica y una interfase (proteínas y nucleasas).
- **Precipitación del ADN:** Se emplea alcoholes como isopropanol y etanol absoluto estos compuestos precipitan selectivamente el ADN. Los residuos de las diferentes fases del proceso se eliminan con un lavado con etanol al 70%.
- **Hidratación del ADN:** Finalmente el ADN se hidrata en una solución Tris-EDTA permitiendo su conservación para posteriores análisis.

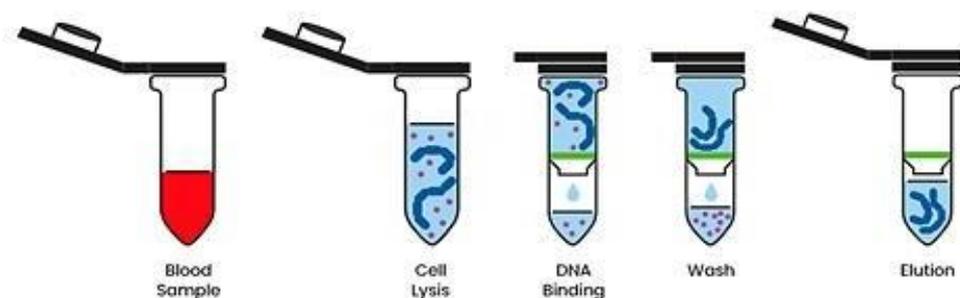


Figura 2-1: Fases de la extracción de ADN.

Fuente: Mulero P, 2019.

• **Amplificación de ADN**

La replicación de ADN es un proceso fundamental que se desarrolla de forma natural dentro de todo organismo vivo, con el fin de transmitir información genética de generación en generación.

Este proceso genera dos hebras hijas complementarias a partir de cada una de las hebras parentales de una molécula de ADN, se lleva a cabo gracias a la capacidad de complementariedad de las bases nitrogenadas y la acción de proteínas y enzimas (Castro et al., 2014, p.17).

El método para sintetizar ADN de manera *in vitro* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica millones de copias de ADN con gran exactitud y rapidez a partir de un fragmento de ADN molde. Los componentes que interactúan entre sí en la PCR se describen en la Tabla 4-1:

Tabla 4-1: Reactivos empleados en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Reactivos	Acción
ADN genómico	Cadena molde mismo que debe estar en la concentración y pureza adecuada.
<i>Taq</i> polimerasa:	Es una enzima proveniente de la bacteria termófila llamada <i>Thermus aquaticus</i> , la cual vive en condiciones de temperatura muy altas, sintetiza las nuevas cadenas de ADN.
Primers:	Son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanca que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad óptima de G-C debe ser del 50% de la secuencia.
Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)	Son bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina(C) con los que la <i>Taq</i> polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN.
Ión magnesio (Mg +)	Cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, concentración oscila entre 0.5 y 2.5 Mm
Solución amortiguadora	Buffer (Tris-HCl) que se emplea para controlar el pH=8 de la mezcla.
Agua desionizado estéril	Agua ultrapura libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Fuente: Tamay et al., 2013

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

Un punto clave en la amplificación es la pureza de la molécula de ADN extraída del cultivo, esto se mide a través de espectrofotometría. El ADN absorbe luz ultravioleta (UV) a 260 nm lo que indica la concentración de los ácidos nucleicos; a una absorbancia de 230nm (sales, alcoholes, fenoles) y 280nm (proteínas) indica la presencia de contaminantes. Los valores óptimos varían entre 2 a 2.2 para la relación 260/230 y 1.80 a 2.0 para la relación de absorbancia de 260 /280 (Velázquez et al., 2014, p.14).

La PCR amplifica la secuencia a estudio de manera exponencial con alrededor de 20-40 ciclos, mediante el termociclador que efectúa los cambios de temperatura, permitiendo la amplificación del ADN en las etapas descritas en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Etapa	Descripción	T (°C)	Tiempo (sg)
Desnaturalización	Las cadenas de ADN son calentadas y separadas.	95	30
Hibridación	Los primers se alinean al extremo 3 previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria	50-60	30
Extensión	La Taq polimerasa cataliza la reacción añadiendo dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN.	72	45

Fuente: Tamay et al., 2013

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Es una técnica empleada en separar e identificar fragmentos de ADN a lo largo de un gel de agarosa mediante la aplicación de una carga de voltaje que hace que el ADN con carga negativa otorgada por los grupos fosfatos migre al polo positivo. Este proceso se lo realiza bajo un buffer ya sea TAE (Tris-acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA), así como del Bromuro de etidio que se intercala en las moléculas de ADN permitiendo su visualización de los amplicones gracias a la luz UV (Tamay et el, 2013, p.73). Evalúa la integridad de ADN extraído de cultivos axénicos y verifica la amplificación de ADN obtenido de la PCR (Figura 3-1).

La concentración del gel de agarosa se basa en la relación con la movilidad del ADN y la concentración del gel, es decir a mayor concentración menor grado de separación de la molecular el ADN. De la misma manera al elevar el voltaje ocasiona un decrecimiento en la separación de los fragmentos de ADN (Concepción y Ureña, 2005, p.24-26).

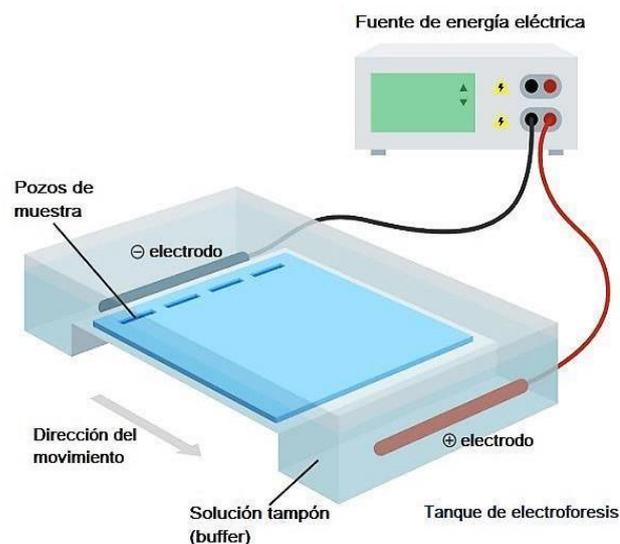


Figura 3-1: Electroforesis en gel de agarosa

Realizado por: Parada R, 2020.

- **Secuenciación de ADN**

Consiste en determinar el orden de las bases nitrogenadas de una molécula de ADN purificado. Para ello se emplea la técnica enzimática de Sanger que se basa en el mecanismo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo, en este método además de los deoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) encargados de la formación de enlaces fosfodiéster que enlazan las bases nucleotídicas sintetizadas por la ADN polimerasa, aprovecha las características de los dideoxinucleótidos tri-fosfato (ddNTPs), mismos que son análogos químicos a los (dNTPs) (Gutiérrez. S, 2006, p.261).

Los (ddNTPs) carecen de un grupo hidroxilo 3' terminal en su desoxirribosa y cuando se incorporan a una cadena en crecimiento, da por terminado su amplificación, dando como resultado fragmentos de diferente longitud. Cabe recalcar que cada uno de los dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) están marcados por diferentes colores fluorescentes para separarlos y analizarlos de manera manual o automática con el fin de determinar la calidad de la secuencia de ADN a través de la visualización de electroferogramas (Cornejo et al.,2014, pp. 232-233) (Figura 4-1).

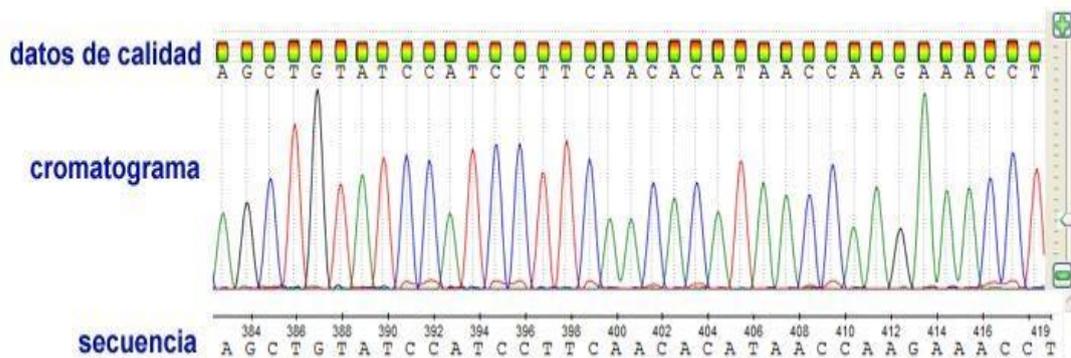


Figura 4-1: Electroferograma de la secuenciación de ADN.

Fuente: Soria M, 2016

- **Comparación de secuencias**

Existen varias bases de datos de genes de microorganismos conocidos, que se emplea para comparar las secuencias obtenidas, brindando, así como resultado una secuencia con mayor porcentaje de similitud a la secuencia de estudio (Tabla 6-1).

La base de datos GenBank es de libre acceso y pertenece a la National Institutes of Health (NIH), una colección de todas las secuencias de ADN disponibles posee una colección de secuencias nucleotídicas y de traducción de proteínas, la cual está enlazada a una herramienta llamada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Carrasco et al., 2020, pp. 172-173).

Tabla 6-1: Base de datos que forma parte de la INSDC

Base de datos	Identificación
BLAST	Identificación molecular de microorganismos
EMBL	Identificación molecular de microorganismos
CNGBdb	Identificación molecular de microorganismos
EzBioCloud	Identificación molecular de bacterias
Bac Dive	Información de clasificación taxonómica, fisiología, cultivo y origen
YeastIP	Identificación molecular de levaduras
TrichOKEY	Identificación molecular y morfológica de <i>Trichoderma spp.</i>
Mycobank	Identificación de hongos

Fuente: Carrasco et al., 2020

Modificado por: Guamán, Evelyn, 2022.

Con respecto al porcentaje de similitud debe ser superior al 97% para asignar a la misma especie; 95% y 80% para asignar al mismo género, y filo respectivamente (Zhi et al., 2014, pp. 461-468).

1.4. Bioenergía

Hace referencia a la energía renovable que se genera a partir de numerosas fuentes biológicas. Existen diversas tecnologías que se enfocan en la energía acumulada de desechos orgánicos tales como: la metanogénesis, el biohidrógeno y la bioelectricidad. En las últimas décadas la bioelectricidad ha tenido un creciente interés debido a su potencial eléctrico por una variedad de procesos biológicos de microorganismos, dando como resultado de manera simultánea la biorremediación de un medio y el almacenamiento de energía eléctrica (Logan et al., 2006, p. 5183).

1.5. Sistemas Bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos son tecnologías emergentes que se basan en la capacidad de algunos microorganismos para catalizar diferentes reacciones electroquímicas, específicamente, reacciones que involucren una transferencia de electrones, como las de óxido-reducción con el objetivo de estimular y modificar el metabolismo (Rabaey et al., 2007, pp. 9-10).

Según su modo de operación y de su aplicación se clasifican en cuatro grandes categorías, que se describen en la Tabla 7-1.

Tabla 7-1: Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos.

Tipo	Aplicación
Celdas de electrólisis microbiana (CCM)	Generación de energía eléctrica
Celdas de electrólisis microbiana (CEM)	Generación de compuestos químicos inorgánicos como el hidrógeno.
Celdas de electrosíntesis microbiana (CESM)	Síntesis de compuestos químicos orgánicos
Celdas de desalinización microbiana (CDM)	Desalinización del agua en combinación con otras funciones

Fuente: Wang & Ren, 2013

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.6. Celdas de combustible microbianas

Las celdas de combustible microbianas (CCMs) son instrumentos electroquímicos que convierten la energía química almacenada de una amplia gama de compuestos orgánicos solubles o disueltos en energía eléctrica a través de las reacciones catalíticas de microorganismos (Zhuwei et al., 2007, p. 465).

Entre las ventajas que brinda el uso de CCMs se destacan que operan de manera eficiente a temperatura ambiente, sin generación de ruido; libera menor cantidad de dióxido de carbono (CO_2) que cualquier otra tecnología actual para generar energía.

Cuentan con una cámara anódica (anaeróbica) y catódica (aeróbica) separada por una membrana de intercambio de protones. En la cámara anódica los microorganismos oxidan los compuestos orgánicos liberando protones, CO_2 y electrones, estos últimos son absorbidos por el ánodo y son transportados al cátodo a través de un circuito externo, donde se combinan con el oxígeno para formar agua y energía (Revelo et al., 2013, p.19). En la figura 5-1 se representa el principio de funcionamiento de las CCMs.

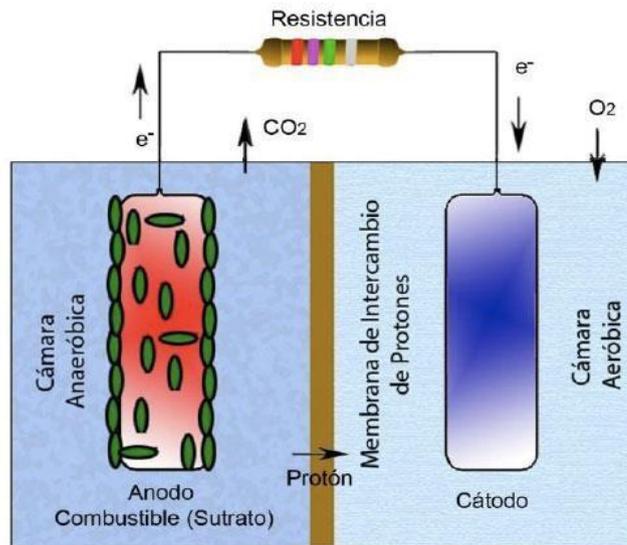


Figura 5-1: Principio de funcionamiento de CCMs.

Fuente: Revelo et al., 2013, p. 19

1.6.1. Componentes de la celda de combustible microbiana

1.6.1.1. Ánodo

El ánodo es la zona donde se lleva a cabo la adhesión de los microorganismos para la formación de la biopelícula, por consecuencia se efectúa la oxidación del sustrato. Por tanto, el ánodo debe poseer unas determinadas características para su correcto funcionamiento tales como: buena conductividad eléctrica para la transferencia de la carga y una buena capacidad de recolección de corriente; fuerte biocompatibilidad con el medio; estabilidad química; propiedades anticorrosivas y una gran área superficial. Los materiales más utilizados son aquellos que presentan carbono por su alta efectividad y bajo precio (Chacón, 2018, p. 23).

1.6.1.2. Cátodo

Zona donde se genera la reducción del oxígeno, siendo este el aceptor de electrones más empleado, debido a su alto potencial de oxidación, disponibilidad y bajo costo, sin embargo, la reacción de reducción de oxígeno se ve afectada a pH neutro, naciendo la necesidad de utilizar catalizadores (Chacón, 2018, p. 23).

Existen aceptores de electrones orgánicos e inorgánicos; entre los orgánicos se destaca los colorantes azo y compuestos aromáticos nitrogenados y entre los aceptores inorgánicos se puede mencionar: iones que contienen metal, como el ferrocianuro este se utiliza generalmente cuando el cátodo es de carbono, sin embargo, su uso es limitado ya que se debe regenerar químicamente; compuestos que contienen nitrógeno y el oxígeno ya antes mencionado (Redondo, 2018, pp. 14- 15).

