



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

**“IDENTIFICACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LA CEPA
PSEUDOMONA spp EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE
MICROBIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD
A DESARROLLARSE EN EL CENTRO DE ENERGÍAS
ALTERNATIVAS (ESPOCH), 2016”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: SILVIA ALEXANDRA PAÑA VALLEJO
DIRECTOR: DR. CELSO RECALDE

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, Silvia Alexandra Paña Vallejo

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación “IDENTIFICACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LA CEPA PSEUDOMONA spp EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOELECTRICIDAD A DESARROLLARSE EN EL CENTRO DE ENERGÍAS ALTERNATIVAS (ESPOCH), 2016”, de responsabilidad de la señorita: Silvia Alexandra Paña Vallejo ha sido prolijamente revisada por los miembros del Tribunal de trabajo de titulación. Quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Celso Recalde

.....

.....

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing. Cristina Calderón

.....

.....

MIEMBRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Silvia Alexandra Paña Vallejo con Cédula N. ° 060433905-1, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba 27 de julio de 2017

Silvia Alexandra Paña Vallejo

060433905-1

Yo, Silvia Alexandra Paña Vallejo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Proyecto de Titulación y el patrimonio intelectual del Proyecto de titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

SILVIA ALEXANDRA PAÑA VALLEJO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por darme la vida y permitirme culminar esta etapa profesional, una de mis metas planteadas. A mis padres Mary y Gonzalo por ser las personas que en el transcurso de mis estudios siempre han sabido guiarme por el camino del bien y haber hecho de mí, una persona con principios y valores. A mis hermanos Iván, Raúl y Byron quienes en toda circunstancia siempre han estado junto a mi dándome sus consejos y afecto. A mi novio José Andrés que día a día ha sabido brindarme su amor y apoyo incondicional. A mi cuñada Susana por siempre darme ánimos para no rendirme, mis sobrinas Monserrath y Analy que con su afecto y sus sonrisas son capaces de iluminar mi día. A mis tíos Emy, René, Orfa y Wilson que, aunque un poco lejos de distancia siempre estuvieron pendientes de mí, ya sea con un mensaje o una llamada.

Silvia P.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Celso Recalde director de mi trabajo de investigación por haberme apoyado en el planteamiento y desarrollo del mismo.

A la Ing. Cristina Calderón por ofrecerme su ayuda en el transcurso del desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al Ing. Alex Guambo por guiarme en el transcurso de mi trabajo de titulación y haberme brindado su amistad sincera.

A la Dra. Aída Fierro que en el desarrollo de mi investigación supo compartir sus conocimientos conmigo y haberme abierto las puertas del laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias.

A Monserrat Cevallos, Cristian Chicaiza y Cristian Camacho por ser grandes amigos que han sabido ayudarme en todo momento y enseñarme, que las buenas amistades son pocas, pero de verdad.

Silvia P.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes de investigación:.....	5
1.2. Bacteria	7
1.2.1. <i>Bacterias Gram positivas y Gram negativas</i>	7
1.3. Género pseudomona	8
1.3.1. <i>Generalidades</i>	8
1.3.2. <i>Temperatura óptima de crecimiento para el género Pseudomona</i>	8
1.3.3. <i>Hábitat:</i>	8
1.4. <i>Pseudomona aeruginosa:</i>	9
1.4.1. <i>Pseudomona aeruginosa y su capacidad biorremediadora</i>	9
1.5. Bioelectricidad.....	10
1.6. Bacterias electrogénicas.....	10
1.6.1. <i>Tipos o mecanismos de bacterias electrogénicas</i>	11
1.6.2. <i>Pseudomona aeruginosa conocida como una bacteria electrogénica</i>	12
1.7. Celda de combustible microbiano (CCM)	12
1.7.1. <i>Origen de las CCMs</i>	12
1.7.2. <i>Principio de las CCMs</i>	12
1.7.3. <i>Importancia de los cultivos puros y mixtos en una CCM</i>	14
1.7.4. <i>Tipos de CCMs</i>	15
1.7.5. <i>Estructura de una CCMs</i>	16
1.7.6. <i>Ánodo</i>	16

1.7.7.	<i>Cátodo</i>	17
1.7.8.	<i>Importancia del sustrato en una MFC</i>	17
1.7.9.	<i>Características de las membranas de intercambio proteónico (MIC)</i>	18
1.7.10.	<i>Biofilm</i>	18
1.8.	Agua Residual y su relación con las CCMs	19
1.9.	Beneficios de usar una CCM	20
1.10.	Aplicaciones de las CCMs	20

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	22
2.1.	Muestreo de la cepa bacteriana	22
2.2.	Adecuación de la cepa bacteriana	23
2.3.	Identificación morfológica de la cepa bacteriana	24
2.3.1.	<i>Tinción Gram</i>	24
2.4.	Pruebas bioquímicas para la caracterización de género Pseudomona	27
2.4.1.	<i>Medio SIM</i>	27
2.4.2.	<i>Medio citrato según Simons</i>	28
2.4.3.	<i>Medio KLIGLER</i>	29
2.4.4.	<i>Medio Urea</i>	30
2.5.	Pruebas Extras de constatación de especie	30
2.5.1.	<i>Crecimiento bacteriano a 42°C</i>	31
2.5.2.	<i>Licuefacción de la gelatina</i>	31
2.6.	Configuración de la celda de combustible microbiano (CCM)	32
2.6.1.	<i>Pretratamiento de las MIC:</i>	33
2.6.2.	<i>Preparación del agua residual sintética</i>	34
2.6.3.	<i>Prueba ensayo</i>	35
2.6.4.	<i>Prueba final</i>	36
2.6.5.	<i>Instalación de los sensores y transmisión de datos de las CCMs</i>	38
2.7.	Análisis de nitratos del agua sintética	40

2.8.	Cálculos:.....	41
2.8.1.	<i>Calculo de Nitrato de potasio (KNO₃):</i>	41
2.8.2.	<i>Cálculos de Nitratos (NO⁻³):</i>	41
2.9.	Lugar experimental.....	42
2.10.	Materiales experimentales.....	42
2.11.	Materiales de laboratorio	43
2.12.	Planteamiento de hipótesis	44

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1.	Muestreo y reactivación de la cepa bacteriana.....	45
3.2.	Tinción de Gram	45
3.3.	Características del Género Pseudomona	46
3.4.	Identificación bacteriana de la especie del género pseudomona spp. mediante pruebas bioquímicas	47
3.5.	Pruebas extras de constatación de especie	49
3.6.	Diseño de la celda de combustible microbiano (CCM).....	50
3.7.	Preparación de agua residual sintética	52
3.8.	Análisis del agua residual sintética después del experimento	52
3.9.	Pruebas ensayo	53
3.10.	Prueba Final en la producción de bioelectricidad.....	54
3.11.	Discusión de Resultados.....	56
3.12.	Prueba de Hipótesis	57
3.12.1.	<i>Hipótesis Estadística</i>	57
3.12.2.	<i>Análisis de normalidad</i>	57
3.12.3.	<i>Análisis de homocedasticidad</i>	58
3.12.4.	<i>Test Anova de un factor</i>	58
3.12.5.	<i>Comparaciones de medias a través del test de tukey</i>	59
3.13.	Presentación de resultados	60

CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES:	63
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 CCMs de cámara sencilla y doble de acorde al tipo de sustrato	14
Tabla 1-2 Componentes de los agares nutritivos.....	24
Tabla 2-2 Características del agua residual sintética.....	35
Tabla 3-2 Equipos y materiales usados en el trabajo investigativo.....	42
Tabla 4-2 Materiales, reactivos, sustancias y equipos utilizados en el laboratorio	43
Tabla 1-3 Resultados de las Pruebas generales del género <i>pseudomona</i>	46
Tabla 2-3 Resultados de las Pruebas Bioquímicas	47
Tabla 3-3 Resultados de las Pruebas de constatación de especie.....	49
Tabla 4-3 Preparación de disoluciones de la muestra a inocular en la MFC	52
Tabla 5-3 Resultados de los análisis de nitratos en el agua sintética contaminada antes y después del experimento.	53
Tabla 6-3 Resultados del resumen estadístico para la celda CCM1 a 30ppm.....	55
Tabla 7-3 Resultados del resumen estadístico para la celda CCM2 a 60ppm.....	55
Tabla 8-3 Resultados del resumen estadístico para la celda CCM3 (control) solo bacteria con agua pura (tesalia).	55
Tabla 9-3 Resultados del test Anova de un factor.....	58
Tabla 10-3 Resultado de comparaciones a través del test de tukey	59
Tabla 11-3 Datos promedio del monitoreo total de 15 días	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Celda de Combustible Microbiano.....	13
Figura 2-1 CCMs de cámara simple y cámara doble	15

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3 Producción de bioelectricidad a través de un medio biológico y químico.....	54
Gráfico 2-3 Bioelectricidad total producida en el transcurso de 15 días.....	56
Gráfico 3-3 Producción de bioelectricidad en base a promedios final (Minitab).....	61

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2 Cepa bacteriana <i>Pseudomona spp.</i>	23
Fotografía 2-2 Muestreo de la cepa bacteriana	23
Fotografía 3-2 Crecimiento de la cepa <i>Pseudomona spp.</i>	24
Fotografía 4-2 Colorantes aplicados en la tinción de Gram.	25
Fotografía 5-2 Pasos aplicados a la tinción de Gram.....	26
Fotografía 6-2 Tubos esterilizados para la realización de pruebas bioquímicas.....	27
Fotografía 7-2 Medio SIM con bacteria	28
Fotografía 8-2 Siembra de la bacteria en medio SIM.	29
Fotografía 9-2 Medio SIM con bacteria	29
Fotografía 10-2 Medio SIM con bacteria	30
Fotografía 11-2 Crecimiento bacteriano en agar nutritivo a 42°C	31
Fotografía 12-2 Aplicación de la prueba de hidrólisis de gelatina a 23°C.....	32
Fotografía 13-2 Proceso del tratamiento de la membrana de intercambio catiónico (MIC).....	33
Fotografía 14-2 Monitoreo de las pruebas de CCM con tratamiento químico y biológico	35
Fotografía 15-2 CCMs armadas y desinfectadas	36
Fotografía 16-2 CCMs armadas y desinfectadas	36
Fotografía 17-2 Colocación del agua residual sintética.....	37
Fotografía 18-2 Fibra de carbono tratada (ánodo)	38
Fotografía 19-2 Inyección de los 5 mL de glucosa.....	38
Fotografía 20-2 Lugar de monitoreo CEAA.....	39
Fotografía 21-2 DAQ NI 6009.....	40
Fotografía 22-2 Conexión de la DAQ NI 6009 a las CCM y al procesador	40
Fotografía 1-3 a) Crecimiento bacteriano con agar Mueller, b) Crecimiento microbiano con agar Nutritivo, y c) Crecimiento bacteriano con agar Eosin.	45
Fotografía 2-3 Observación de la cepa bacteriana en el microscopio.....	46
Fotografía 3-3 Resultados de las Pruebas Bioquímicas en medios Sim, Simons, Kligler y Urea.	48
Fotografía 4-3 Crecimiento bacteriano positivo de la cepa bacteriana <i>pseudomona spp</i> a 42°C.....	49
Fotografía 5-3 Resultado de la hidrólisis positiva de gelatina de la cepa bacteriana a 23°C	50
Fotografía 6-3 Posición de la celda para purgar gases y alimentación con sustrato	51
Fotografía 7-3 Posición de monitoreo de la celda	52
Fotografía 8-3 Fotómetro.....	53

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Muestreo de cepa bacteriana *Pseudomona spp.*

ANEXO B. Adecuación y replicación de la cepa *Pseudomona spp* en el laboratorio clínico-ESPOCH

ANEXO C. Identificación de la cepa *Pseudomona spp.*

ANEXO D. Monitoreo de las CCMS

INDICE DE ABREVIATURAS

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
UNACH	Universidad Nacional de Chimborazo
ICITS	Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes
CEAA	Centro de Energías Alternativas y Ambiente
MFCs	Microbial Fuel Cell
CCMS	Celdas de Combustible Microbiano
(ARS)	Agua residual sintética
NO-3	Nitratos
NO-2	Nitritos
H₂O	Agua
gr	Gramos
L	Litros
mL	Mililitros
H₂S	Ácido sulfhídrico
°C	Grados centígrados
V	Voltio
cm	Centímetros
MIC	Membrana de intercambio catiónico
MIP	Membrana de intercambio protónico
Min	Minutos
kW	Kilowatt
EE.UU.	Estados Unidos

RESUMEN

Se identificó la especie de la cepa *Pseudomona spp.* y se determinó la producción de bioelectricidad que fue capaz de producir en una celda de combustible microbiano (CCM). La muestra fue tomada del ICITS-UNACH, la misma que fue trasladada y adecuada en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias-ESPOCH. Para la siembra y réplica bacteriana se utilizó agares Mueller y Nutritivo a una temperatura de 30°C. Una vez replicada la bacteria, se realizó pruebas bioquímicas (cuatro medios) más dos pruebas adicionales a 42°C y 23°C, al transcurrir las 48 horas se determinó que la cepa bacteriana *Pseudomona spp.* pertenece a la especie *aeruginosa*. La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias - ESPOCH, se utilizó seis CCMs; de las cuales, a cuatro se aplicó tratamiento y los dos restantes fueron el grupo control, el material en que fueron impresas fue acrílico de 3mm de espesor, que contenía una capacidad volumétrica de 125 mL. La CCM se conformaba por dos cámaras una anódica (bacterias) y otra catódica (oxígeno) cada una poseía un electrodo que servía como intercambiador de electrones. El sustrato usado fue agua residual sintética a base de nitrato de potasio a una concentración de 30 y 60 ppm de nitratos. Se monitoreo a través de un sistema de adquisición de datos durante 15 días, que permitió medir el voltaje de salida y almacenar en un ordenador. Se determinó que la cepa bacteriana es capaz de producir bioelectricidad a partir de una fuente de nitrógeno y mientras más alta es la concentración del contaminante mayor será la producción de bioelectricidad en los rangos probados; a una concentración de 60 ppm se obtuvo una producción promedio final de 0,105 V, a 30 ppm se obtuvo 0,059 V y como grupo control se obtuvo 0,048 V. Se recomienda usar las CCMs para producir electricidad a base de compuestos químicos y determinar la diferencia existente con las CCMs que producen electricidad a base de compuestos biológicos.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <BACTERIA (*Pseudomona spp.*)> <IDENTIFICACIÓN> <BIOELECTRICIDAD> <NITRATOS> <AGUA RESIDUAL SINTÉTICA> <CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO (CCMS)>

ABSTRACT

Identifies the species of strain *Pseudomona spp.* and the production of bioelectricity was determined that was able to produce in a microbial fuel cell (MFC), the sample was taken from ICITS-UNACH, which was transferred and suitable in the clinical laboratory of the Faculty of Sciences-ESPOCH. For bacterial sowing and replication Mueller and Nutritive agares were used at a temperature of 30°C. Once the bacteria were replicated, biochemical tests (four media) plus two additional tests were performed at 42 ° C and 23 ° C, after 48 hours the bacterial strain *Pseudomona spp.* Belongs to the *aeruginosa* species. The research was done in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Sciences - ESPOCH, six MFCs were used; of which, four were treated and the remaining two were the control group, the material in which they were printed was 3mm thick acrylic, containing a volumetric capacity of 125 mL. The MFC was conformed by two chambers an anodic (bacterium) and another cathodic (oxygen) each one possessed an electrode that served like exchanger of electrons. The substrate used was synthetic waste water based on potassium nitrate at a concentration of 30 and 60 ppm of nitrates. It was monitored through a data acquisition system for 15 days, which allowed to measure the output voltage and store in a computer. It was determined that the bacterial strain is capable of producing bioelectricity from a source of nitrogen and the higher the contaminant concentration the higher the bioelectricity production in the tested ranges; at a concentration of 60 ppm at the final average yield of 0.105 V was obtained, at 30 ppm 0.059 V was obtained and a control group was obtained 0.048 V. It is recommended to use MFCs to produce electricity based on chemical compounds and to determine the difference existing whit cells that produce electricity based on biological compounds.

Key words: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <BACTERIA (*Pseudomona spp.*)>
<IDENTIFICATION> <BIOELECTRICITY> <NITRATES> <SYNTHETIC RESIDUAL
WATER> <MICROBIAL FUEL CELL (MFCs)>

INTRODUCCIÓN

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA:

El continuo crecimiento poblacional a nivel mundial y el desarrollo industrial, han venido desmejorando la calidad de los recursos naturales sobre los que sustenta la vida, en especial sobre el recurso agua y la preservación del medio ambiente, lo cual es una necesidad que exige hacer frente a dos de las principales preocupaciones, como lo es, la demanda energética y la elevada generación de aguas residuales sin tratamiento (Asprilla y Niza 2015, p.457).

Para conocer más a fondo cada una de las problemáticas que acarrea el crecimiento poblacional se tiene como una de las preocupaciones que el uso de combustibles fósiles aparte de ser recursos finitos, han provocado y siguen provocando serios problemas de contaminación ambiental y calentamiento global (Falcón, Lozano y Juárez 2009, pp. 63-64). Encontrar fuentes de energía alternas a los combustibles fósiles es uno de los principales problemas que afronta la sociedad en nuestros días, debido a que se estima que el consumo de energía mundial crecerá 56% para 2040 (García, García y Sánchez 2015, p.102). Cabe mencionar que dentro de los problemas que conlleva el uso inadecuado y excesivo de los recursos fósiles son: la destrucción del paisaje, polución en las aguas, vertidos de petróleo, produce la lluvia acida y la contaminación urbana; la cual acaba con los bosques, asfixia ciudades y por ende acorta la vida humana (Mejía, Vásquez y González 2012, p. 119).

Por otro lado, existe una creciente problemática de contaminación ambiental y sanitaria principalmente en las fuentes hídricas, limitando así la disponibilidad del líquido vital y por ende restringiendo su uso. Dicha contaminación ambiental se produce cuando en el medio ambiente aparecen determinados agentes físicos, químicos o biológicos que generan efectos nocivos en los seres vivos, poniendo en peligro el equilibrio natural y por ende la vida misma. Lo cual se debe a la inadecuada recolección, tratamiento y disposición de las aguas residuales. A pesar del amplio conocimiento de los efectos de la contaminación sobre la salud y el medioambiente, la disposición final de las aguas residuales en la mayoría de los casos se realiza sin ningún tipo de tratamiento; en unos casos se debe al alto costo que implican las tecnologías convencionales y avanzadas, en otros, a la falta de conciencia en cuanto al peligro que esto representa para la naturaleza y por ende a la humanidad. La escasez del agua potable y el incremento en la producción de aguas residuales, nos enfrentan al reto de conseguir tratamientos adecuados para solucionar dichos

problemas Es por eso que en la actualidad muchas investigaciones se basan en la búsqueda de tecnologías para reducir emisiones al ambiente causadas por el constante uso de las energías fósiles y la biorremediación del líquido vital, que es un recurso continuamente contaminado haciéndolo cada vez más escaso y de alto costo para potabilizarlo (Asprilla y Niza 2015, p.457).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO:

Existen numerosos grupos de investigación que a nivel mundial se enfocan en buscar nuevas fuentes de energía que ayuden de manera sustentable a mitigar la contaminación ambiental producida por los recursos fósiles y el déficit existente del líquido vital (agua), que cada vez es más escaso. En el transcurso de los últimos años se han venido desarrollado diversas tecnologías que se centran en el uso de la energía acumulada en la biomasa de los desechos, para posteriormente ser redirigida a otras formas de energía como lo son: metanogénesis (CH₄), biohidrógeno (H₂) y bioelectricidad (Falcón, Lozano y Juárez 2009, p.63). De las cuales existe una que en particular ha llamado la atención en ámbitos de investigación que son conocidas como las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs), esta es una biotecnología emergente que podría contribuir de manera directa a solucionar dos de las problemáticas por la cuales está atravesando el ambiente y por ende la vida humana como lo son: la crisis energética y la disponibilidad de agua que no se encuentre contaminada (García, García y Sánchez 2015, p. 103).

Dentro de esta biotecnología los microorganismos se encuentran jugando un papel de importancia en lo referente a la transferencia de electrones, este es un proceso que se da en la célula misma de la siguiente manera: de la célula al electrodo y del electrodo a la célula; por lo tanto, al momento que se estudia sus interacciones se podría realizar la identificación y el aprovechamiento de las funciones de transformación energética que cada cepa bacteriana podría presentar o desarrollar. Ocurre así, la producción de energía renovable y aportando significativamente en el conocimiento básico con miras al futuro en el mejoramiento del desempeño de los sistemas bioelectroquímicos. Además, se podría explorar consorcios que resulten eficaces para las funciones de generación de bioelectricidad, biorremediación de sistemas afectados y remoción de materia orgánica. Los cuales si se encuentran sometidos a diferentes condiciones ambientales pueden permitir que los investigadores generen novedosos bioánodos y/o biocátodos para la producción de bioelectricidad (Revelo y Hurtado 2013, p.18).

El aprovechamiento de las propiedades de absorción de la especie *Pseudomona* en lo que se refiere a la generación de energía será estudiada con el fin de mejorar la calidad de vida ambiental con miras sustentables. La desnitrificación biológica es producida por microorganismos desnitrificantes heterotróficos, como, por ejemplo: *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bacterium spp.* y *Bacillus spp.* En su mayoría son anaerobios facultativos. En la reacción de desnitrificación estos organismos pasan de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), luego a hiponitrito (N_2O^-), monóxido de dinitrógeno (N_2O) y luego a nitrógeno molecular (N_2). Estas reacciones son mediadas por enzimas como la nitrato reductasa. La velocidad de la desnitrificación biológica depende de las condiciones del suelo. Generalmente ocurre cuando el oxígeno es limitante y en condiciones de alta humedad. También influyen el pH, temperatura, concentración de nitratos y condiciones redox. La desnitrificación biológica se presenta cuando existen condiciones muy específicas para determinadas reacciones químicas, dentro de los diferentes grupos nitrogenados. En función a estas reacciones se pierde N a la atmósfera (Paredes 2013, p.9).

Numerosas bacterias de los géneros *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella spp.* son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno contribuyendo sustancialmente a que los agricultores economicen en fertilizantes nitrogenados conservando el ambiente (Lara, Villalba y Oviedo 2008, pp.7-8). Lo dicho anteriormente admite realizar la respectiva investigación de esta especie para determinar qué tan efectiva sería esta cepa bacteriana como cultivo puro en el aprovechamiento bioenergético, tomándola así, como una estrategia para la toma rápida de decisiones en un futuro con respecto a la producción de energía limpia.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar la producción de bioelectricidad de la especie *Pseudomona spp.* ubicada en una celda de combustible microbiano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar y analizar la especie *Pseudomona spp.* para propósitos de producción de bioelectricidad en una celda de combustible microbiano (CCM).
- ✓ Establecer la configuración adecuada de una CCM para la utilización de la cepa *Pseudomona spp.*
- ✓ Analizar y evaluar el tipo de sustrato y medio utilizado en una CCM, conforme la implementación de un sistema de monitoreo del voltaje producido.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de investigación:

Es notable que en la actualidad existe un creciente gasto energético a nivel mundial, debido al acelerado crecimiento poblacional, que de forma directa o indirecta produce una sobre explotación de recursos fósiles y por ende el agotamiento del mismo sin pensar en los aspectos negativos que este uso genera al ambiente. Es por tal motivo que algunas investigaciones científicas se basan en el tema de producción de energía, una de esas tecnologías actualmente estudiadas a fondo son las llamadas celdas de combustible microbianas (CCMs) debido a sus múltiples aplicaciones potenciales, que no solo incluyen la producción sostenible de energía eléctrica a partir de compuestos biodegradables, sino también la generación de otros beneficios como la biosíntesis de compuestos de interés industrial a bajo costo (Logan y Rabaey 2012, p. 686) y la descontaminación de aguas residuales y de otros sustratos complejos en procesos de biorremediación. Las CCMs son sistemas bioelectroquímicos que convierten la energía química disponible en sustratos orgánicos o inorgánicos directamente en electricidad a través de la actividad metabólica de los microorganismos (Mora y Bravo 2017, p. 28).