1.6.1.3. Membranas

La presencia de membranas permite el flujo de electrones externos en una sola dirección desde el ánodo hacia el cátodo, de la misma manera crea dos zonas notoriamente diferenciadas; una cámara anódica y catódica con condiciones anaeróbicas y aeróbicas respectivamente (López, 2014, pp. 11-12). Según Chacón (2018) existe una gran variedad de membranas empleadas en los SBE, en las que se destacan las siguientes:

- **Membranas de Intercambio Iónico:** Se emplea para la obtención de hidrogeno con un alto grado de pureza.
- **Membrana de Intercambio catiónico (CEM):** Posee grupos funcionales cargados negativamente que permiten la migración de cationes. Entre las membranas más conocidas se encuentran las de intercambio protónico (PEM), especialmente de Nafion 115 o 117 debido a su gran selectividad de protones. Otra alternativa es la membrana Ultrex CMI-7000 que tiene una mejor relación coste- eficiencia que el Nafion.
- **Membranas de Intercambio Aniónico (AEM):** Posee grupos funcionales cargados positivamente.
- **Membranas Bipolares (BPM):** Formadas por la unión de una capa de intercambio catiónico y una capa de intercambio aniónico unidos, generando un efecto de un campo eléctrico, donde el agua que se encuentra en la membrana se separa formando protones y iones hidroxilo.

1.6.1.4. Conductor externo

El conductor externo es el encargado de cerrar el circuito eléctrico en una CCM, dado que transporta los electrones desde el ánodo hacia el cátodo, generando así energía eléctrica. Estos deben ser metales con alta capacidad de conducción, no tóxicos y anticorrosivos como el acero inoxidable (Condori y Torres, 2019, p.53).

1.6.1.5. Sustratos

Los sustratos constituyen el combustible de las CCMs, dado que a partir de ello se generará electricidad y productos de valor agregado. Según la literatura científica existe una amplia gama de sustratos tanto puros como compuestos. Los sustratos puros corresponden glucosa, acetato, lactosa, maltosa, xilosa, formiato, propionato, ácido succínico, etanol (Liu et al., 2010), estos son de fácil degradabilidad, pero de mayor costo. Por otro lado, los sustratos complejos corresponden a aguas residuales provenientes de diferentes actividades industriales, aguas residuales domésticas

y residuos orgánicos sin embargo se debe considerar que para su degradación se requiere de una microbiota diversa y electroquímicamente activo, estos son de mayor accesibilidad por ende de bajo costo (Pant et al., 2010; citados en Revelo et al., 2013).

1.6.2. Materiales de las Celdas de combustible microbiano (CCMs)

Actualmente existe una amplia gama de materiales que han sido objeto de estudio en los diferentes sistemas bioelectroquímicos, buscando siempre que estos brinden una relación costo- beneficio óptimo, sin afectar la densidad de potencia y la eficiencia coulombica. En la Tabla 8-1 se describen de manera más específica los diferentes materiales para cada componente del sistema.

Tabla 8-1: Materiales de las Celdas de combustible microbiano (CCMs)

Elemento	Material
Ánodo	Tela de carbón, papel carbón, tela de grafito, gránulos de grafito, fibra de carbón, escobillas de grafito y mallas de carbón.
Cátodo	Grafito, Filtro de grafito, papel carbón, tela de carbón, Pt, Pt negro, Carbón vítreo reticulado (RVC).
Cámara Anódica / Cámara Catódica	Vidrio, Policarbonato, Plexiglás.
Sistema de Intercambio de Protones	Nafion, Ultrex, Polietileno, Polipropileno, Puente salino, Tabique de porcelana o electrolito.
Catalizadores de electrodos	Pt, Pt negro, MnO ₂ , Fe ³⁺ , polianilina, mediador de electrones

Fuente: Du et al.2007.

Modificado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.6.3. Rendimiento de las Celdas de combustible Microbiano (CCMs)

El desempeño eléctrico de una CCM se estudia a partir de las mediciones de voltaje que se realizan en la resistencia externa conectada entre el ánodo y el cátodo y los respectivos cálculos que se derivan de ellas (Revelo et al., 2013, p.20). Los parámetros que se analizan para evaluar el comportamiento eléctrico son: la densidad de potencia (DP) y la eficiencia coulombica (EC).

- **Densidad de potencia:** Es la cantidad de energía generada por unidad de área del electrodo o la potencia por unidad de volumen del sustrato (Wang et al. ,2010).

$$DP = \frac{V^2}{aR_{ext.}} = \frac{P}{a}$$

Dónde:

DP: densidad de potencia (W/m^2)

V: Voltaje (V)

P: Potencia (W)

A: área del electrodo (m^2)

R_{ext} : Resistencia estrena (Ω)

- **Eficiencia coulombica:** Permite obtener la fracción de energía eléctrica que se puede generar en la CCM a partir de un sustrato determinado (Logan et al., 2006; citados en Condori y Torres, 2019). Se calcula como la razón entre la carga generada y la carga teórica presente en el sustrato de la cámara anódica.

$$EC = \frac{\text{Coulombios recuperados}}{\text{Coulombios totales en el sustrato}}$$

Cuando se emplea aguas residuales o mezcla de sustratos como fuente de alimentación, se debe considerar la demanda química de oxígeno (DQO) como parámetro para medir las concentraciones de los sustratos (Logan et al., 2006; citados en Condori y Torres, 2019). Se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$EC = \frac{MO_2 \int_0^t I(t) dt}{F * bO_2 * Van * \Delta DQO}$$

Dónde:

MO_2 : Peso molecular del oxígeno en gramos/mol (32 g/mol).

$I(t)dt$: Coulombios reales generados en la operación de la CCM en coulombios (C).

F: Constante de Faraday (96,485 C/mol e-).

T: Tiempo de reacción o ciclo de operación de la CCM en segundos (s).

bO_2 : Número de moles de electrones generados por mol de oxígeno (4 mol).

Van: Volumen total de la cámara anódica en litros (L)

ΔDQO : Cantidad de DQO eliminado durante el ciclo de operación de la CCM en mg/L.

Además, las curvas de polarización son herramientas importantes para analizar la potencia de salida a través de diferentes cargas externas. Trazar los datos de la potencia y la densidad de corriente versus la densidad de potencia y la densidad de corriente proporciona información sobre la producción potencial de la CCM (Muhammad et al., 2018, p.230).

1.6.4. Factores que afectan la eficiencia de las celdas de combustible microbiano

El buen funcionamiento de las CCMs depende del buen control de ciertos factores como: tipo de microorganismo utilizado, tipo y concentración del sustrato, fuerza iónica, pH, temperatura y resistencia externa. En la Tabla 9-1 se describe de manera más específica los factores a tomar en cuenta:

Tabla 9-1: Factores que inciden en la eficiencia de las CCMs.

Factor	Descripción
Potencial de Hidrogeno (pH)	Los gradientes de pH, produce acidificación en la cámara anódica y alcalinidad en la cámara catódica. Esto se debe a que la migración de los protones a través de la membrana es lenta generando un descenso en la actividad bacteriana y en la transferencia de protones hacia la cámara catódica.
Resistencia eléctrica externa	Una resistencia externa muy alta actúa como una barrera que inhibe el flujo de electrones desde el ánodo hacia el cátodo, disminuyendo el potencial eléctrico y la remoción de materia orgánica.
Concentración de la materia orgánica.	La alta concentración de materia orgánica estimula una alta generación de electricidad y densidad de potencia.
Temperatura	La variación de temperatura genera efectos negativos en el funcionamiento del sistema, debido a su influencia en la cinética y termodinámica de las reacciones bioquímicas, por ende, afectando la potencia de salida de las CCMs.

Fuente: Condori & Torres, 2019.

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.6.5. Configuración de celdas de combustible microbianas

La configuración de las CCMs es una parte crítica para un óptimo funcionamiento. Se clasifican en las siguientes categorías:

- **Cámara Única CCM:** En este diseño, el ánodo y el cátodo no se colocan en compartimentos diferentes (Du et al., 2007). Consiste en un compartimento consiste en un ánodo rectangular acoplada con un cátodo de aire poroso que está expuesto directamente al aire (Condori y Torres (2019). En la figura 6-1, se representa la CCM con membrana y sin membrana respectivamente.

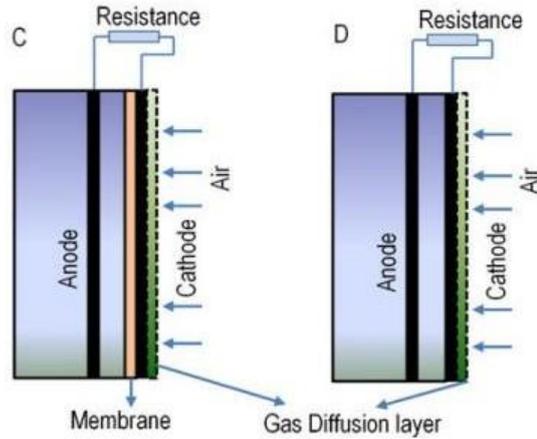


Figura 6-1: CCM con cámara única.

Fuente: Sun et al., 2014, p. 2423

- Cámara Doble CCM:** Su diseño se basa en una cámara anódica y catódica que se encuentran conectadas por medio de un puente de intercambio iónico o puente salino, la configuración más común es la denominada tipo H. Se implementa a escala de laboratorio y usualmente trabajan en modo Batch (Bermúdez y Bernal, 2018, p. 37). En la figura 7-1, se representa la CCM tipo H y la CCM en forma de cubo respectivamente.

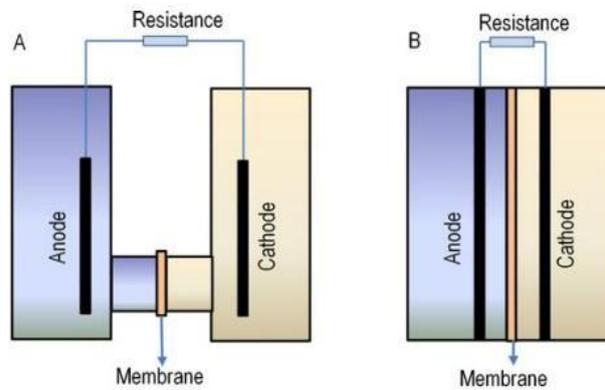


Figura 7-1: CCM de doble cámara

Fuente: Sun et al., 2014, p. 2423.

- Celdas de combustible microbiana de flujo ascendente:** Este tipo de CCM trabaja en modo de flujo continuo. El equipo se divide en dos secciones, donde una de las secciones será la cámara anódica y la otra sección la cámara catódica (Figura 8-1) (Bermúdez y Bernal, 2018, p. 37).

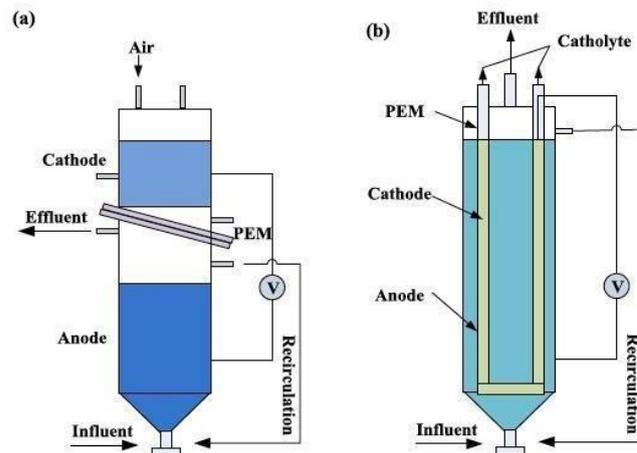


Figura 8-1: CCM de flujo ascendente.

Fuente: He et al., 2018, p.392

1.7. Cromo

1.7.1. Fuentes

El cromo es un elemento que se encuentra tanto de forma natural en animales, suelo, rocas y plantas como artificialmente a través de procesos industriales. Es el elemento número 21 en cuanto a abundancia sobre la corteza terrestre, y su contenido promedio en el suelo es de alrededor de 100 mg/kg (Alvarado et al., 2002, p. 55). Existen varios estados de oxidación del cromo, entre los más comunes e importantes en el medio ambiente y en la elaboración de productos comerciales, se encuentra el cromo metálico, cromo trivalente y cromo hexavalente.

El cromo hexavalente y metálico son estados producidos principalmente por métodos industriales tales como el cromado, en colorantes y pigmentos, en curtido del cuero y en la preservación de la madera, mientras que casi todo el cromo presente en la naturaleza se encuentra en forma de cromo trivalente, el cual está fuertemente ligado a materiales biológicos, dado que impulsa la generación de insulina y contribuye en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, con el fin de mantener un buen estado de salud (Montoya y Cabrera, 2006, pp.81-84).

1.7.2. Efectos toxicológicos y medioambientales

1.7.2.1. Salud humana

La toxicidad se debe a los derivados del cromo hexavalente que, contrariamente a los del cromo trivalente penetran en el organismo por cualquier vía con mayor facilidad. Las manifestaciones tanto agudas como crónicas ocasionadas por el cromo hexavalente están intrínsecamente

relacionadas con el medio laboral debido a la amplia gama de compuesto de cromo que se emplea especialmente en la industria de cuero, textil, petrolera, galvanizado y platinado (Montoya et al. 2010, p.81).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al Cr hexavalente dentro del grupo 1 de elementos cancerígenos para los humanos, debido a su demostrable genotoxicidad y carcinogenicidad. Los seres humanos y animales están expuestos al cromo por vía oral, inhalación o dérmica. El cromo hexavalente (Cr+6) es rápidamente tomado por los eritrocitos e integrado a otras células, la reducción intracelular del cromo hexavalente a trivalente a nivel de mitocondrias y núcleo genera intermediarios reactivos como Cr (+5), Cr (+4) y Cr (+3), así como radicales libres hidroxilo y oxígeno, que son susceptibles de alterar el ADN (Cuberos et al., 2009, p. 280).

1.7.2.2. Medio ambiente

El cromo hexavalente (Cr 6+), aunque es poco estable es muy soluble, con una alta movilidad entre sustratos, siendo un contaminante ambientalmente tóxico. Por tanto, el aire se ve afectado debido a que se eleva la concentración de este en forma de material particulado como consecuencia de la combustión de carbón y petróleo. Por otro lado, la contaminación de los cuerpos de aguas ocurre por la descarga de desechos tanto líquidos como sólidos derivados de las industrias; en la mayoría de los casos el cromo se deposita en el fondo y sólo una pequeña fracción se disuelve en el agua. El suelo también puede contaminarse, debido al depósito de residuos de la industria como cenizas de carbón provenientes de plantas generadoras de electricidad (Montoya et al., 2010, p. 82).

1.7.3. Industria de Curtiembre

Se denomina curtiembre al proceso de transformar las pieles de animales a un material duradero y flexible conocido como cuero, a través de una serie de tratamientos con diversas sustancias químicas, lo que induce sobre ellas modificaciones químicas y físicas (Chávez, 2010, p.44). Las pieles que comúnmente se utilizan son las de bovino, porcino y ovino, las cuales constituyen la principal materia prima del sector industrial del curtido (Ministerio del Ambiente, 2013, p.127).