El descubrimiento del principio de operación de las celdas de combustible es atribuido a Sr. William Grove en 1839, aunque se ha reportado que el científico Suizo Christian F. Shoenbein descubrió independientemente el mismo efecto al mismo tiempo, o incluso un poco antes (Rodríguez, Solorza y Hernández 2013, pp.3-6). El primer ejemplo de actividad eléctrica con microorganismos fue mostrado por Potter en 1910; en sus experimentos recurrió a cultivos de *E.coli* y electrodos de platino para generar corrientes eléctricas que por su pequeña magnitud pasaron desapercibidas para la comunidad científica. Este tipo de procesos no despertó el interés hasta la década de los años ochenta, con la utilización de mediadores redox solubles que aumentaban la producción de corriente y la potencia de estos sistemas. Los mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos por los microorganismos (Nuñez 2008, p. 35). Posteriormente en el año de 1937 Francis T. Bacon comenzó a trabajar en celdas de combustible con aplicación práctica, desarrollando una celda de 6 kW a finales de la década de 1950. Sin embargo, las primeras aplicaciones sistemáticas de las celdas de combustible se dieron

en los diversos programas espaciales de EE.UU. en la década de 1960 (Rodríguez, Solorza y Hernández 2013, p.5).

Es así que mediante las investigaciones realizadas a lo largo de la historia se ha podido conocer de mejor manera la estructura de las CCMs, las mismas que están formadas por dos cámaras una anaeróbica (contacto con sustratos y microorganismos) y otra aeróbica (contacto directo o parcial con el aire) en medio de las cuales contienen un electrodo, así como también poseen un separador para impedir el contacto de estos dos compartimentos (Revelo y Hurtado 2013, pp.17-18). Existe una gran variedad de sustratos que se han venido empleado en la cámara del ánodo para generar energía, en los cuales se incluye a la glucosa, acetato, celulosa, aguas residuales ya sean estas de origen industrial o municipal, entre otros. Un aspecto de gran importancia al usar esta biotecnología es la formación de la biopelícula que se forma a partir del consorcio o consorcios microbianos presentes en el ánodo y de manera especial en el aporte de energía (Lovley 2008, p.226).

Mediante diversos estudios que se han venido realizando de bioelectricidad con el uso de CCMs se conoce que los cultivos mixtos dentro de una CCM es capaz de generar mayor energía en comparación al uso de cultivos puros, lo cual se debe a las interacciones sinérgicas que ocurren en el ánodo y a la capacidad metabólica que posee cada cepa bacteriana (Falcón, Lozano y Juárez 2009, pp.63-64).

En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a inicios del año 2014 el Centro de Energías Alternativas y Ambiente(CEAA), se realizaron estudios basados en la producción de bioelectricidad en base a la tecnología de las CCMs; entre estos estudios encontramos los siguientes; La generación de electricidad de bacterias electrogénicas en CCMs de cámara simple, usando como inóculo suelo no intervenido y residuos sólidos orgánicos de la región amazónica de Ecuador y el segundo con suelo no intervenido y residuos sólidos orgánicos de la región alto andina de Ecuador (Logroño et al. 2016, pp.1-2). Otro de los estudios realizados en el CEAA fue el análisis de la influencia de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de las Aguas Residuales en la generación de energía sustentable y desde este enfoque es un preámbulo para el uso de estas celdas de combustible microbianas de una sola cámara terrestres (SMFC) como biosensores (Logroño et al. 2016). Posteriormente se realiza la generación de bioelectricidad microbiana con estiércol de ganado vacuno, mediante celdas de combustible microbiano, con la finalidad de utilizar estos residuos aplicando campos magnéticos a la biomasa y obtener mayor producción de energía a escala de laboratorio (Ríos 2016, p.16).

La transferencia extracelular de electrones es el proceso mediante el cual los electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos se transfieren a la superficie externa de la célula para de esta manera reducir un aceptor terminal de electrones extracelular (Falcón, Lozano y Juárez 2009, p.67).

Los estudios sobre esta biotecnología, indican que la densidad de potencia generada por una CCM no podría llegar a ser igual o mejor que la de una pila de combustible químico. Sin embargo, la posibilidad de descontaminar cuerpos de agua o degradar compuestos de desecho a bajo costo con la posibilidad de producir energía eléctrica en el proceso sin la generación de nuevos contaminantes representa un costo-beneficio de gran importancia (Zhou et al. 2013, p. 508).

1.2. Bacteria

Es un organismo microscopio de origen unicelular que carece de la presencia de un núcleo verdadero. Las bacterias pueden o no poseer flagelos otorgándole la característica de móviles o inmóviles, miden aproximadamente hasta 4 micras de largo. Se reproducen de forma rápida por fisión binaria, poseen la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes de estrés ambiental. A las bacterias se las puede encontrar en todos los lugares aun en los más inimaginables, se estima que aproximadamente el 1% de todas las bacterias existentes en la Tierra han sido identificadas y estudiadas, esto nos da a conocer la diversidad microbiana existente. Entre las formas de clasificación se encuentra la tinción en Gram positivas y Gram negativas (Egas & Tinajero, 2016, pp. 4-5).

En la actualidad debido a los estudios que se han ido realizando en el área investigativa se les da un gran valor a las bacterias ya que poseen una amplia aplicación industrial como el cuidado del medio ambiente, la producción de alimentos, la biotecnología, la genética molecular, etc. (Egas y Tinajero, 2016, pp. 4-5).

1.2.1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Para la identificación de bacterias a nivel microbiológico se aplica la técnica de coloración diferencial denominada tinción de Gram la cual fue desarrollada por el bacteriólogo Hans Christian Joachim Gramen en el año de 1844, esta técnica se fundamenta en la estructura de la pared celular de las bacterias. Al momento de aplicar esta técnica da como resultado una coloración azul/violácea nos da a conocer que son bacterias Gram positivas y en el caso de poseer una coloración rosácea es que se trata de una cepa bacteriana Gram negativa (Mollinedo & González, 2014, pp. 2010). Se conoce que en la pared celular de las bacterias Gram negativas la capa de

peptidoglicano es delgada y soluble en solventes orgánicos por lo cual no pueden retener el complejo cristal violeta/yodo y es decolorado por alcohol/cetona tiñéndose de la coloración rosácea de la safranina, por el contrario, en las Gram positivas la capa de peptidoglicano es gruesa y resistente a los solventes orgánicos por lo que tiende a mantener el color azul/violácea (Guedea, 2007).

1.3. Género pseudomona

1.3.1. Generalidades

La bacteria *Pseudomona* es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, estos microorganismos son Gram negativos (-), generalmente son aerobios estrictos, pero en algunos casos pueden usar el nitrato (NO_3) o la arginina como aceptores finales de electrones. Este género puede desarrollarse y crecer en medios líquidos observándose así la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas. Las especies que pertenecen al género *Pseudomona*, en general presentan crecimiento rápido y una gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de substratos. Dentro del género *Pseudomonas* se pueden encontrar algunas especies como; *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Hardalo y Edberg 1997, p. 48-50).