1.7.4. Proceso de curtición en base de sales de cromo

En términos generales el proceso de curtición se desarrolla en las siguientes etapas que se describen en la Tabla 10-1:

Tabla 10-1: Proceso de curtición

Etapas	Descripción
Recepción de la materia prima	Esta fase se enfoca en realizar una inspección visual de las pieles con el fin de que cumplan con los estándares de calidad.
Pre-tratamiento	Se clasifica las pieles de acuerdo con su especie y tamaño, posteriormente se recorta las extremidades, cola y cuello y finalmente se lavan para eliminar residuos de sangre, excretas y otros componentes orgánicos.
Curado y desinfectado	Las pieles crudas se curan, mediante el curado con salmuera que es el método más utilizado debido a que es más rápido.
Pelambre	Etapas donde se elimina la epidermis y el pelaje de las pieles, sumergiéndolas en tambores con sulfuro de sodio y cal y agitación contante. Al interior del cuero se produce el desdoblamiento de las fibras a fibrillas que prepara el cuero para el siguiente proceso.
Desencalado	Es la etapa donde se lava la piel para remover la cal y el sulfuro empleando importantes volúmenes de agua para evitar posibles interferencias en las etapas posteriores del curtido.
Descarnado	Se retira las grasas y carnazas de la parte interna que todavía permanece en la piel, con el objeto de conseguir una adecuada penetración de los productos químicos en las siguientes etapas.
Desengrasado	Durante este proceso se limpia los poros de la piel y se elimina las proteínas no estructuradas con cloruro de amonio, logrando homogeneidad y mayor flexibilidad en la superficie de la piel.
Piquelado	Comprende la preparación química de la piel para el proceso de curtido a través de ácido fórmico y sulfúrico.
Curtido	Esta fase permite estabilizar el colágeno de la piel mediante agentes curtientes principalmente de sales de cromo, permitiendo convertir a la piel en un material estable, impidiendo su degradación. Para desarrollar este proceso la piel es introducida en una máquina llamada divisora durante 8 a 24 horas.
Teñido y engrase	Esta fase radica teñir el cuero mediante colorantes y restituirle las grasas perdidas mediante la aplicación de engrasantes dándole al cuero mayor elasticidad, textura y brillo.

Fuente: Ministerio del Ambiente, 2013.

Realizado por: Guamán, Evelyn, 2022.

1.7.5. Aguas residuales producto de la industria curtiembre

El recurso agua es el más empleado en esta actividad, debido a que sirve como medio para la disolución de los productos químicos que facilitan la limpieza y el tratamiento en cada fase de la curtición de la piel. En consecuencia, para procesar una tonelada de piel se utilizan 452 kg de sustancias químicas, de las cuales únicamente 72 kg de ellas quedan en el cuero, mientras que 380 kg van a las aguas residuales. Esto quiere decir que el 85% de las sustancias químicas utilizadas en el proceso quedan en el agua residual además de la carga de residuos de materia

orgánica de las pieles (CPTS, 2013; citados en Calucho, 2019, p. 19). Por lo que al momento de descargar los efluentes una vez finalizado el proceso debe regirse a lo estipulado en la legislación ambiental vigente, Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, que en el Anexo I del Libro VI de Calidad Ambiental, señala los parámetros de descarga de efluentes al alcantarillado y a cuerpos de agua dulce.

1.7.5.1. Sistemas de tratamientos para aguas residuales con cromo

Actualmente existe un déficit de los sistemas de tratamientos de aguas residuales industriales, incapaces de disminuir la concentración de sustancias tóxicas en su totalidad, provocando, así como el deterioro de la calidad de los cuerpos hídricos y afecciones en la salud de los seres vivos. Existe una gran variedad de tratamientos físicos, químicos y biológicos para neutralizar, reducir y eliminar contaminantes químicos generados por los procesos industriales. A pesar de ello, estos métodos tienen limitaciones ya sea a nivel técnico o económico, por ejemplo, la aplicación de procesos biológicos para eliminar colorantes de las aguas residuales se ve limitada debido a la necesidad de aclimatación, tiempos elevados de residencia y el carácter persistente de algunos colorantes (Rai, et al., 2005, p.220).

Así mismo, existen otros métodos convencionales tales como adsorción con carbón activado, electrocoagulación, ultrafiltración, intercambio iónico con resinas, ósmosis inversa, filtración con membranas y fotocatalisis. Sin embargo, la eficiencia de estos métodos disminuye cuando la concentración de cromo en el agua es baja, entre (1 – 100 mg/l), por lo que su aplicación es rentable para altas concentraciones de Cr generadas en grandes empresas que cuentan con los recursos suficientes para implementarlos en sus plantas de tratamiento de aguas residuales (Meneses, et al., 2019, p.144).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la investigación

El estudio contó con varias fases, mismas que se desarrollaron en dos ciudades, la caracterización de bacterias mediante técnicas moleculares se desarrolló en el laboratorio IDgen ubicado en la Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro, Quito-Ecuador, mientras que la elaboración; configuración, ensamble y monitoreo de las CCMs, se lo abordó en las instalaciones del Laboratorio de investigación y desarrollo ambiental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba-Ecuador. Además, cabe mencionar que el agua residual objeto de estudio pertenece a la curtiembre “El ALCE” ubicada en las calles José Rodríguez 103 y León Hidalgo a 250 m de la entrada del cantón Guano, provincia de Chimborazo.

2.2. Diseño de la investigación

La presente investigación se basó en los siguientes tipos de investigación descritas a continuación:

- El enfoque de esta investigación fue cuantitativo dado que se empleó recolección de datos numéricos y métodos estadísticos, con el fin de corroborar hipótesis planteadas.
- El nivel de investigación fue explicativo, debido a que presentó una relación causal, es decir a más de describir al objeto de estudio, se respondió el porqué del mismo y en las condiciones en la que esta se manifestó.
- El diseño de este estudio fue experimental dado que se creó un ambiente controlado donde se manipularon intencionalmente variables independientes con el fin de observar y medir su efecto sobre otras variables; esta a su vez se divide en cuasi-experimental, dada que el grupo de estudio es intacto, es decir no se determinó mediante asignación al azar ni emparejamiento.

2.3. Fases de la Investigación

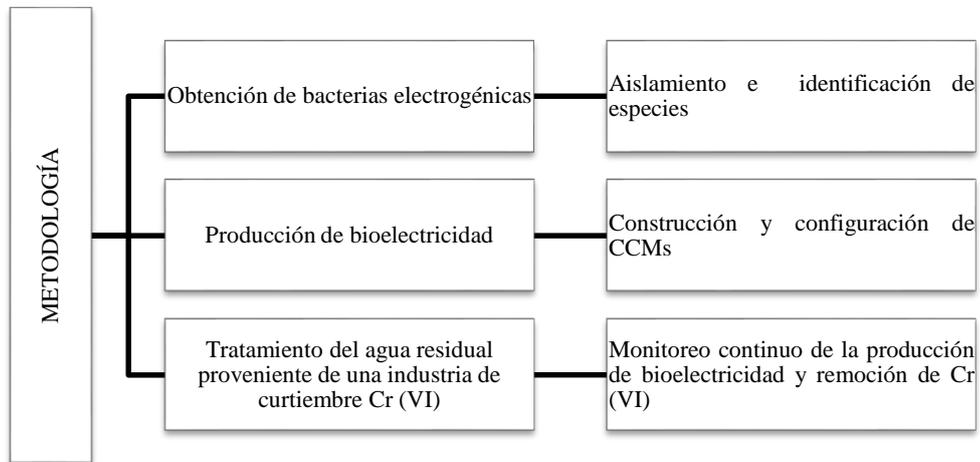


Gráfico 1-2: Diagrama de las fases de la investigación.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.4. Tamaño y métodos de muestreo

2.4.1. Bacterias

Los cultivos axénicos que se emplearon para la caracterización molecular fueron resultantes de la reactivación de una biopelícula anódica de suelo alto andino, ubicado en la parroquia Villa La Unión, Cantón Colta, provincia de Chimborazo (Mazo, 2020, p.21).

El tipo de muestreo que se empleó fue no probabilístico, con subdivisión en muestreo intencional. Por consiguiente, de los cultivos identificados: *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Citrobacter freundii*., se seleccionó la bacteria *Delftia acidovorans*, como inóculo para el funcionamiento de las CCMs, en base a pruebas de tolerancia y toxicidad previamente realizadas, donde se determinó que dicha bacteria, posee resistencia y que puede remover metales pesados como el Cromo.

2.4.2. Agua residual

El agua residual industrial fue proveniente de la empresa “El Alce”, misma que se dedica a la transformación de pieles en cuero, dicha agua corresponde a la fase de curtición, donde se encuentra el metal de interés, en este caso el cromo. El tipo de muestreo que se empleó fue no probabilístico, donde se tomó una muestra simple, la cual se define como una muestra tomada en un único momento. Se recolectó un volumen total de 6 litros, el cual se empleó tanto para trabajar

en las CCMs, como para los análisis físicos químicos preliminares al tratamiento. Para el agua residual sintética se elaboró con Dicromato de potasio (Xafenias et al.,2014, p. 2440) a una concentración conocida de 1 ppm. Los dos tipos de aguas se lo empleó tanto en las pruebas de ensayo como en el proceso de experimentación final.

2.5. Obtención de bacterias electrogénicas

2.5.1. Reactivación del biofilm

El primer paso para el proceso de aislamiento bacteriano fue la reactivación de la biopelícula generada a partir de suelo de páramo, para lo cual se elaboró CCMs donde se empleó la biopelícula. Posterior al tiempo de experimentación, la membrana del ánodo se enjuagó con agua destilada con el fin de eliminar residuos visibles y finalmente se sumergió en SDS (1%) durante 1 hora, en donde se obtuvo una suspensión de bacterias, que sirvió para la obtención de cultivos axénicos (Sacco, Bonetto y Cortón 2017, p. 3; citados en Mazo, 2020, p.24).

2.5.2. Aislamiento bacteriano

La suspensión obtenida fue diluida en serie de orden 10 hasta 10^{-6} y mediante vertido en placa se realizó la respectiva siembra, los cultivos fueron incubados durante 48 horas en una estufa a 22.5°C (Sacco, et al., 2017, p. 3; citados en Mazo, 2020, p.24). Las cepas aisladas fueron replicadas e incubadas en el laboratorio de Ciencias Biológicas en la Facultad de Recursos Naturales para su posterior análisis morfológico, bioquímico, molecular y pruebas de tolerancia y toxicidad correspondiente.

2.6. Caracterización bacteriana

2.6.1. Morfológica

Una vez finalizado el aislamiento bacteriano y realizado las réplicas necesarias, con el fin de obtener cultivos axénicos, se tomaron las colonias más representativas en función de características macroscópicas como la forma, elevación, superficie, consistencia, color, luz reflejada y luz transmitida, este proceso permitió dar el primer paso para su identificación a nivel fenotípico. Además, a nivel microscópico se realizó tinción Gram (Mazo, 2020, p.25).

2.6.2. Bioquímica

Las cepas aisladas y debidamente etiquetadas fueron trasladadas en un cooler del Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias, donde se realizó pruebas bioquímicas permitiendo así una identificación en base a características metabólicas de las bacterias (GIDAC-ESPOCH 2020). A continuación, se describe la metodología empleada en las pruebas bioquímicas (Tabla 11-2).

Tabla 11-2: Pruebas bioquímicas

Pruebas Bioquímicas	Metodología
Tinción Gram	Primero se recogió una muestra representativa de las bacterias mediante un hisopo, luego se extendió dicha muestra sobre un portaobjetos, como primer paso se colocó cristal violeta, luego de manera sucesiva se colocó lugol y una mezcla de alcohol y acetona, la cual deshidrató la pared bacteriana y se colocó safranina, misma que sirvió para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-lugol.
Prueba de la Catalasa	Se tomó con un asa una colonia y se depositó en un portaobjeto, posteriormente se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 30% y se procedió a observar la formación de burbujas (positivo).
Prueba de la Oxidasa	Se colocó encima de un portaobjetos un trozo de papel de filtro, posterior a ello se impregnó en el papel P-fenildiamina haciendo uso de una pipeta Pasteur y se realizó una impregnación del microorganismo usando un asa de siembra.
Prueba Sim	Se pesó 30 gr del medio deshidratado y se disolvió en un litro de agua destilada, se ejerció agitación frecuentemente hasta su completa disolución, luego se distribuyó la mezcla en tubos de ensayo con tapa y se llevó a autoclavar a 121°C por 15 minutos, posterior a ello se dejó solidificar el medio en posición vertical con el fin de que el este quede en forma de taco y se incubó el medio a temperatura ambiente.
Prueba de Kligler	Se suspendió 52 gramos del medio en un litro de agua destilada; se homogenizó bien con agitación frecuente, posteriormente se dispuso en tubos y esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, se dejó enfriar en posición inclinada para obtener pendientes de 1,5-2 cm de profundidad, después se realizó un estriado en la superficie del tubo con un asa, y se incubó a 35±2 °C durante 24 horas.
Prueba de la Coagulasa	En un tubo se colocó 0,5 ml de plasma y 0,5 ml del microorganismo, se mezcló suavemente por rotación, se incubó a 37°C en una estufa; se observó cada 30 minutos si se ha coagulado el plasma inclinando el tubo, en un periodo máximo de 4 horas.
Prueba del CAMP (Camp Factor Test)	Se realizó un estriado con <i>Streptococcus</i> problema y, perpendicularmente a ella, a 3 o 4 mm de distancia, se realizó una estría de la cepa de

	<i>Staphylococcus aureus</i> productora de beta-lisina en agar sangre y luego se incubó a 35-37 ° C durante 24 horas.
Prueba de Citrato de Simmons	Se pesó 52 g del medio en un litro de agua purificada; se disolvió con agitación frecuente; se distribuyó en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C, luego se tomó una colonia aislada y se sembró en forma de estría única en el pico de flauta (agar inclinado) del tubo de agar citrato a 35 °C, se incubó durante 48 horas.
Prueba de la Urea	Se cogió una pequeña cantidad de muestra con el asa de siembra y se procedió a sembrar el microorganismo en un medio de agar urea de Christensen, haciendo uso de la técnica por lengüeta y se incubó a 37°C, por un máximo de 6 días.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.6.3. Pruebas de Tolerancia y Toxicidad

Las bacterias fueron trasladadas en un cooler al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias, con el fin de realizar las respectivas pruebas de tolerancia y toxicidad ante 3 metales pesados: Zinc, Cromo y Plomo, a concentración de 1, 3 y 5 ppm (GIDAC-ESPOCH 2021). Se realizó tres repeticiones con la siguiente estructura (blanco – sin bacteria, cultivo - bacteria, cultivo – bacteria) como se visualiza en la Figura 9-2, obteniendo así un total de 273 tubos con sus respectivas muestras, las mismas que se analizaron a través de un espectrofotómetro de absorción atómica (AA). A continuación, se detalla la metodología empleada:

Se preparó estándares de zinc, cromo y plomo a las concentraciones de 1,3 y 5 ppm, se etiquetó los tubos para las 7 bacterias y sus respectivas repeticiones, luego se preparó 500 ml de peptona, posteriormente se procedió a añadir en cada tubo las bacterias de interés con un asa, luego se colocó 5ml del estándar de 1ppm en tres tubos y así sucesivamente con las concentraciones de 3 y 5 ppm. Después se añadió 1ml de peptona a cada tubo con los estándares. Seguidamente se preparó la muestra patrón (estándar + peptona), esto se lo realizó para las 3 concentraciones, se llevó a incubar por 48 horas. Luego todos los tubos se trasladaron al espectrofotómetro de absorción atómica (AA), en donde se midió el blanco, el patrón y las muestras.

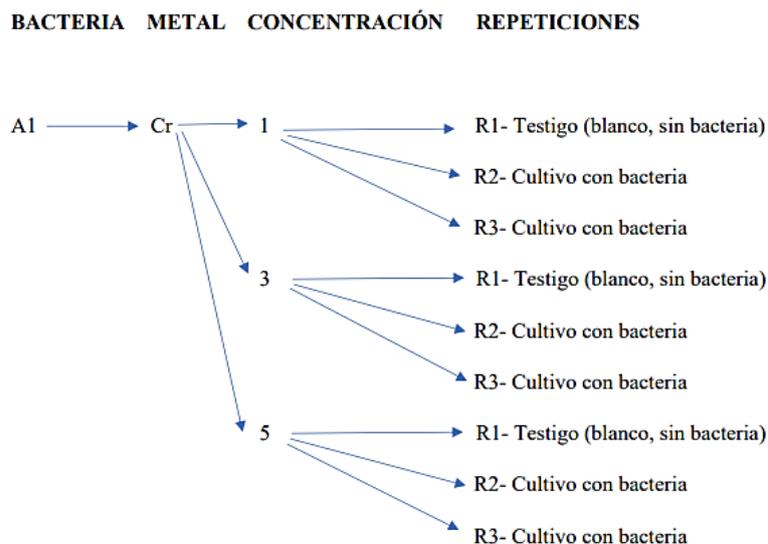


Figura 9-2: Estructura de las Pruebas de tolerancia y toxicidad

Realizado por: GIDAC-ESPOCH, 2021.

2.6.4. Molecular

Las muestras almacenadas dentro del Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales fueron resembradas en medio sólido e incubadas por 48 horas a 26 °C, con el fin de obtener cultivos jóvenes que nos brinde un mejor resultado, luego, fueron trasladadas al Laboratorio IDgen ubicado en Quito, dentro de un cooler en medio frío para su respectivo análisis molecular.

2.6.4.1. Extracción y purificación de ADN

Se empleó el protocolo de Barrendero (2008), detallado en el Anexo A y el kit comercial de extracción y purificación de ADN PureLink® Genomic DNA el cual consistió en añadir buffer de extracción (2,5% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl [pH 8.0]) y β -mercaptoetanol en tubos eppendorf con 50 mg de la muestra del microorganismo a analizar.

Después se utilizó un agitador vortex y se incubó en baño María a 60 °C por 30 minutos, invirtiendo la mezcla cada 10 minutos. Posterior a ello, se realizó ciclos de centrifugado y adición de cloroformo, lo que permitió la separación de proteínas y lípidos dando como resultado una fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos y una fase orgánica que contenía las proteínas y lípidos disueltos, después se tomó el sobrenadante aproximadamente 400 μ L y se colocó en un nuevo tubo estéril.

Seguidamente para eliminar sales y restos de moléculas orgánicas que pudieran estar presentes en la muestra se añadió etanol al 70%, lo que provocó que el ADN se precipite y se dejó a -20°C toda la noche. Luego se realizó 2 lavados con etanol (70%), mismo que se descartó por inversión, inmediatamente el pellet formado se secó durante 15 a 20 minutos utilizando la cámara de flujo laminar. Posteriormente el ADN se resuspendió en agua dietilpircarbonato (DEPC) y RNAsa, durante 30 minutos a 37°C y finalmente la muestra se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

2.6.4.2. Amplificación del ADN mediante la reacción de la polimerasa (PCR)

Una vez aislado el ADN de las diferentes bacterias se procedió a conocer sus características cualitativas y cuantitativas mediante el NanoDrop One, el cual es un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral, este nos permitió conocer la calidad y pureza del ADN antes de realizar su amplificación.

Posteriormente se procedió a amplificar regiones de ADN, en este caso como se trata de bacterias, se amplificó la región 16S aplicando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con ayuda del kit GoTaq® Blue Master Mix, el cual contiene: Taq ADN polimerasa, primer 27F, primer 1492R, agua ultrapura libre de nucleasas, cloruro de magnesio y dNTP. A continuación, las muestras se llevaron al termociclador con la siguiente programación: fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido la fase de hibridación a 54°C durante 15 segundos y finalmente la fase de elongación a 72°C durante 5 minutos, por 40 ciclos (Figura 10-2).

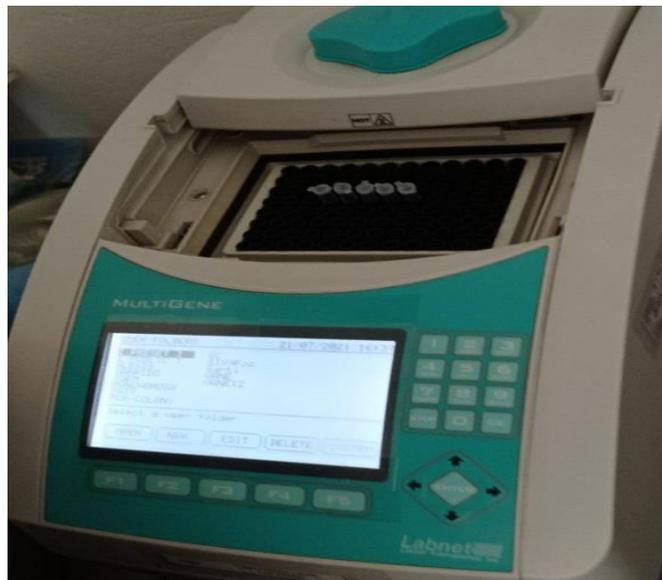


Figura 10-2: Amplificación de ADN- PCR.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.6.4.3. *Electroforesis en gel de agarosa*

Para la preparación del gel se añadió 0.4 g de agarosa en 40 mL de TBE 1X, después se fundió la mezcla en el microondas en intervalos de 30 segundos y se dejó enfriar hasta alcanzar aproximadamente 50 °C para luego añadir 3µL de bromuro de etidio. Luego se procedió a colocar el gel en el soporte evitando hacer burbujas y el peine para formar los pocillos en el gel.

Seguidamente, se colocó en los pocillos los reactivos en el siguiente orden: primero el marcador molecular ABM 100bp Opti-DNA marker, el blanco y los amplicones de cada muestra, la fuente de alimentación se programó a 90 V x 35 minutos (Figura 11-2), al cabo de este tiempo el gel fue llevado a una lámpara de luz UV para su visualización.



Figura 11-2: Electroforesis en gel de agarosa.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.6.4.4. *Secuenciación molecular*

Para la secuenciación se empleó el método enzimático Sanger (Cornejo et al.,2014, p.233) para lo cual se requirió enviar los amplicones obtenidos en la PCR y sus respectivos C al Centro de Investigaciones “Macrogen” ubicado en Corea bajo los siguientes requerimientos: los amplicones deben poseer una concentración de 100 ng/µL y contener entre 20-15 µL de cada muestra a secuenciar.

2.6.4.5. *Identificación molecular bacteriana*

Una vez obtenidas las secuencias se procede a verificar la calidad de las mismas a través de electroferogramas, con el fin de que no afecte en el ensamblaje de las secuencias complementarias y por ende en la confiabilidad de los datos obtenidos, esto se lo realizó con el uso de programas

bioinformáticas como Geneious (Figura 12-2). Finalmente, para concluir con la identificación de los microorganismos se procedió a comparar las secuencias ensambladas en una base de datos de nucleótidos de especímenes como GenBank del NCBI (Figura 13-2 A) en base al porcentaje de identidad. (Figura 13-2 B).

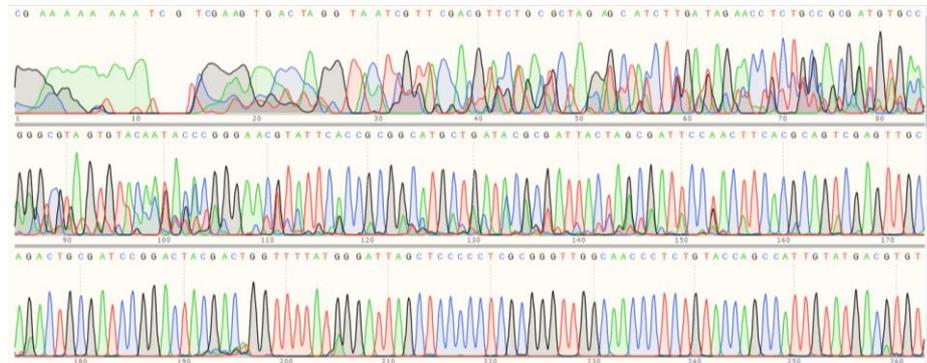


Figura 12-2: Electroferograma de las secuencias de ADN.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

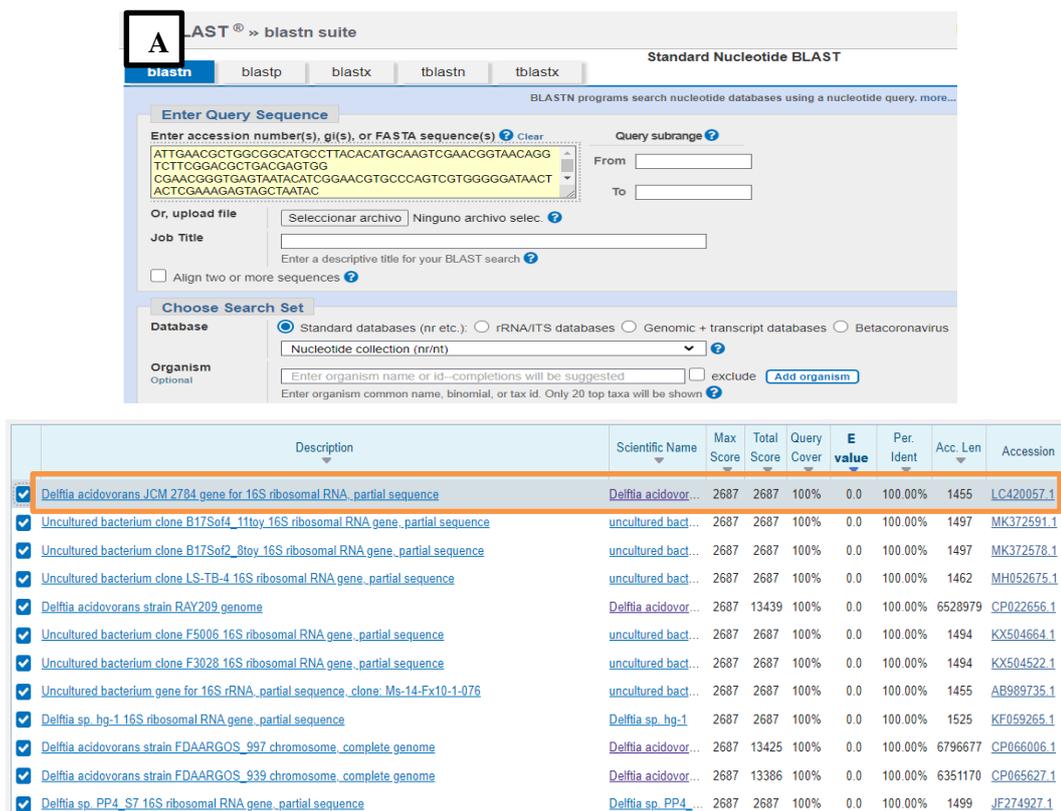


Figura 13-2: NCBI, A: Comparación de la secuencia consenso B: Determinación del microorganismo

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7. Producción de bioelectricidad

2.7.1. Pruebas de ensayo

2.7.1.1. Limpieza de las CCMs para pruebas de ensayos

Las CCMs utilizadas en las pruebas de ensayo fueron de configuración simple de cámara cubica con cátodo expuesto parcialmente al aire construidas con acrílico traslucido con una capacidad volumétrica de 125 ml) (Figura 14-2. A) (GIDAC-ESPOCH 2019). Todas las partes que conforman las CCMs fueron completamente sumergidas en una solución de hipoclorito de Sodio al 5% durante 60 minutos. Al cabo de este tiempo, dichos componentes fueron lavados e inmersos en agua comercial (Tesalia Springs Company, Riobamba, Ecuador) (Logroño, et al.,2016, p.101), por 24 horas (Guambo & Allauca, 2015, p.37), finalmente fueron expuestos a luz UV en una cámara de flujo laminar para su completa desinfección (Zhi et al. 2014, p. 11) (Figura 14-2. B).

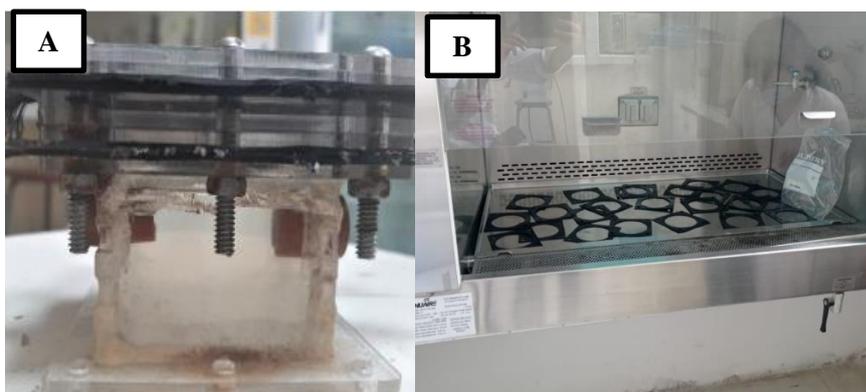


Figura 14-2: A: CCM de las pruebas de ensayo B: Limpieza de las CCMs.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7.1.2. Pretratamiento del ánodo y cátodo

Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de eliminar todas las impurezas presentes en el tejido de fibra de carbono. Para la membrana anódica las fibras fueron cortadas en forma de cuadrados de acuerdo con las medidas de las placas de las celdas, luego se sumergieron en acetona industrial por un lapso de 12 horas, al cabo de este tiempo, los cortes fueron lavados con agua destilada para eliminar los sobrantes del disolvente. Posterior a ello, se sumergió la fibra en una solución de peroxodisulfato de amonio, previamente preparada con 50 g del soluto en 250 ml de agua, por un periodo de tiempo de 15 minutos, seguido con 100 ml de ácido sulfúrico al 10% por tiempo similar. Al final de dicho proceso, se calentarán los cortes de fibra a 450°C en un horno mufla por 20 minutos, para luego lavarlos en agua destilada y conservarlos en fundas ziploc (Figura 15-2.

A). Por otro lado, para la membrana catódica se realizaron varios enjuagues en las fibras de carbono con agua destilada y finalmente se guardó en fundas ziploc previamente etiquetadas para su posterior uso; el proceso antes mencionado se repitió en la experimentación final (Figura 15-2. B).

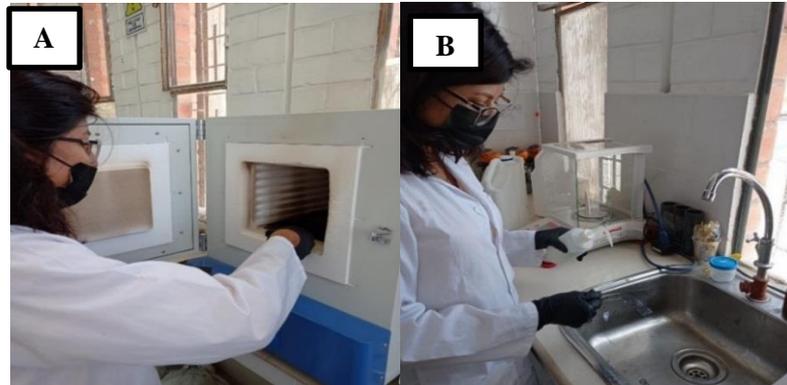


Figura 15-2: A: Pre tratamiento del ánodo. B: Pre tratamiento del cátodo.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7.1.3. Montaje de las CCMs

Antes de ensamblar las CCMs se resembró la bacteria de estudio en medio líquido y se incubó durante 2-3 días, para su posterior uso. Se utilizó dos CCMs, una para cada sustrato, en donde se introdujo el sustrato: agua residual industrial (AR) y agua residual sintética (AS) y el inóculo (*D. acidovorans*), dentro de una cámara de flujo laminar, seguidamente las CCMs se coloraron en un mesón en condiciones de asepsia para su respectiva medición de voltaje (mV) mediante un multímetro durante 15 días en un intervalo de tiempo de 3 horas (9:00 ;13h:00; 17h:00) (Figura 16-2). Cabe mencionar que se suministró cantidades pequeñas de líquido en el transcurso de toda la experimentación debido a temas de evaporación.



Figura 16-2: Monitoreo de las pruebas de ensayo

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7.2. Diseño y Construcción de las CCMs

El diseño de la CCM se basó en investigaciones anteriores donde se consideró una distancia mínima entre los electrodos (Mazo, 2020, p.25). Se construyó 3 CCMs para cada sustrato, en este caso agua residual industrial y agua residual sintética, obteniendo así un total de 6 celdas.