1.3.2. Temperatura óptima de crecimiento para el género Pseudomona

La mayoría de especies pertenecientes al género *Pseudomona* tiene una temperatura optima de crecimiento entre 30-37 °C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos que poseen elevado contenido de sales y en un rango de temperaturas comprendido entre 20-42 °C (Luján Roca 2014).

1.3.3. Hábitat:

Las especies de *Pseudomonas spp.* pueden vivir en numerosos hábitats, que van desde los ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos de diversos animales y plantas, incluyendo frutas y verduras. Esencialmente en aquellos que se encuentran en un rango de temperatura de 4-42 °C, un pH comprendido entre 4-8 y que contenga compuestos orgánicos ya sean simples o complejos. Los lugares de donde se pueden aislar bacterias pertenecientes al género *Pseudomona* es de:

muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como también de plantas y animales. Las mismas que deben encontrarse en condiciones aeróbicas, mesofílicas y pH neutro (López, 2016).

1.4. *Pseudomona aeruginosa*:

Pseudomona aeruginosa es la especie más patogénica dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, es un bacilo Gram-negativo aerobio con forma de bastoncillos posee una longitud de 1 a 3 μm de largo y de 0,5 a 1,0 de ancho. Esta bacteria es capaz de producir catalasa y oxidasa. Otro aspecto que presenta esta bacteria es que produce un pigmento llamado pioverdina la cual da un color amarillento o marrón amarillento (Hardalo y Edberg 1997, p.49). *P. aeruginosa* es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales se las puede encontrar en los respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas, etc. (Luján Roca 2014, p.466). *Pseudomona aeruginosa* es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno, sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C (Ochoa et al. 2013, pp.138-139).

La versatilidad que posee esta especie en especial es que le permite responder a condiciones ambientales variables y a menudo adversas. Es considerada por muchos como un organismo aeróbico, aunque es capaz de crecer anaeróbicamente si ciertos sustratos están disponibles, por ejemplo, nitratos o arginina. Posee una diversidad de mecanismos de intercambio genético, incluyendo transformación, transducción y conjugación, los cuales ayudan a esta especie adaptarse a las condiciones cambiantes mediante la adquisición de nueva información genética (Vasil 1986, p.800). Esta especie en la actualidad ha sido muy estudiada a nivel investigativo debido a que poseen características que las vuelve útiles para el tratamiento de la contaminación ambiental. Es de gran importancia conocer que diariamente todos nos encontramos en contacto con esta cepa bacteriana, ya que se encuentra en bajas cantidades ya sea en los alimentos o en algunos artículos de limpieza. Por tal motivo, pueden representar una amenaza para nuestra salud solamente en condiciones especiales (Hardalo y Edberg 1997, pp.48-50).

1.4.1. *Pseudomona aeruginosa* y su capacidad biorremediadora

La especie *pseudomona aeruginosa* debido a las características que posee ha mostrado ser de gran ayuda en el campo ambiental principalmente como un gran biorremediador es así que en estudios se muestra que forma parte de los microorganismos degradadores de petróleo el mismo que fue identificado por secuenciación de genes 16S-RNA (Benavides et al. 2006, pp.83-85). Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como es el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la

levadura *Saccaromyces cerevisiae* (Kashefi et al. 2001, p.3275). *Pseudomona aeruginosa* en otros estudios científicos mostró el potencial para tolerar múltiples contaminaciones tales como As (III), As (V), Cd, Co, Cu, Cr, Ni y Zn (Biswas et al. 2017, pp.2-3).

Otra capacidad que posee esta bacteria es que puede llevar a cabo procesos de desnitrificación pasando de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), luego a hiponitrito (N_2O_2^-), monóxido de dinitrógeno (N_2O) y finalmente a nitrógeno molecular (N_2) (Hernández y Labbé 2014, p. 159-160). A este proceso de reducción del nitrógeno (que actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración anaerobia) se denomina reducción disimilatoria del nitrógeno. La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permiten catabolizar los compuestos presentes en el medio (Nuñez 2008, p.36).

1.5. Bioelectricidad

Debido a los problemas ambientales que en la actualidad se está atravesando como lo es el calentamiento global, se busca que las nuevas tecnologías enfocadas a la producción de energía sean carbono-neutrales, es decir que solo liberen el carbono recién fijado a la atmósfera. En los últimos años se han desarrollado diversas tecnologías que se enfocan en la utilización de la energía acumulada en la biomasa de desechos, para ser redirigida a otras formas de energía que la humanidad pueda utilizar, como son: la metanogénesis (CH_4), el biohidrógeno (H_2) y la bioelectricidad (Logan y Regan 2006, p.513).

La bioelectricidad se define como la manera de generar energía a partir de biomasa: materia viva o derivada de seres vivos. En la actualidad gracias a estudios científicos encontramos la existencia de microorganismos electrogénicos capaces de generar bioelectricidad, esta se fundamenta en la generación directa de energía eléctrica o combustibles a través del uso de sistemas biológicos o partes de ellos (principalmente enzimas) en sistemas bioelectroquímicos. En estos últimos se convierten los sustratos orgánicos hasta electrones exocelulares y protones, los cuales pueden ser recuperados de forma directa para producir energía eléctrica; además de agua y dióxido de carbono (Ríos 2016, p.5).

1.6. Bacterias electrogénicas

Como suele ocurrir con muchas cuestiones científicas que hoy nos parecen novedosas, las primeras observaciones tuvieron lugar mucho tiempo atrás. Así, el primer ejemplo de actividad

eléctrica con microorganismos fue mostrado por Potter en 1910; que en sus experimentos recurrió a cultivos de *E. coli* y electrodos de platino para generar corrientes eléctricas que por su pequeña magnitud pasaron desapercibidas para la comunidad científica. Este tipo de procesos no despertó el interés hasta la década de los años ochenta, con la utilización de mediadores redox solubles que aumentaban la producción de corriente y la potencia de estos sistemas. Los mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos por los microorganismos (Nuñez 2008, p.35).

El gran avance investigativo en el campo de las CCMs ha producido interés en el descubrimiento de microorganismos electrogénicos los mismos que poseen la capacidad de transferir electrones al ánodo en ausencia de mediadores redox artificiales. Gracias a esta capacidad bacteriana se eliminan los problemas de toxicidad en dispositivos electroquímicos y los medios que son utilizados quedan restringidos al combustible orgánico que vaya a ser usado y al microorganismo que actúe como catalizador biológico (Nuñez 2008, p. 36).

1.6.1. Tipos o mecanismos de bacterias electrogénicas

Se puede distinguir dos tipos o mecanismos de bacterias electrogénicas:

1. Transferencia directa de electrones (o externa): es la transferencia de electrones al ánodo sin ayuda de mediadores externos. Se transfieren los electrones directamente al ánodo a través de proteínas de membrana como los citocromos tipo c, o de conductos proteicos denominados pili que sirven como nanoconductores. Microorganismos representantes de este grupo son *Shewanella spp.*, *Geobacter spp.* y *Rhodospseudomonas spp.* (Malvankar y Lovley 2012, p. 1039-1040).

2. Transferencia indirecta de electrones: es la transferencia de electrones al ánodo con ayuda de mediadores externos o mediadores producidos por ellos mismos. Estos mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos. Un ejemplo de microorganismos que realizan este tipo de transferencia de electrones es *Shewanella spp.* que produce riboflavinas, y las utiliza como mediadores para la transferencia de electrones., *Rhodospseudomonas ferrireducens*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobulbus propionicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* son otras de las bacterias que se conoce que son electrogénicas (Lawlor 2016, pp. 14-15).