Las CCMs consistieron en una cámara tubular de plexiglás con un racor neumático de 8 mm en la parte inferior, el cual permitió la entrada y salida del sustrato. Los electrodos tanto el ánodo como el cátodo se colocó en la parte superior de la cámara y estuvieron constituidos por una lámina cuadrada de fibra de carbono separadas por cauchos y en el caso del ánodo se colocó papel celofán para impedir el paso del aire a este compartimento. El sistema se aseguró con 4 tornillos galvanizados con tuerca mariposa alrededor de los soportes planos de la cámara tubular (Figura 17-2. A).

Las dimensiones de las CCMs fueron las siguientes: el tubo cilíndrico tuvo un largo de 8.0 cm, diámetro de 8.0 cm, con un espesor de 2 mm y un volumen de operación aproximado de 400 ml. En el caso de los soportes de acrílico fueron de 10 cm x 10 cm, cuyo espesor varió de acuerdo con las necesidades del dispositivo; las dimensiones de los electrodos y papel celofán estuvieron sujetos a las medidas de los soportes y de los cauchos fueron de 10cm x 10cm x 1cm (Figura 17-2. B).

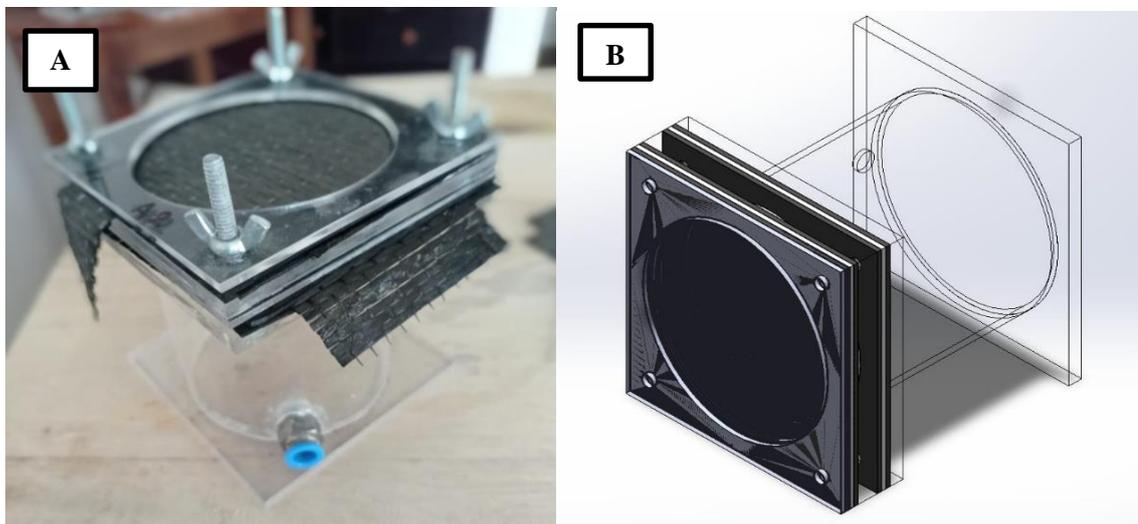


Figura 17-2: Diseño de la CCM **A:** Diseño en tiempo real. **B:** Diseño en 3D.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7.3. Operación de las CCMs

2.7.3.1. Sistema de bombeo

Para la recirculación del sustrato se usó una mini bomba de diafragma R385, que es un tipo de bomba de desplazamiento positivo con un voltaje de 6-12 V, corriente de 1 A y potencia de 6W/h, misma que fue conectada a una fuente de 12 V que permitió su funcionamiento. La bomba fue conectada a las celdas mediante racores neumáticos y válvulas de medio paso de 8mm que permitió la entrada y salida del sustrato.

2.7.3.2. Monitoreo de CCMs

El monitoreo de los parámetros como voltaje y pH, son clave para entender el comportamiento de las CCMs. El voltaje (mV) se midió a través de 3 conversores analógicos digitales de 16 bits, conectadas a su vez a una tarjeta electrónica (Arduino Uno R3), lo que brindó una mayor estabilidad en la recolección de datos, cabe señalar que cada análogo tuvo la capacidad de monitorear dos celdas. El monitoreo se lo realizó de forma automática cada minuto durante 15 días (Figura 18-2. A). El parámetro pH, se midió de forma manual, diariamente durante todo el proceso de funcionamiento de las celdas, con el pHmetro Oakton modelo pH 2700 (Figura 18-2. B), esta medida se consideró dado que a pH bajos ocasiona una disminución drástica de la actividad bacteriana y por consiguiente afecta la transferencia de protones hacia la cámara catódica (Huang et al., 2011, p. 262).

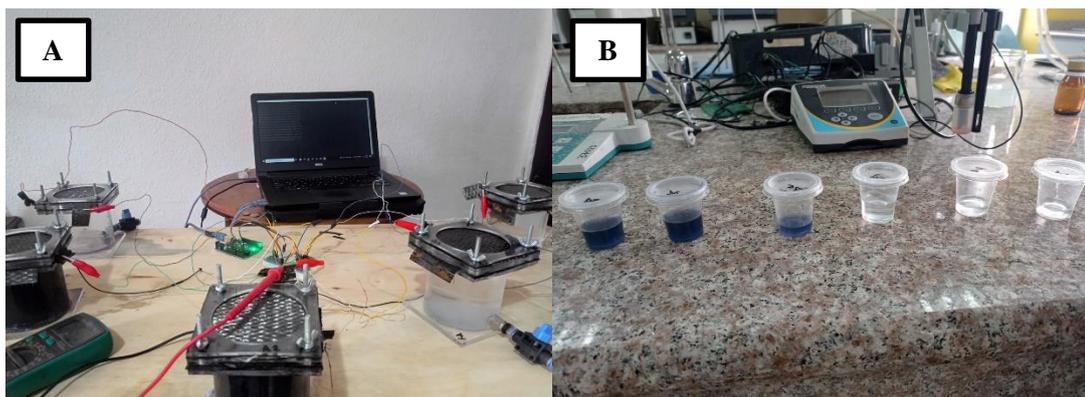


Figura 18-2: Monitoreo de las CCMs **A:** Voltaje (mV) **B:** pH.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

2.7.4. Tratamiento del cromo hexavalente

2.7.4.1. Inóculos

Para determinar la cantidad de inóculo adecuado se tomó como referencia 2 ml de inóculo por 125 ml que es la capacidad volumétrica de las CCMs (Paña, 2017, p.36). Por tanto, para este estudio se requirió 6,4 ml de inóculo para una CCM con un volumen de 400 ml, como se muestra en la Ec (1).

	Inóculo	Agua
<i>Ec (1)</i>	2 ml	125 ml
	X	400 ml
	X= 6,4 ml	

2.7.4.2. Sustratos

Se utilizó agua residual industrial cruda y agua residual sintética. Para establecer la concentración del agua residual sintética se tomó como referencia las pruebas de tolerancia y toxicidad realizadas por el Grupo de Investigación y Desarrollo para el Ambiente y Cambio Climático (GIDAC-ESPOCH 2020), por consecuencia se preparó 2 soluciones con dicromato de potasio, la primera de 0,000125 g para las pruebas de ensayo y la segunda de 0,0013 g para la experimentación final, como se indica en la *Ec (2)* y *Ec (3)*.

$$\begin{aligned} Ec (2) \quad ppm &= \frac{mg \ x}{L \text{ solución}} \\ mg \ x &= \frac{mg}{L} * 0,250 \ L = 0,250 \ mg \\ g &= 0,00025 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Ec (3) \quad ppm &= \frac{mg \ x}{L \text{ solución}} \\ mg \ x &= \frac{mg}{L} * 1,30 \ L = 1,30 \ mg \\ g &= 0,0013 \end{aligned}$$

2.7.4.3. Análisis de laboratorio

Según la Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, se establece que los parámetros de monitoreo para la actividad industrial de manufactura: Curtido y adobo de

pieles son: PH, DBO, DQO, SST, Grasas y aceites, Sulfatos (SO_4), Cromo hexavalente (Cr^{6+}), y color. Por consecuencia se realizó análisis del agua residual antes y después de su incorporación en las CCMs, con el fin de visualizar de mejor manera el comportamiento de la bacteria en presencia de cromo hexavalente. Además, de acuerdo con la normativa ambiental el resultado de la medición de dichos parámetros se comparó con el TULSMA, Libro VI, Anexo I, Tabla 11: Límites de descarga al sistema de alcantarillado público.

2.8. Materiales experimentales

Los materiales y equipos utilizados en las diferentes fases de investigación se describen en la Tabla 12 – 2.

Tabla 12-2: Materiales y equipos empleados dentro de la investigación.

Fase de investigación	Materiales	Equipos
Identificación molecular	Tubos eppendorf Cajas Petri Cooler Micropipeta 0,5-10 uL	Vortex Termociclador Cámara de flujo laminar Computadora
	Micropipeta 10-100 uL Micropipeta 100-1000 uL Parafilm	Microondas Cámara de electroforesis NanoDrop One Baño maría
Tratamiento de electrodos	Fibra de carbono Pinzas Vasos de precipitación Piseta Fundas ziploc	Mufla
Elaboración de CCMs	Acrílico Fibra de carbono Racores neumáticos de 8 mm Resina	Láser de acrílico
Ensamble de las CCMs	Cauchos Tornillos con tuercas estilo mariposa Celdas de acrílico Válvulas de ½ paso de 8 mm Electrodos tratados Celdas de acrílico	Cámara de flujo laminar
Sistema de bombero	Manguera de 8 mm Mini bomba Recipientes de plástico de 500 ml	Cámara de flujo laminar Fuente de 12 V

	Cables	
Monitoreo de las CCMs	Lagartos	Arduino Uno - conversores analógicos digital de 16 bits
	Cables	Multímetro
	Recipientes de plástico de 20 ml	pH metro
	Tijeras	Cautín
	Estaño	Computadora

Realizado por: Guamán, Evelyn ,2022.

2.9. Planteamiento de hipótesis

2.9.1. Hipótesis Textual

Los cultivos axénicos de bacterias electrogénicas identificadas molecularmente inciden en el contenido de cromo en las aguas residuales provenientes de una Industria de Curtiembre a través de la tecnología CCMs.

2.9.2. Hipótesis estadística

$$H_0 = \delta AR = \delta AS$$

$$H_1 = \delta AR \neq \delta AS$$

Donde:

δAR = Voltaje de corriente directa generada con agua residual industrial.

δAS = Voltaje de corriente directa generada con agua residual sintética.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación bacteriana fenotípica y genotípica

3.1.1. Identificación fenotípica

Se abarcó tanto a nivel morfológico como bioquímico, a través de la información recolectada mediante el trabajo de investigación de (Mazo,2020), así como las pruebas bioquímicas y pruebas de tolerancia y toxicidad realizadas por el grupo de investigación (GIDAC-ESPOCH 2020), permitiendo así obtener una idea inicial del tipo de microorganismos aislado, que se describe en la Tabla 13-3.

Tabla 13 - 3: Identificación bacteriana morfológica y bioquímica

	Codificación	B150	B152	B153	B156	B157
PRUEBAS MORFOLOGICAS	Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
	Borde	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
	Elevación	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
	Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa
	Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	Color	Beige	Amarillo-verdoso	Naranja intensa	Beige	Beige
	Luz Reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
	Luz Transmitida	Traslucida	Traslucida	Opaco	Opaco	Traslucida
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Tinción Gram	G-	G-	G+	G-	G-
	Oxidasa	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
	Catalasa	Negativo	Negativo	Positivo		Positivo
	Sim	Negativo				
	Kligler		Negativo			
	Coagulasa			Positivo		
	Citrato de Simmons				Negativo	Negativo
	Urea				Negativo	Negativo
	CAMP					Positivo

Fuente: Mazo, M,2020.

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.1.2. Identificación molecular

3.1.2.1. Extracción y purificación de ADN bacteriano

Mediante la aplicación del kit comercial PureLink® Genomic DNA y el protocolo descrito en la sección de metodología, se aisló y purificó el ADN de las muestras, para verificar la calidad y pureza de estas se utilizó el NanoDrop One. Todas las muestras se encontraron en el rango de 1,8 – 2,1 tanto para sales (A260/A230) como para proteínas (A260/A280) lo que indica valores aceptables de pureza, con respecto a la concentración de ácidos nucleicos se obtuvieron valores entre 100 - 400 ng/μL (Figura 19-3). Cabe recalcar que este punto es clave antes de ejecutar la PCR, dado que las sales y proteínas son inhibidores de dicho proceso.

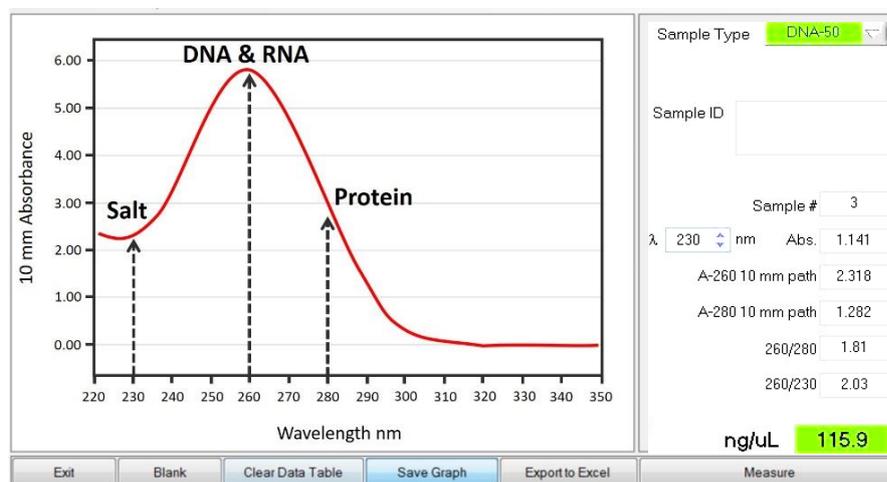


Figura 19-3. Análisis del ADN a través de NanoDrop One.

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.1.2.2. Amplificación del Gen ARNr 16S

Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% se valoró la integridad de las muestras verificando así la eficiencia de la amplificación, obteniendo amplicones de aproximadamente 1500pb como se visualiza en la Figura 20-3.



Figura 20-3: Electroforesis en gel de agarosa de los cultivos axénicos.

Realizado por: Guamán, E. 2022.

3.1.2.3. Secuenciación e identificación molecular

Las secuencias consensos que se obtuvieron a través del ensamblaje de las secuencias de ADN mediante el programa Geneious, permitió la comparación de las mismas con secuencias disponibles en la base de datos NCBI, utilizando la herramienta BLAST. El umbral para la diferenciación entre dos especies está en un valor de 98,65% de similitud del gen ARNr 16S (Kim et al., 2014, p. 348), por tanto, se identificó 4 especies bacterianas con un porcentaje de identidad de 100%, 100% 99,44 % y 100% para *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas geniculate*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Citrobacter freundii*, respectivamente (Tabla 14-3).

Tabla 14-3: Identificación molecular bacteriana

PRUEBAS MOLECULARES					
Codificación	B150	B152	B153	B156	B157
Organismo	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Pseudomonas geniculate</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
% de identidad	100	100	99,44	100	97,31
% de calidad	77,6	79,7	90	96,7	89
N° de acceso	LC462156.1	LC507977.1 MN240936.1	CP040432.1	CP049015.1	MT197334.1

Realizado por: Guamán, E. 2022.

3.2. Pruebas de tolerancia y toxicidad

Dichas pruebas nos permitió determinar la relación dosis-respuesta de compuestos tóxicos como lo son los metales pesados, a nivel de individuo (Munkittrick y McCarty, 1995). Por consiguiente,

Delftia acidovorans fue resistente a los 3 metales a una concentración de 1 ppm, a 3 ppm es resistente solo a Cr (VI) y tolera Zn y a 5 ppm tolera Cr (VI) y Zn y no tolera Pb. Para el caso de *Pseudomonas geniculata* es resistente a los 3 metales a una concentración de 1 y 3 ppm, sin embargo, a una concentración de 5 ppm solo toleran Cr (VI) y Zn y no toleran Pb. De la misma manera *Stenotrophomonas maltophilia* es resistente a los 3 metales a una concentración de 1 y 3 ppm, no obstante, a una concentración de 5 ppm solo tolera Zn y no toleran Cr (VI) y Pb. Finalmente, *Citrobacter freundii* es resistente a los 3 metales a una concentración de 1 y 3 ppm, por lo contrario, a una concentración de 5 ppm no toleran Pb (Tabla 15-3.).

Tabla 15-3: Pruebas de tolerancia y Toxicidad para Cr (VI), Zn y Pb

Cepas	Cr (VI)			Zn			Pb		
	1 ppm	3 ppm	5 ppm	1 ppm	3 ppm	5 ppm	1 ppm	3 ppm	5 ppm
B150	R	R	T	R	T	T	R	N	N
B152	R	R	T	R	R	T	R	R	N
B153	R	R	N	R	R	T	R	R	N
B157	R	R	N	R	R	N	R	R	N

R: Resistencia T: Tolerancia N: No tolerancia

Realizado por: Guamán, E. 2022.

En base a lo expuesto se seleccionó *Delftia acidovorans*, como inóculo y Cromo hexavalente como sustrato para la experimentación, dado que se ha registrado que el género *Delftia* tiene la capacidad de degradar múltiples contaminantes orgánicos, así como metales tóxicos como Pb (III), Se y Cr (VI), pudiendo ser considerado como buenos candidatos para el diseño de tecnologías para la limpieza de ambientes contaminados (Ubalde et al.,2012, p.597). Para ejemplificar lo mencionado se destaca la investigación realizada por (Morel et al.,2011, p.65) donde se determinó que *Delftia acidovorans* tiene la capacidad de reducir el 50 % de Cr (VI), presumiblemente a Cr (III), a una concentración de 100 mg/L. De la misma manera, (Caravaglia et al.,2010) reportó la biotransformación de Cr (VI) por *D. acidovorans* RA y *Delftia sp. JD2*, ambos aislados de ambientes naturales contaminados.

3.3. Producción de bioelectricidad

3.3.1. Pruebas de ensayo

Las pruebas de ensayo tuvieron una duración de 12 días, el día 1 inició con un voltaje de 83, 87 y 50,52 mV para el agua residual industrial (AR) y para el agua residual sintética (AS) respectivamente, sin embargo, en el transcurso de la experimentación hubo fluctuaciones de los

mismos, alcanzando así en el día 12 un valor máximo de 154,31mV y un valor mínimo de 49,18 mV para el agua residual industrial, de la misma manera para el agua residual sintética en día 9 alcanzó un valor máximo de 233,59 mV, como se describe en el Grafico 2-3.

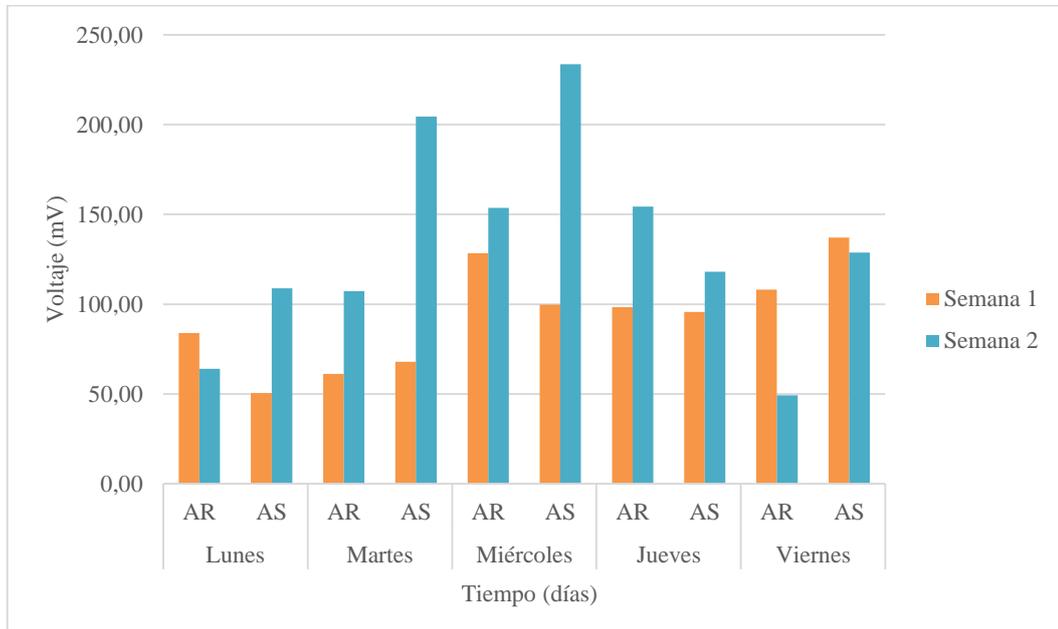


Gráfico 2-3: Voltajes de las pruebas de ensayo

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.3.2. Pruebas con CCMs de flujo continuo

La implementación del sistema de adquisición de datos permitió obtener valores de voltaje cada minuto por 15 días de manera automática, dando como resultado 21600 datos por cada CCM, mismos que se agruparon y promediaron por ciclos de 24 horas, obteniendo un total de 15 datos promedio por CCM (Grafico 3-3).

Por consiguiente, la celda AR1 tuvo una tendencia a mantenerse constante, mostro un pico máximo de voltaje en el día 14 con 287,46 mV y un pico mínimo en el día 7 con 97,01mV. La celda AR2 mostró voltajes altos en comparación con las de sus repeticiones, sin embargo, decayó en el transcurso del monitoreo obteniendo así un pico máximo de 391,67 mV en el día 1 y un pico mínimo de 186,02 mV en el día 15. Por otro lado, para la celda AR3 se mostró un pico máximo de 395,63 mV en el día 9 y un pico mínimo de 107,62 mV en el día 15. Las fluctuaciones de voltaje según (Revelo et al.,2015, p.84) pueden estar relacionadas con la actividad microbiana en la biopelícula anódica, donde actúan tanto las bacterias electrogénicas como las nativas del sustrato empleado.

Con respecto a la celda AS1, se observó el pico máximo de voltaje en el día 13 con 188,86 mV y el pico mínimo en el día 9 con 17,83 mV. La celda AS2 mostro los valores más altos y tendencia

a mantenerse estable con relación a sus repeticiones, el pico máximo de voltaje se observó en el día 4 con 224,39 mV y el pico mínimo en el día 7 con 72,68 mV. Por último, la celda AS3 tuvo tendencia a decaer con un pico máximo de 200,12 mV en el día 1 a un unto mínimo en el día 15 con 41,30 mV.

Como se puede evidenciar existe una mayor producción de energía en las CCMs con agua residual industrial (AR1, AR2, AR3) en comparación con las CCMs con agua residual sintética (AS1, AS2, AS3), esto se debe gracias a que existe una estrecha relación entre la cantidad de materia orgánica con la producción de energía, (Molares & Zambrano, 2021, p.101) indican que, al aumentar la concentración del sustrato aumenta el voltaje y la corriente, esto puede ser el resultado de una mayor bioactividad de las bacterias electrogénicas y el aumento de la conductividad de la solución del ánodo debido a sus requerimientos nutricionales (Sharma , 2010, p.1846).

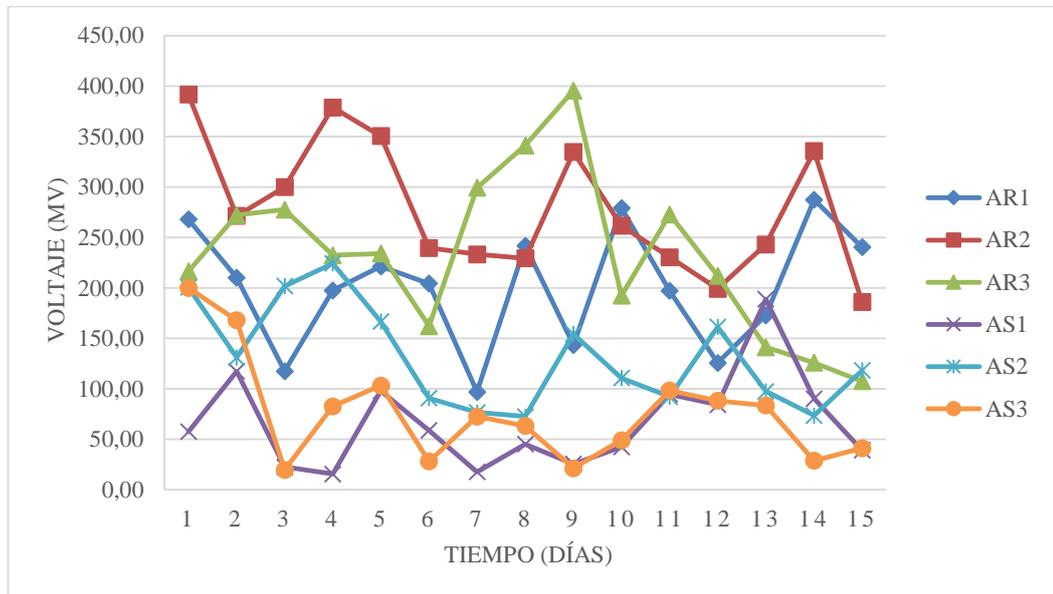


Gráfico 3-3: Voltaje generado por las CCMs.

Realizado por: Guamán, E, 2022.

Simultáneamente se destaca las dos CCMs que generaron mayor estabilidad y producción de energía tanto para el agua residual industrial (AR), como para el agua residual sintética (AS), durante los 15 días con un promedio total de 279,04 mV y 131,54 mV respectivamente (Gráfico 4-3).

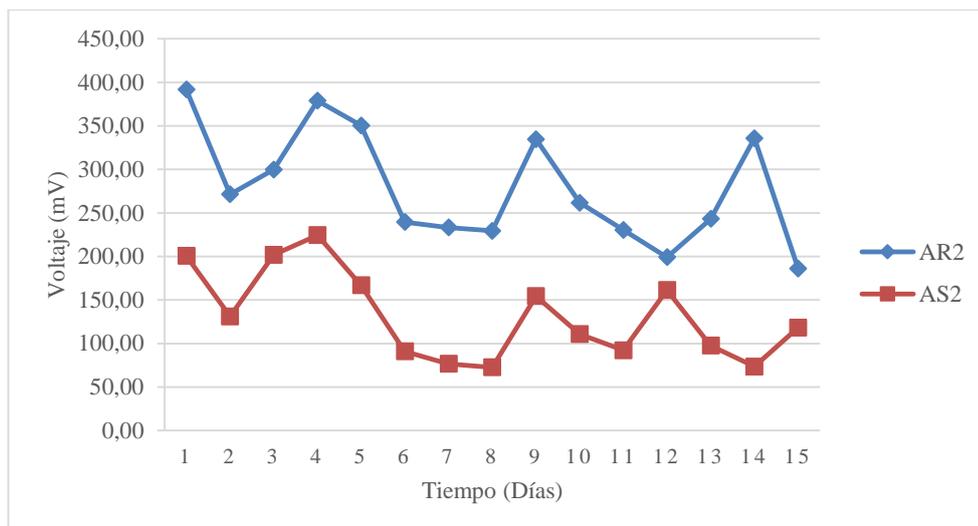


Gráfico 4-3: Voltaje máximo generado en las CCMs con AR y AS

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.3.3. Remoción de contaminantes

Con el fin de visualizar de mejor manera el comportamiento de la bacteria en presencia de cromo hexavalente, tanto de forma sintética como cruda, se realizó análisis antes y después del tratamiento, estos parámetros que se compararon con el TULSMA, Libro VI, Anexo I, Tabla 11: Límites de descarga al sistema de alcantarillado público.

Como se observa en la Tabla 16-3 los parámetros analizados se encuentran fuera de los límites permisibles, sin embargo, existe una considerable remoción de los contaminantes una vez aplicado las CCMs con *D. acidovorans* como inóculo. Por consiguiente, para aceites y grasas, DBO5, DQO, color, sulfatos, sólidos suspendidos y Cr (VI) se alcanzó una remoción de 41,74 %, 75,20%, 74,82%, 77,48%, 71,70%, 63,83% y 50 % respectivamente. En comparación con sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales se tienen valores casi similares no obstante, la combinación de ambos sistemas genera un aumento en la remoción de contaminantes, (Martínez et al., 2016, p.268) evaluaron el desempeño de un sistema combinado por un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) y una celda de combustible microbiana (CCM) en el tratamiento de agua residual de baja carga, así como la generación de bioelectricidad de manera simultánea, donde se encontró una remoción del 88%, 79% para DQO y sólidos suspendidos (SS) respectivamente, cuyos datos fueron superiores a los observados en el reactor RAFA (76 % DQO y 73 % SS) y en la CCM (60 % DQO y 40 % SST) cuando estos fueron operados de manera individual.

En cuanto al agua residual sintética se obtuvo una remoción de Cr (VI) alta con un porcentaje de remoción de 81,30 % (Tabla 17-3), datos que coinciden con la investigación de (Xafenias, et al., 2015, p.123), donde utilizó *Shewanella oneidensis* como inóculo y obtuvo un porcentaje de reducción del

Cr (VI) de 80%, por otro lado (Zhou, et al.,2020, p.8), reportó un 56,26% de remoción, de estos resultados indican que las CCMs son capaces de reducir metales pesados de manera efectiva. Factores como el tiempo de retención hidráulica (TRH) y pH inciden en la remoción de contaminantes, un TRH alto afecta de manera favorable en el crecimiento de bacterias generadoras de electricidad en la cámara anódica y, por lo tanto, brinda una mayor eliminación de DQO. (Wang et al.,2011, p. 9256). En cuanto al pH (Zhongjian, 2008, p. 1354) evidencio como este influenciaba en la reducción del Cr (VI) y la producción de energía en una CCM de doble cámara, donde se obtuvo que a un pH 2, se produjo una remoción de 49.1% de cromo. Esto reveló que el pH bajo tuvo un efecto positivo en la generación de energía cuando se usó dicromato de potasio como aceptor de electrones en la CCMs.

Tabla 16-3: Análisis Físico-químico del agua residual del proceso de curtición

Parámetros	Método	Unidad	ANTES	DESPÚES	% Remoción	Límite Permissible
			Resultado	Resultado		
Aceites y grasas	EPA 418,1	mg/L	1991,14	1160	41,74	100
DBO5	STANDARD METHODS 5210 – B	mg O2/L	5460	1354	75,20	250
DQO	STANDARD METHODS 5220-D	mg/L	11240	2830	74,82	500
pH	PE-LSA-01	mg/L	3,17	3,79		5-9
Cromo Hexavalente	STANDARD METHODS 3500 - Cr - 3111B	mg/L	0,5	0,25	50,00	0,5
Color	STANDARD METHODS 2120 C	Upt-co	12325	2775	77,48	-
Sulfatos	STANDARD METHODS 4500 - SO4 – E	mg/L	26500	7500	71,70	400
Sólidos Suspendidos	STANDARD METHODS 25040 D	mg/L	622	225	63,83	220

Realizado por: Guamán, E, 2022.