1.6.2. Pseudomona aeruginosa conocida como una bacteria electrogénica

Se ha probado la existencia de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* electrogénica productora de fenazinas como mediadores redox, el principal representante de este grupo corresponde a las bacterias reductoras de Fe (III) del género *Shewanella*. Un reciente estudio publicado en los Proceedings of the National Academy of Sciences parece haber resuelto el enigma de la actividad electrogénica de *Shewanella*, al identificar a las riboflavinas secretadas por los biofilm como los mediadores redox que establecen la comunicación entre bacteria y electrodo (Nuñez 2008, p.36).

1.7. Celda de combustible microbiano (CCM)

1.7.1. Origen de las CCMs

El descubrimiento del principio de operación de las celdas de combustible es atribuido a Sr. William Grove en 1839, aunque se ha reportado que el científico Suizo Christian F. Shoenbein descubrió independientemente el mismo efecto al mismo tiempo, o incluso se cree que pudo ser un poco antes (Rodríguez, Solorza y Hernández 2013, pp.17-20). El primer ejemplo de actividad eléctrica con microorganismos fue mostrado por Potter en 1910; en sus experimentos que el realizo uso cultivos de E.coli y electrodos de platino para generar corrientes eléctricas que por su pequeña magnitud pasaron desapercibidas para la comunidad científica. Este tipo de procesos no era tomado en cuenta hasta la década de los años ochenta cuando despertó el interés de muchos investigadores, con la utilización de mediadores redox solubles que aumentaban la producción de corriente y la potencia de estos sistemas. Los mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos por los microorganismos (Nuñez 2008, p. 35).

Posteriormente en el año de 1937 Francis T. Bacon comenzó a trabajar en celdas de combustible con aplicación práctica, desarrollando una celda de 6 kW a finales de la década de 1950. Sin embargo, las primeras aplicaciones sistemáticas de las celdas de combustible se dieron en los diversos programas espaciales de EE.UU. en la década de 1960 (Rodríguez, Solorza y Hernández 2013, pp.18-20).

1.7.2. Principio de las CCMs

Las celdas de combustible microbianas(CCMs), se las conoce como MFC debido a sus siglas en inglés (Microbial Fuel Cell). Las CCMs son una biotecnología emergente que podría ayudar a solucionar dos de los problemas más importantes a los que se enfrenta la sociedad actual: la crisis

energética y la disponibilidad de agua. A la vez que es innovadora debido a sus versátiles y prometedoras aplicaciones medioambientales como la biorremediación, como biosensores, para el tratamiento de aguas residuales y para el suministro de energía para pequeños dispositivos (Logan y Regan 2006, p.513). Estas CCMs (Ver figura 1-1) funcionan como un dispositivo bio-electroquímico que convierte sustratos orgánicos en electricidad a través del metabolismo de los microorganismos electroquímicamente activos. El proceso que se va dando en una CCM se realiza de la siguiente manera: (a) los compuestos orgánicos se oxidan en la cámara anódica de la CCMs; (b) los electrones producidos por microorganismos se transfieren a los electrodos de origen, a continuación, al electrodo de conducto, a través de un circuito externo, (c) los protones se difunden en la membrana de intercambio de protones (PEM) del ánodo a la cámara del cátodo. (d) los protones y electrones tienden a reaccionar con el oxígeno atmosférico para el equilibrio electroquímico en la cámara del cátodo formando H₂O (Logroño et al. 2016, pp.1-2).

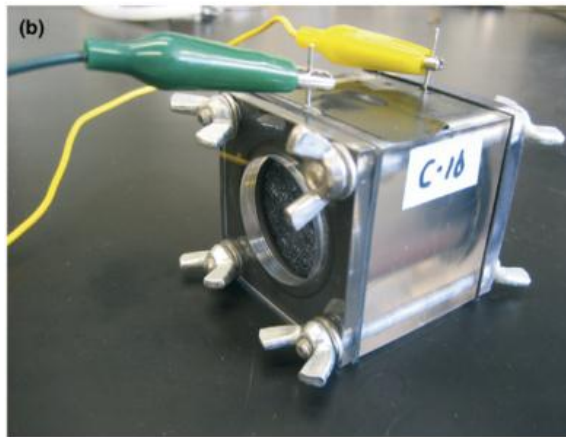


Figura 1-1. Celda de Combustible Microbiano

Fuente: (Logan y Regan 2006, p.513)

Las CCMs pueden configurarse como un dispositivo de doble o de una sola cámara, y pueden ser inoculados con sedimentos, suelos o aguas residuales. Los cultivos puros y mixtos han sido probados en la tecnología de las CCMs, que puede metabolizar una gama pequeña y amplia de sustratos en base a los cuales se elige la cámara más adecuada al estudio o aplicación (Ver tabla 1-1.). Los biosensores basados en CCMs han sido probados para la vigilancia de ácidos grasos volátiles, COD, Cromo, hierro, nitrato, acetato de sodio, componentes tóxicos, procesos de digestión anaeróbica, materia orgánica biodegradable, DBO, calidad del agua cadmio y Cu (II) (Logroño et al. 2016, p.2).

Tabla 1-1: CCMs de cámara sencilla y doble de acorde al tipo de sustrato

Características de la CCM	Bacterias	Sustrato
Cámara doble, MIP Nafion 117	Lodo anaeróbico	Acetato
Cámara sencilla, sin membrana	Mezcla de bacterias	Acetato, aguas residuales
Cámara doble, MIP Ultrex	Lodo metanogénico, anaerobio, granular	Glucosa
Cámara doble, MIC Nafion 117	Geobacter sulfurreducens KN400	Acetato
Cámara sencilla MIP Nafion 115	Lodo de digestor anaeróbico	Glucosa y acetato
Cámara doble, MIP Ultrex	Cultivo mixto	Glucosa

Realizado por: Paña Silvia

Fuente: (Revelo, Hurtado y Ruiz 2013, p.23)

1.7.3. Importancia de los cultivos puros y mixtos en una CCM

Un aspecto que hay que tomar en cuenta al momento de usar una CCM es la importancia que poseen los microorganismos en la aplicación de esta biotecnología, ya que se encuentran directamente relacionados con la transferencia de electrones, este proceso se da en la célula misma de la siguiente manera: de la célula hacia el electrodo y del electrodo a la célula. Por tal motivo, para mejorar el desempeño de estos sistemas se estudia de manera minuciosa algunos aspectos de las cepas bacterianas como sus interacciones, su identificación y se establece la función que cumplen en el proceso. Además, se investiga consorcios que resulten eficaces para las funciones de generación de electricidad, remoción de materia orgánica y biorremediación, a partir de muestras que sean tomadas directamente al ambiente y sometidas a diferentes condiciones. El investigar los puntos anteriormente mencionados puede permitir generar novedosos bioánodos y/o biocátodos (Revelo, Hurtado y Ruiz 2013, p.23).

A nivel práctico mediante investigaciones realizadas es mejor emplear cultivos mixtos debido a que estos generan altos potenciales de energía y su manejo resulta ser más económico y por ende menos exigente, debido a estos aspectos que se mencionan es que los lodos anaeróbicos y otras fuentes de comunidades microbiana han sido más usadas en las CCMs (Du, Li y Gu 2007. pp.466-567).

Entre los consorcios anódicos, encontramos que las bacterias más comunes pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter* y *Pseudomonas*, y dentro de estas se destacan las especies *S. putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*. Existen algunos estudios que resaltan otras especies bacterianas que realizan transferencia directa o utilizan mediadores (Fernando, Keshavarz y Kyazze 2013, p.1-2).

1.7.4. Tipos de CCMs

Existen muchas y diversas configuraciones posibles para la construcción de las CCMs (Figura 2.1). Entre las cuales encontramos las CCMs de cámara de doble compartimento construidos en una forma tradicional de “H”, consistiendo generalmente en dos botellas conectadas por un tubo que contiene un separador que es generalmente una membrana de intercambio catiónico (MIC) por ejemplo Nafion o Ultrex o simplemente un puente salino (Figura 2.1 F y A, respectivamente).