Tabla 17-3: Análisis Físico-químico del agua residual sintética de Cr (VI)

Parámetro	Método	Unidad	ANTES	DESPÚES	% Remoción	Límite Permissible
			Resultado	Resultado		
Cromo Hexavalente	STANDARD METHODS 3500 - Cr - 3111B	mg/L	1	0,187	81,30	0,5

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.3.4. pH

Las CCMs AR1, AR2, AR3 iniciaron con un pH ácido de 3,51, mismo que varió en el transcurso de su funcionamiento alcanzando un pico final de 4,04; 3,88 y 4,03 respectivamente. En el caso de las CCMs AS1, AS2, AS3 inicio con un pH neutro de 7,16 y finalmente al día 15 del monitoreo el pH terminó en 7,74; 7,78 y 7,85 respectivamente (Grafico 5-3).

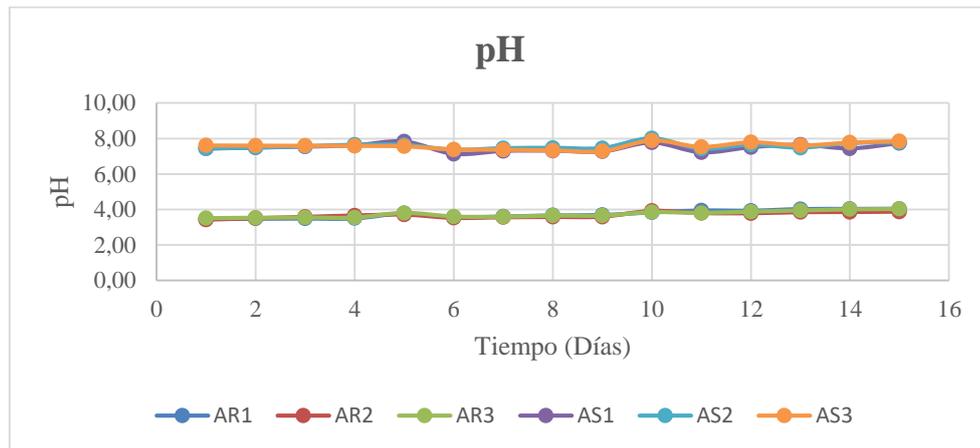


Gráfico 5-3: pH de las CCMs

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.4. Análisis Estadístico

3.4.1. Análisis de normalidad

Este análisis nos permitió determinar si los datos se ajustan o no a una distribución normal, con el fin de implementar posteriormente pruebas paramétricas o no paramétricas. Por tanto:

H_0 = Los datos siguen distribución normal

H_1 = Los datos no siguen distribución normal

Nivel de significancia " α " = 0.05

A través del análisis del test de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov^a nos proyectó un p-value de 0,018 y 0,006 respectivamente siendo inferior al nivel de significancia de 0,05 (Tabla 18-3); por ende, se rechaza la hipótesis H_0 y se acepta la H_1 ; indicándonos que los datos de las CCMs no siguen una distribución normal con un 95 % de confiabilidad, por tanto, se procedió a aplicar una prueba no paramétrica para su comparación.

Tabla 18-3: Pruebas de normalidad : Kolmogorov-Smirnov^a y Shapiro-Wilk.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Voltaje corriente directa	,104	90	,018	,959	90	,006

Realizado por: Guamán, E, 2022.

3.4.2. Prueba U de Mann-Whitney

Esta prueba no paramétrica es útil cuando nos interesa probar la igualdad de medias de 2 poblaciones que siempre no son normales y sus muestras son independientes. El valor de U de Mann-Whitney fue de 117,000 y el valor de p (Sig. asintót. (bilateral) es 0,000 al ser un valor menor que 0,05 se rechaza la Ho y se acepta la H1, por lo tanto, existen diferencias significativas (Tabla 20-3), es decir existe diferencias en la producción de voltaje de corriente directa al usar como sustrato agua residual industrial (AR) y agua residual sintética (AS).

Tabla 19-3: Rango de la Prueba U de Mann-Whitney

Rangos				
	Tipo	N	Rango promedio	Suma de rangos
Voltaje corriente directa	AR	45	65,40	2943,00
	AS	45	25,60	1152,00
	Total	90		

Realizado por: Guamán, E, 2022.

Tabla 20-3: Prueba de hipótesis

Estadísticos de prueba ^a	
	Voltaje corriente directa
U de Mann-Whitney	117,000
W de Wilcoxon	1152,000
Z	-7,226
Sig.asintótica(bilateral)	,000

a. Variable de agrupación: Tipo

Realizado por: Guamán, E, 2022.

Esto se debe en gran parte a las condiciones de pH en los sustratos, información se correlaciona con la investigación reportada por (Veer et al.2009,p. 7554) donde se evaluó el comportamiento de las CCMs en diferentes condiciones de pH: ácido ,neutro y alcalino, donde se registró una máxima conversión de sustrato a corriente en condiciones ácidas, mostrando un microambiente factible para un rendimiento energético efectivo, en comparación a condiciones de pH neutro y alcalino, lo que concuerda con esta investigación dado que el AR se encontraba en condiciones ácidas y el

AS a un pH neutro. Además, al trabajar con Cr (VI) en ambientes ácidos, provoca un mayor potencial de oxidación (1,33V), lo que da como resultado una mejora en la generación de corriente (Uddin et al.,2020, p. 11468).

CONCLUSIONES

Se identificó molecularmente las bacterias *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas geniculate*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Citrobacter freundii*, luego de realizar las pruebas de tolerancia y toxicidad se seleccionó a *Delftia acidovorans* como inóculo dada su capacidad de resistir y remover cromo hexavalente.

Las CCMs con configuración de cámara simple de flujo continuo lograron remover cargas contaminantes presentes en un agua residual cruda de una industria de curtiembre y generar voltaje de corriente directa de manera simultánea. Por consiguiente, las CCMs con AR produjeron un porcentaje de reducción de DBO Y DQO de 75,20% y 74,82% respectivamente. Además, con respecto al voltaje en el mejor de los casos, las CCMs AR2 y AS2 generaron un voltaje máximo de 395,63 mV y 224,39 mV respectivamente.

La aplicabilidad de las CCMs en la eliminación del cromo hexavalente se evidenció a través del agua residual proveniente de la industria de curtiembre “El Alce” del cantón Guano, provincia de Chimborazo reduciéndolo así de 0,5 ppm a 0,25 ppm, de la misma manera para el caso del AS se redujo de 1 ppm a 0,187 ppm en un periodo de 15 días en ambos casos, perfilándose así como una solución a los problemas ambientales ocasionados por las descargas de aguas contaminadas dando el primer paso a la búsqueda de sistemas sustentables.

RECOMENDACIONES

Estandarizar un protocolo distinto de extracción de ADN para las muestras de las que no se pudo realizar una identificación correcta.

Considerar mejoras en el diseño de la configuración CCMs tomando en cuenta el sistema de bombeo, dado que no debe ingresar oxígeno a la cámara anódica.

Proponer futuras investigaciones a diferentes concentraciones de Cromo hexavalente como de metales pesados asociados, de igual manera estudios relacionados a la sinergia entre métodos convencionales y CCMs para el tratamiento de aguas residuales.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO, A. et al. “El cromo como elemento esencial en los humanos”. Rev. costarric. cienc. méd [en línea], 2002, (Costa Rica) 23 (1-2) p. 55. [Consulta: 11 agosto 2021]. ISSN 0253-2948. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482002000100006&lng=en&nrm=iso>

ARUN, S. et al. “Algae based microbial fuel cells for wastewater treatment and recovery of value-added products”. Renewable and Sustainable Energy Reviews [en línea], 2020, (India) 132 (C). [Consulta: 11 agosto 2021]. Disponible en: <https://ideas.repec.org/a/eee/rensus/v132y2020ics1364032120303324.html>

BERMUDEZ, M., & BERMAL, E. Implementación de una celda de combustible microbiana a escala laboratorio para generación de energía eléctrica [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. 2018, p. 37. [Consulta: 11 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6695/1/6131003-2018-1-IQ.pdf>

CABRERA, L. Bioadsorción de iones de plomo y cromo procedentes de aguas residuales utilizando la cáscara del tomate de árbol (*Solanum Betaceum*) [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. 2017. pp. 16-20. [Consulta: 19 abril 2021]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14460/1/UPS-CT007124.pdf>

CASTRO et al. “Biología molecular en medicina: nuevas estrategias que originan nuevos desenlaces”. Medicina & Laboratorio [en línea], 2014, (Colombia) 20(1-2), p.17. [Consulta: 27 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2014/myl141-2b.pdf>

CARRASCO, F. et al. “Identificación de microorganismos”. Instituto de Investigaciones Agropecuarias [en línea], 2020, (Chile) 428, pp. 157-182. [Consulta: 24 agosto 2021]. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/67169>

CASTIBLANCO, Y., & PERILLA, A. Remoción de cromo hexavalente en aguas residuales proveniente de procesos de cromado de plásticos en empresas de Bogotá [en línea] (Trabajo de

titulación). (Pregrado) Universidad Cooperativa de Colombia. 2019 .pp. 47 [Consulta: 22 abril 2021]. Disponible en: https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/15550/1/2019-Remocion_Cromo_Hexavalente.pdf.

CONDORÍ, A., & TORRES, G. Biodegradación de la materia orgánica y producción de Bioelectricidad en Celdas de Combustible Microbiano (CCM) a partir del agua residual doméstica [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad Peruana Unión, Lima, Perú. 2019 .pp. 59-66 [Consulta: 6 septiembre 2021]. Disponible en: file:///C:/Users/User/Downloads/Aracel_Tesis_Licenciatura_2019.pdf

CORNEJO, A. Estudio del microbioma presente en celdas de combustible microbianas [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico En Electroquímica, S.C., Santiago de Querétaro, México. 2017. pp. 17-21. [Consulta: 08 agosto 2021]. Disponible en: https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/314/1/Electromicrobiolog%C3%ADa%20del%20microbioma%20presente%20en%20celdas%20de%20combustible%20microbianas_rees.pdf

CORNEJO, A. et al. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos.* [en línea] México, 2014. [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

CHACÓN, R. Tratamiento de aguas residuales y producción de hidrógeno con un sistema bioelectroquímico asistido con dos diferentes membranas [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Centro de investigación en materiales avanzados, Chihuahua, México. 2018. pp. 23-28. [Consulta: 05 septiembre 2021]. Disponible en: <https://207.249.117.35/jspui/bitstream/1004/2132/1/TESIS%20FINAL.pdf>

CHÁVEZ PORRAS, Á. “Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo”. Ingenierías Universidad de Medellín [en línea], 2010, (Colombia) 9 (17), pp. 41-50. [Consulta: 22 abril 2021]. ISSN 1692-3324. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-33242010000200004&script=sci_abstract&tlng=es

FORBES, B., et al. *Diagnostico Microbiologico* [en línea]. 12 Edición. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana, 2009. [Consulta: 23 marzo 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA3&dq=identificacion+microbiana&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwih8svUkcjvAhUNTjABHVCiCLAQ6AEwAnoECAMQA#v=onepage&q=identificacion+microbiana&f=false>.

GÓMEZ, J., & ACEVEDO, D. Manual de Laboratorio Microbiología” [en línea]. Universidad del Valle, Cali-Colombia. 2009. pp. 20-30. [Consulta: 19 septiembre 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/krtr>

GONZÁLEZ, R. et al. “Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico”. [en línea]. Universidad Nacional Autónoma de México, 2020, (México), pp.35-45. [Consulta: 19 septiembre 2021]. ISBN: 978-607-30-3771-6. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

GUAMBO, A. & ALLAUCA, G. Estudio de la influencia de la demanda bioquímica de oxígeno de aguas residuales en la producción de bioelectricidad de una Celda de Combustible Microbiano [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2020. p.37. [Consulta: 28 marzo 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4075/1/236T0130%20UDCTFCl.pdf>

GUAMBO, A. et al., “Revisión del desarrollo de la tecnología MFC para la producción de bioelectricidad a partir de residuos orgánicos – ESPOCH”. *Researchgate* [en línea], 2016, (Ecuador).[Consulta: 18 marzo 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/syezpuh>

GUTIÉRREZ, S. *Fundamentos de las ciencias básicas aplicada a la odontología.* [en línea]. 1ª ed. Bogota- Colombia.: Pontificia Universidad Javeriana, 2006. [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/y87vf>

HE, L. et al. “Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*”. [en línea] 2017, (Beijing) 71, pp. 388–403. [Consulta: 14 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032116311248?via%3Dihub>

KIM, M. et al. “Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes”. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* [en línea], 2014, (República de Corea) 64, pp. 346-351. [Consulta: 26 abril 2021]. ISSN 17401526. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.059774-0>

LOGAN, B.E., “Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells”. *Nature Reviews Microbiology* [en línea], 2009, (United States) 7 (5), pp. 375-381. [Consulta: 26 abril 2021]. ISSN 17401526. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/24242488_Logan_BE_Exoelectrogenic_bacteria_that_power_microbial_fuel_cells_Nat_Rev_Microbiol_7_375-381.

LOGROÑO, M. et al. “A Terrestrial Single Chamber Microbial Fuel Cell-based Biosensor for Biochemical Oxygen Demand of Synthetic Rice Washed Wastewater”. *Sensores* [en línea], 2016, (Ecuador) 16(1), p.101. [Consulta: 21 marzo 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/s16010101>

LÓPEZ, J. Desarrollo de una celda de combustible microbiana (CCM) para aplicación en tratamiento de aguas residuales [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C., Santiago de Querétaro, México. 2014. p. 11. [Consulta: 05 septiembre 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/ihh4q>

MADIGAN, M., et al. *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. 10 España: Prentice Hall Iberia; 2003. p. 1089.

MARTÍNEZ, C., et al. “Tratamiento de agua residual doméstica mediante un reactor RAFA y una celda microbiana de combustible”. *Revista internacional de contaminación ambiental* [en línea], 2016, (México) 32 (3), pp. 267-279. [Consulta: 05 abril 2022]. ISSN 0188-4999. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/article_plus.php?pid=S0188-49992016000300267&tlng=es&lng=es

MAZO, M. Identificación molecular de bacterias electrogénicas a partir de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad. [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2020.

pp.20-36. [Consulta: 28 marzo 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14069/1/236T0482.pdf>

MENESES, Y., et al. “Remoción de cromo en aguas residuales industriales mediante el uso de biomasa de *Spirulina sp.*, sedimentación primaria y precipitación química”. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. [en línea], 2019, (Colombia) 10 (1), pp. 141-152. [Consulta: 19 septiembre 2021]. ISSN: 21456097. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2326>

MINISTERIO DEL AMBIENTE. Estudio para conocer los potenciales impactos ambientales y vulnerabilidad relacionada con las sustancias químicas y tratamiento de desechos peligrosos en el sector productivo del Ecuador [en línea], 2013, pp. 127-139. [Consulta: 13 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART11.pdf>

MONTOYA, N., et al. “Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana”. Ciencia & Tecnología para la Salud Visual y Ocular [en línea], 2010, (Colombia) 8 (1), pp. 81-84. [Consulta: 20 abril 2021]. ISSN 1692-8415. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5599145>.

MORALES, M. & CABRERA, X. “Las celdas de combustible, una alternativa viable para el desarrollo de tecnologías más limpias”. Cubana de Química [en línea], 2006, (Cuba) 18 (1), p. 141. [Consulta: 25 abril 2021]. ISSN 0258-5995. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543688062.pdf>

MUHAMMAD, M. et al. “Microbial fuel cells as an alternative energy source: current status” Biotechnology & genetic engineering reviews [en línea], 2018, (Pakistán) 34(2), pp. 216–242. [Consulta: 06 septiembre 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/01vp8>

MULERO, P. *ARN ADN - Kits Purificación* [blog]. 2019. [Consulta: 06 julio 2021]. Disponible en: <https://www.apmedical.es/producto/limpieza-adn-clean-up-pcr-kit-250-columnas/>

NEGRONI, M. *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica* [en línea]: Medica paramericana S.A.S., 2009. [Consulta: 10 septiembre 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Gxmui->

vjZBgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

NOGAR, A. & FLENSBORG, K. “Apropiación de los recursos energéticos y estrategias de eficiencia”. *Turydes: Turismo y Desarrollo* [en línea], 2016, (Argentina) 9 (21). [Consulta: 22 abril 2021]. ISSN 1988-5261. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/turydes/21/recursos.html>.