Otra configuración muy utilizada son las CCMs de cámara simple (Fig. 2.1 C y E, respectivamente). No es necesario poner el cátodo en agua, ni tampoco separar los compartimientos anódico y catódico cuando se emplea oxígeno como aceptor de electrones, ya que el compartimiento del cátodo se puede poner en contacto directo con el aire. Estas, por su carácter más económico y de mayor rendimiento energético, son las que se mayormente han sido utilizadas (Ramírez et al. 2010, p.36-37).

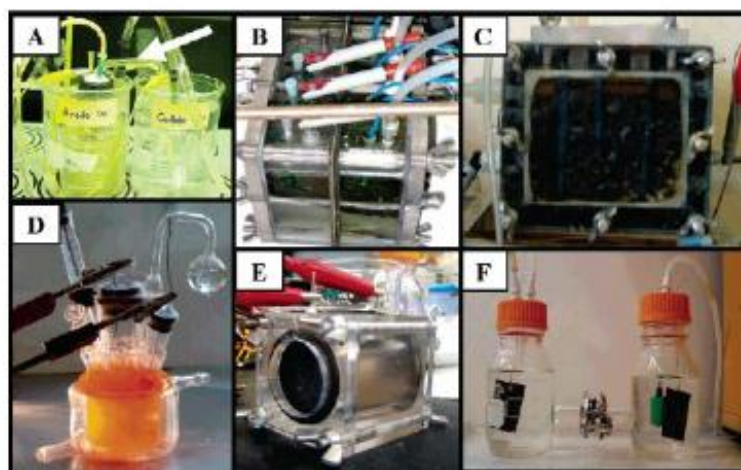


Figura 2.1. CCMs de cámara simple y cámara doble

Fuente: (Ramírez et al. 2010, p.36)

1.7.5. Estructura de una CCMs

Una CCM se encuentra formada por dos cámaras (Ver figura 3-1), una anaeróbica (ánodo) y otra aeróbica (cátodo) (Min et al. 2005, p.4962) en medio de estas dos cámaras existe una membrana separadora que impide que entren estas en contacto directo. La cámara anaeróbica posee en ella los sustratos orgánicos que, al oxidarse por acción del metabolismo de los microorganismos, generan electrones, protones y CO_2 . En cada una de las cámaras (ánodo y cátodo) se coloca un electrodo (Du, Li y Gu 2007, p.470), cuando los electrones son liberados en la cámara anódica son captados por el ánodo y posteriormente tienden a ser transferidos hacia el cátodo mediante un circuito externo. Simultáneamente, en la cámara del ánodo existe la generación de protones que migran hacia la cámara catódica a través del separador donde se combinan con el oxígeno que posee el aire para reducirse a agua con los electrones que son captados directamente del cátodo (Li et al. 2011, pp.244-245).

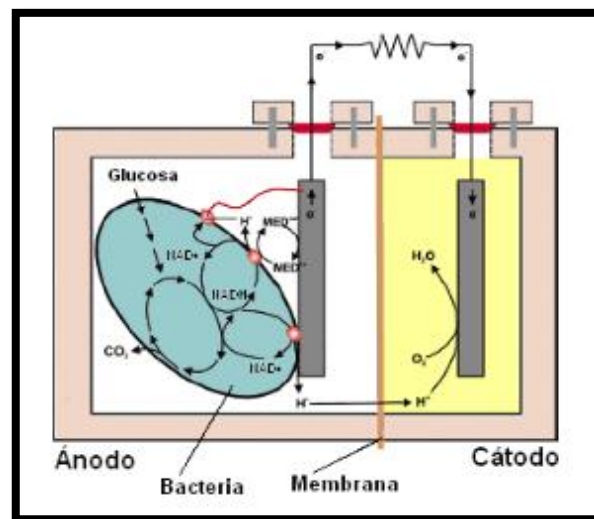


Figura 3-1. Estructura de una CCM

Fuente: (Ramírez et al. 2010, p.36)

1.7.6. Ánodo

Entre las características de los materiales que forman parte del ánodo encontramos que deben ser: conductivos, biocompatibles y químicamente estables en la solución del reactor. Los materiales que más se usan son las placas y las barras de grafito. Esto se debe a que su costo es relativamente económico y poseen gran facilidad para manejarlos. Se usan diversos tipos de productos de carbón como son el papel, la fibra, entre otros y son utilizados como electrodos (Revelo, Hurtado y Ruiz 2013, p.18).

Para el incremento del desempeño del ánodo existen diferentes estrategias ya sean estas físicas o químicas. Dirigir el flujo de agua a través del material del ánodo puede utilizarse para incrementar la potencia. El flujo hacia el ánodo ha sido también usado en reactores utilizando mediadores exógenos (Sell, Kramer y Kreysa 1989, pp. 211-212).

1.7.7. Cátodo

En cuanto al cátodo un aspecto de interés, es que el oxígeno es el aceptor más adecuado de electrones para una CCM, esto se debe al alto potencial de oxidación que posee, su disponibilidad, el bajo costo, la sustentabilidad, y la carencia de residuos químicos. La elección del material del cátodo se ve afectada cuando no se elige la adecuada, en el desempeño y su variedad de aplicaciones (Cheng, Liu y Logan 2006, .490).

La mayoría de los diseños que se han venido realizando de las CCMs requieren la separación de la cámara anódica y la cámara catódica por una membrana de intercambio de protones. La membrana más comúnmente utilizada es Nafion aunque actualmente existen otras opciones como Ultrex CMI-7000 que también resultan ser adecuadas para CCMs. El mercado para la compra de las MIP se encuentra en un crecimiento constante , y más estudios se requieren para evaluar los efectos de la membrana en el desempeño y la estabilidad a largo plazo (Logan et al. 2006, p.5181).

1.7.8. Importancia del sustrato en una MFC

El sustrato es uno de los aspectos más importantes que existen en una CCM debido a que constituye el combustible a partir del cual se genera la energía. En algunos estudios científicos que han usado la tecnología de las CCM se encuentra una variedad amplia de sustratos, desde compuestos puros hasta mezclas complejas. En los primeros estudios se usaban generalmente sustratos simples como glucosa y acetato, pero en los últimos años las investigaciones se centran en la utilización de sustratos menos convencionales con el fin de utilizar la biomasa presente en aguas residuales de diverso tipo y adicionalmente depurarlas y generar energía (Revelo, Hurtado y Ruiz 2013, pp.23-24). Sin embargo, el uso de sustratos complejos en una CCM es de gran interés debido a que además de ser fuentes de energía, estos se pueden ser degradados y/o biorremediados antes de ser descargados al medio ambiente. A diferencia de los compuestos puros los sustratos complejos necesitan para su degradación una comunidad microbiana diversa y electroquímicamente activa (Pant et al. 2009, p.2-6).

La selección de poblaciones bacterianas depende del tipo de sustrato a usar o viceversa. Como ejemplos de este tipo de sustratos podemos encontrar: aguas residuales que provienen del procesamiento de frutas y vegetales, suero de queso, melazas de destilerías, aguas residuales de refinerías, aguas residuales de industrias farmacéuticas con contaminantes recalcitrantes, residuos agrícolas, entre otros. Un aspecto de importancia que ha llamado la atención a la comunidad investigativa es que las CCMs pueden utilizar como sustratos no sólo material orgánico degradable, sino también material resistente a la biodegradación (Logan et al. 2006).

1.7.9. Características de las membranas de intercambio proteónico (MIC)

Las membranas utilizadas en las celdas de combustible tienen que cumplir con las siguientes características: a) Capacidad de intercambio de protones elevada. Esta propiedad se mide cuando las membranas son colocadas en soluciones catiónicas. b) La alta conductividad protónica es una de las principales propiedades ya que de esto depende que se acumulen o no los protones en el ánodo. c) Estabilidad química, térmica y resistencia mecánica. Generalmente, las membranas de intercambio protónico se utilizan en entornos químicamente hostiles lo que requiere que estén constituidas por materiales estables en el medio. d) Además deben presentar baja permeabilidad al combustible empleado, para evitar reacciones secundarias en el cátodo (Domínguez et al. 2013, p.528).