NÚÑEZ, A., “Bacterias productoras de electricidad” *Actualidad SEM* [en línea], 2008, (Madrid) pp. 34-45. [Consulta: 15 septiembre 2021]. Disponible en: <http://crinoidea.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/45/Geobacter.pdf>

PARADA, R. *Electroforesis: fundamento, técnica, para qué sirve, ejemplos*[blog]. 2020. [Consulta: 22 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/electroforesis/>

PINILLA, G. *Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones*. [en línea]: El Manual Moderno Colombia S.A.S., 2019. [Consulta: 22 agosto 2021]. Disponible en: <https://n9.cl/aju3pk>

RAI, H., et al. “Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment.” *Crit. Rev. Environ. Sc. Technol* [en línea], 2005, (India) 35, pp.219-238. [Consulta: 19 septiembre 2021]. ISSN 1064-3389. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/10643380590917932?scroll=top&needAccess=truev>

RABAEY, K., J. et al. “Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities”. *ISME Journal* [en línea], 2007, (United States) 1 (1), pp. 9-18. [Consulta: 5 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ismej20074>

REDONDO, J. *Microorganismos electrogénicos: Células de Combustible Microbianas* [en línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado) Universidad de Alcalá, Madrid-España. 2018. pp. 12-30 [Consulta: 24 marzo 2021]. Disponible en: <https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/37227/TFG-Redondo-Iriarte-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

REVELO, D.M. et al. “Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica”. *Informacion Tecnologica* [en línea], 2013, (Colombia) 24 (6), pp.19-24. [Consulta: 20 marzo 2021]. ISSN 07168756. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000600004&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

ROMERO, A. et al. “Bacterias, fuente de energía para el futuro”. *Tecnura* [en línea], 2012, (Colombia) 16 (32), pp.118-143. [Consulta: 14 septiembre 2021]. ISSN 0123-921X. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-921X2012000200011&lng=en&nrm=iso

SORIA, M. *Análisis de secuencias de ADN (método Sanger). Programas para diseño de primers para PCR* [blog]. 2016. [Consulta: 14 septiembre 2021]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/agro.uba.ar/bioinformatica/Home/clase-6-primers-para-pcr>

SUN, G. et al. “La importancia de los parámetros del proceso de iniciación y el diseño del reactor para maximizar la eficiencia de las pilas de combustible microbianas”. *Microbiología y biotecnología aplicadas* [en línea], 2014, (Gembloux) 98 (6), pp.2415–2427. [Consulta: 14 agosto 2021]. Disponible en: <https://sci-hub.ru/10.1007/s00253-013-5486-5>

TAHERNIA, M. et al. “Characterization of Electrogenic Gut Bacteria”. *ACS Omega*. [en línea], 2020, (United States) 5(45), pp. 29439-29446. [Consulta: 8 agosto 2021]. Disponible en: <chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhancedreader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fpubs.acs.org%2Fdoi%2Fpdf%2F10.1021%2Facs.omega.0c04362>

TAMAY, DL. et al. “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”. *Investigación en Discapacidad*. [en línea], 2013, (México) 2(2), pp.70-78. [Consulta: 26 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

UBALDE, M., et al. “The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies” [en línea] *Current microbiology*, 2012, (Uruguay) 64 (6), pp. 597-603. [Consulta: 12 marzo 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-012-0108-5>

UDDIN, M., et al. “Microbial fuel cells for bioelectricity generation through reduction of hexavalent chromium in wastewater: A review” *International Journal of Hydrogen Energy* [en línea], (2020), (República de Corea) 46 (20), pp. 11458- 11481. [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319920322722?via%3Dihub>

UMBARILA, P., ALFONSO, F., & RIVERA, J. “Importancia de las energías renovables en la seguridad energética y su relación con el crecimiento económico”. *Investigación Agraria y Ambiental* [en línea], 2015, (Colombia) 6(2), p. 231. [Consulta: 17 marzo 2021]. ISSN 2145-6453. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5628790&info=resumen&idioma=SPA>.

VEER, R. et al. “Behavior of single chambered mediatorless microbial fuel cell (MFC) at acidophilic, neutral and alkaline microenvironments during chemical wastewater treatment” *International Journal of Hydrogen Energy* [en línea], 2009, (India) 34(17), pp. 7547–7554. [Consulta: 15 abril 2022]. ISSN : 0360-3199. Disponible en: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-909d303d-24e5-3a57-8f3c-27abdd82eeb0/tab/summary>

VELÁZQUEZ, L et al. “Extracción y purificación de ADN”. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* [en línea], 2014, (México) 1, p. 14 [Consulta: 26 agosto 2021]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>

WANG, H., & REN, Z. J. “A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology”. *Biotechnology advances* [en línea], 2013, (United States) 31(8), pp. 1796–1807. [Consulta: 4 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975013001699?via%3Dihub>

WANG, Y.K.et al. “Development of a novel bioelectrochemical membrane reactor for wastewater treatment”. *Environ Sci Technol* [en línea], 2011, (China) 45(21), pp. 9256-61. [Consulta: 28 marzo 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21978391/>

ZHI, W. et al. “Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review”. *Bioresource Technology* [en línea], 2014, (United States) 171,

pp. 461- 468. [Consulta: 29 agosto 2021]. ISSN 0960-8524. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852414012127?via%3Dihub>

ZHONGJIAN, L. et al. “Electricity production during the treatment of real electroplating wastewater containing Cr6+ using microbial fuel cell.” *Process Biochemistry* [en línea], 2008, (China) (43), pp. 1352-1358. [Consulta: 1 abril 2022]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Electricity-production-during-the-treatment-of-real-Li-Zhang/e77ac4fe09aafc92d7601f89c30fac090e2d726b>

ZHUWEI, D. et al. “Una revisión del estado del arte sobre las pilas de combustible microbianas: una tecnología prometedora para el tratamiento de aguas residuales y la bioenergía”. *Avances en biotecnología* [en línea], 2007, 25 (5), pp. 464–482. [Consulta: 1 septiembre 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582720/>



DIRECCION DE BIBLIOTECAS
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACION
 Ing. Jonathan Parreño Uquillas MBA
ANALISTA DE BIBLIOTECA 1

ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN – IDGEN –MODIFICADO DE BARRENDERO (2008)

1. Tomar aproximadamente 50 mg de muestra en un tubo de 1.5 ml con 3 perlas de vidrio, estériles, Adicional 500 μ L de buffer de extracción (2,5% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl [pH 8.0] y 2 μ L de β -mercaptoetanol.
2. Agitar/ macerar la muestra vigorosamente usando BeadBeater a velocidad máxima 2 veces, hasta que el tejido quede pulverizado.
3. Incubar en baño María a 60 °C por 30 minutos, mezclar invirtiendo cada 10 minutos.
4. Añadir 500 μ L de cloroformo, congelado y homogenizar en Vortex por 30 segundos. Dejar reposar unos minutos.
5. Centrifugación a 14,500 xg 5- 10 minutos.
6. Tomar el sobrenadante cuidando no mezclar las fases, aproximadamente 400 μ L, y colocarlos en un nuevo tubo estéril de 1.5 ml.
7. Añadir al sobrenadante un volumen igual de etanol absoluto frio, 150 μ L de Acetato de sodio 3M y 300 μ L ml de etanol 70% filtrado, para precipitar el ADN. Dejar a -20 °C toda la noche.
8. Centrifugación a 14.500 xg 11-17 minutos y eliminar el sobrenadante.
9. Realizar 2 lavados con etanol 70%, usar aproximadamente 200 μ L. Pipetear y descartar el etanol por inversión.
10. Secar el pellet durante 15 a 20 minutos, se puede usar la cámara de flujo laminar.
11. Resuspender el pellet de ADN con 25 μ L de agua DEPC, añadir 1 μ L de RNAsa y dejar incubar 30 minutos a 37°C.
12. Almacenar las muestras a -20 °C hasta su posterior uso.
13. Visualizar el ADN en un gel de agarosa al 1%, 90 V x 35 minutos o 100V x 30 minutos (TBE).

ANEXO B: ANÁLISIS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de bacterias – Evelyn Guamán

Informe No.: A-244

Técnico Responsable: Francisco Garrido

Fecha: 31/08/2021

Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de Identidad	NºAccesión
B150	A1-40	568	77.6	<i>Delftia acidovorans</i>	16S	100	LC462156.1
B152	A2-40	738	79.7	<i>Pseudomonas geniculata</i>	16S	100	LC507977.1
				<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		100	MN240936.1
B153	B1-40	1252	90	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16S	99.44	CP040432.1
B155	C1-20	625	80.8	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.36	KM222629.1
B156	C2-40	981	96.6	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	100	CP049015.1
B157	D1-40	927	89	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	97.31	MT197334.1

Nota: Los resultados con un porcentaje de identidad menor al 99% no permiten asegurar que el aislado corresponde a esa especie. Es posible que se trate de una especie no descrita o una especie para la cual no hay referencias en la base de datos.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

ANEXO C: ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL CRUDA DE LA INDUSTRIA DE CURTIEMBRE ANTES DE INCORPORAR A LAS CCMs



LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES

Laboratorio de ensayo acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 17-012



N° SE: 093 – 21

INFORME DE ANALISIS

NOMBRE: Evelyn Maribel Guamán Chango **INFORME N°:** 093 – 21
EMPRESA: Proyecto de Tesis ESPOCH **N° SE:** 093 – 21
DIRECCIÓN: Riobamba
TELÉFONO: 0985734786 **FECHA DE RECEPCIÓN:** 02 – 12 – 21
FECHA DE INFORME: 09 – 12 – 21

NÚMERO DE MUESTRAS: 1, Agua residual, Curtiduría **TIPO DE MUESTRA:**
IDENTIFICACIÓN: MA – 133 -21 **Agua residual**

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de la obtención de las muestras.

RESULTADO DE ANÁLISIS

MA – 133-21

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* pH	-	PE-LSA-01	3,17	N/A	02- 12- 21
* DQO	mg/l	STANDARD METHODS 5220 - D	11240	N/A	02- 12- 21
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	5460	N/A	02- 12- 21
* Aceites y grasas	mg/l	EPA 418,1	1991,14	N/A	02- 12- 21
* Cromo hexavalente	mg/l	STANDARD METHODS 3500 - Cr - 3111B	0,5	N/A	02- 12- 21
* Color	Upl-co	STANDARD METHODS 2120 C	12325	N/A	02- 12- 21
* Sulfatos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - SO4 - E	26500	N/A	02- 12- 21
* Sólidos Suspendidos	mg/l	STANDARD METHODS 2540 D	622	N/A	02- 12- 21

MÉTODOS UTILIZADOS: Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN.

REGLA DE DECISIÓN ACORDADA: No aplica

RESPONSABLES DEL ANÁLISIS:

Dr. Juan Carlos Lara R.
Benito Mendoza T., Ph.D.


Dr. Juan Carlos Lara R.
TÉCNICO I S A



ANEXO D: ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL CRUDA DE LA INDUSTRIA DE CURTIEMBRE DESPUÉS DE INCORPORAR A LAS CCMs



LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



Laboratorio de ensayo acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 17-012

Nº SE: 014-22

INFORME DE ANALISIS

NOMBRE: Evelyn Maribel Guamán Chango¹

INFORME Nº 014 - 22

EMPRESA: Proyecto de Tesis ESPOCH¹

Nº SE: 014 - 22

DIRECCIÓN: Riobamba¹

TELÉFONO: 0985734786¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 14 - 03 - 22

FECHA DE INFORME: 21 - 03 - 22

NÚMERO DE MUESTRAS: 1, Agua residual, Curtiduría

TIPO DE MUESTRA:

IDENTIFICACIÓN: MA - 022-22 Curtiduría¹

Agua residual

Condiciones Ambientales	T máx:	25 °C
	T mín:	10°C

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de las muestras.

RESULTADO DE ANÁLISIS

MA - 022-22

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* pH	-	PE-LSA-01	3,79	N/A	14-03-22
* DQO	mg/L	STANDARD METHODS 5220 - D	2830	N/A	14-03-22
* DBO5	mg O ₂ /L	STANDARD METHODS 5210 - B	1354	N/A	16-03-22
* Aceites y grasas	mg/L	EPA 418,1	1160	N/A	14-03-22
* Cromo hexavalente	mg/L	STANDARD METHODS 3500 - Cr - 3111B	0,25	N/A	14-03-22
* Color	Upl-co	STANDARD METHODS 2120 C	2775	N/A	14-03-22
* Sulfatos	mg/L	STANDARD METHODS 4500 - SO ₄ - E	7500	N/A	14-03-22
* Sólidos Suspendidos	mg/L	STANDARD METHODS 2540 D	225	N/A	14-03-22

MÉTODOS UTILIZADOS: Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN.

**ANEXO E: ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA
DESPUÉS DE INCORPORAR A LAS CCMs**



LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



Laboratorio de ensayo acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 17-012

Nº SE: 015-22

INFORME DE ANALISIS

NOMBRE: Evelyn Maribel Guamán Chango¹

INFORME Nº 015 - 22

EMPRESA: Proyecto de Tesis ESPOCH¹

Nº SE: 015 - 22

DIRECCIÓN: Riobamba¹

TELÉFONO: 0985734786¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 14 - 03 - 22

FECHA DE INFORME: 21 - 03 - 22

NÚMERO DE MUESTRAS: 1, Agua sintética

TIPO DE MUESTRA:

IDENTIFICACIÓN: MA - 023-22 Agua sintética¹

Agua sintética

Condiciones Ambientales	T máx:	25 °C
	T mín:	10 °C

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de las muestras.

RESULTADO DE ANÁLISIS

MA - 023-22

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* Cromo hexavalente	mg/L	STANDARD METHODS 3500 - Cr - 3111B	0,187	N/A	14 - 03 - 22

MÉTODOS UTILIZADOS: Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 23ª EDICIÓN.

REGLA DE DECISIÓN ACORDADA: No aplica

RESPONSABLES DEL ANÁLISIS:

Dr. Juan Carlos Lara

Ing. José Latorre S.

ANEXO F: MEDICIÓN DE VOLTAJE DE LAS CCMs DE FLUJO CONTINUO

DÍAS	AR1	AR2	AR3	AS1	AS2	AS3
1	268,01	391,67	216,40	57,70	200,60	200,12
2	210,28	271,40	272,29	117,38	131,12	168,05
3	117,62	299,89	277,65	22,70	201,86	19,83
4	197,62	378,85	232,40	15,71	224,39	82,73
5	221,33	350,49	234,20	97,92	166,81	103,27
6	204,46	239,61	162,13	58,96	90,86	28,20
7	97,01	233,34	299,24	17,83	76,70	72,70
8	241,87	229,39	341,14	45,35	72,68	63,36
9	143,59	334,76	395,63	25,74	154,36	21,47
10	279,20	261,67	192,43	42,51	110,70	49,18
11	197,09	230,46	272,95	94,58	92,23	98,43
12	125,86	199,15	212,20	84,32	161,38	88,31
13	172,89	243,13	141,22	188,86	97,62	83,53
14	287,46	335,74	125,97	90,41	73,55	28,79
15	240,49	186,02	107,62	39,26	118,29	41,30



**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 17 / 05 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Evelyn Maribel Guamán Chango</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Ingeniería en Biotecnología Ambiental</i>
Título a optar: <i>Ingeniera en Biotecnología Ambiental</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>



0896-DBRA-UTP-2022