1.7.10. Biofilm

En las CCMs, los electrones se extraen de los residuos orgánicos por bacterias exoelectrogénicas unidas al ánodo que luego son transferidas a través de un circuito externo al cátodo. En el cátodo, protones y electrones se catalizan para reaccionar con el oxígeno, formando agua. Los avances que ha ido tomando la tecnología de las CCMs han aumentado la producción de energía mediante la optimización de la actividad de la biofilm. Sin embargo, el rendimiento de estos sistemas todavía necesita ser mejorado para las aplicaciones prácticas, y los costos de los materiales necesitan ser reducidos y sus métodos de preparación simplificados (Feng et al. 2010, p. 1841-1842).

Por ejemplo, el tratamiento con gas amoníaco es útil para experimentos de laboratorio, pero sería costoso para la producción a gran escala de ánodos. Varios materiales diferentes se han utilizado como ánodos, incluyendo bloques de grafito, fibras de grafito, fibra de carbono, papel carbón y espumas de carbono. Los ánodos de pincel de fibra de grafito parecen particularmente prometedores para lograr densidades de alta potencia, pero hasta el momento el único método

exitoso para el tratamiento de estos materiales que se ha informado es el uso de un proceso de gas de amoníaco a alta temperatura. Estudios recientes han demostrado que el tratamiento térmico es eficaz para mejorar la producción de energía, por tanto en la actualidad es utilizando en gran parte el tejido de fibra de carbono (Cheng y Logan 2007, p.493).

1.8. Aguas Residuales y su relación con las CCMs

Actualmente el tratamiento bio-electroquímico de aguas residuales está cobrando importancia, el cual está orientado a cumplir con un doble objetivo: eliminar contaminantes y valorizarlos energéticamente. Su funcionamiento se basa en la existencia de microorganismos que son capaces de oxidar la materia orgánica del agua residual y ceder electrones a un ánodo, de forma que se establece una corriente eléctrica hasta un cátodo en el que actúa un aceptor de electrones, generalmente O_2 . Para ello es necesaria la existencia de un gradiente de potencial eléctrico entre las zonas del ánodo y del cátodo. El tratamiento bio-electroquímico presenta dos variantes: las celdas microbiológicas electrolíticas (MEC) y las celdas microbiológicas de combustible (CCM).

El segundo caso es el que presenta un balance energético favorable que permite la obtención de energía a partir de la materia orgánica del agua residual. A partir de este principio se han desarrollado muchas investigaciones que combinan el tratamiento biológico del agua residual con la generación de energía eléctrica. En todos los casos se necesita un reactor combinado aerobio/anaerobio en el que se llevan a cabo los procesos convencionales de eliminación de C y nutrientes, y además entre ellos se genera una diferencia de potenciales redox (Horcajada et al. 2008, p. 2-3).

Desde hace años se sabe que las bacterias pueden ser utilizadas para generar electricidad. Es interesante, entonces, llevar a cabo la degradación de la materia orgánica presente en las aguas residuales por una parte y, por otra, generar electricidad. El propósito de este sistema no sería competir con las tecnologías existentes para generar electricidad a gran escala, sino tratar el agua residual y obtener durante este proceso un producto de valor agregado. Es decir, ver el tratamiento del agua no sólo como algo necesario para la sustentabilidad, sino también como un proceso que valoriza la materia orgánica presente. Bajo condiciones adecuadas de desarrollo tecnológico, este tipo de proceso podría no solamente ser utilizado a gran escala para tratar aguas residuales de una ciudad o industria, sino también sería factible para ser instalado en pequeñas comunidades habitacionales o incluso en comunidades dispersas o aisladas del país (Buitrón y Pérez 2011). Las

celdas de combustible microbianas han generado gran interés a nivel internacional no solo por tratarse de una fuente de energía renovable sino también por la ventaja de poder tratar aguas residuales simultáneamente al proceso de generación de bioelectricidad (Algecira, Hernández y Ibáñez 2010, p.1,2).

1.9. Beneficios de usar una CCM

Las CCMs se distinguen de otros sistemas de generación de energía porque: operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a muy bajas temperaturas; producen menor cantidad de CO₂ que cualquier otra tecnología actual que utilice combustibles fósiles para generar energía, por lo que las pocas emisiones de este gas no requieren ningún tipo de tratamiento; no necesitan aporte de energía siempre que el cátodo abiótico sea aireado pasivamente o sea un biocátodo; en el futuro podrían ser utilizadas en lugares remotos donde haya demanda de consumos básicos de energía eléctrica (Pant et al. 2009).

El potencial de estos dispositivos es enorme, en diversos trabajos se ha demostrado su efectividad, lo que ha creado grandes expectativas en la comunidad científica ya que es posible producir energía limpia mediante la explotación de la biomasa que existe en las aguas residuales domésticas e industriales. Al utilizar la materia orgánica de las aguas residuales como combustible simultáneamente con la producción de energía, se consigue una depuración de las aguas contaminadas. Adicionalmente, el estudio de biocátodos capaces de usar no solamente oxígeno sino también otros contaminantes como posibles aceptores de electrones, permitiendo así la remoción de nutrientes y la biorremediación conjuntamente con la generación de electricidad (Revelo, Hurtado y Ruiz 2013).

1.10. Aplicaciones de las CCMs

Entre las aplicaciones que muestran las CCMs a la comunidad científica son la capacidad ambiental que poseen de realizar biorremediación como por ejemplo el tratamiento de aguas residuales y, en definitiva, en el tratamiento de sustancias contaminantes como nitratos, sulfuros y sulfatos. Las aguas residuales de los municipios constituyen ser un buen sustrato para las CCMs, esto se debe a que favorecen el crecimiento de microorganismos bioelectroquímicamente activos, gracias a la enorme variedad de compuestos orgánicos que contienen. La electricidad generada puede reducir en gran magnitud la energía necesaria en el propio proceso de tratamiento de estas aguas, a la vez que elimina los contaminantes en las mismas, obteniendo así dos ventajas en el uso de este sustrato en una CCM. Otra de las aplicaciones más destacadas a nivel tecnológico es

que la generación de electricidad ha sido el implante de las CCMs en robots, como los Gastrobots, los cuales usan la energía procedente de la biomasa que ellos mismos recogen (azúcares, fruta, insectos muertos, malas hierbas, etc.). De este modo, una MFC sería suficiente para alimentar un robot que realizara tareas básicas como su propia locomoción, el actuar como sensor o comunicarse. Como uno de los grandes descubrimientos realizados en los últimos años sobre las CCMs ha sido el desarrollo de sistemas que pueden producir electricidad a partir de materia orgánica presente en sedimentos acuáticos; son conocidos como “Benthic Unattended Generators” o “BUGs”. El objetivo principal de este estudio ha sido que funcionen dispositivos electrónicos en localizaciones remotas como puede ser el fondo del océano (Ortiz, Moreno y Jiménez [sin fecha], p.76,77).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Muestreo de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana usada en el estudio investigativo fue donada por parte del Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes (ICITS-UNACH) gracias a los convenios vigentes que se han mantenido a la fecha. Esta cepa bacteriana era procedente de suelos de páramo en la zona de recarga de la Laguna Mapahuiña, Ecuador (9742946 N, 747817 E) en el Parque Nacional Sangay (provincia de Chimborazo), que pertenece a la microcuenca del río Zula. La temperatura media diaria es de entre 6-12 °C, con un máximo de 15 °C durante el día de tiempo y un mínimo de 3 °C en la noche (Calderón et al. 2016, p.24).

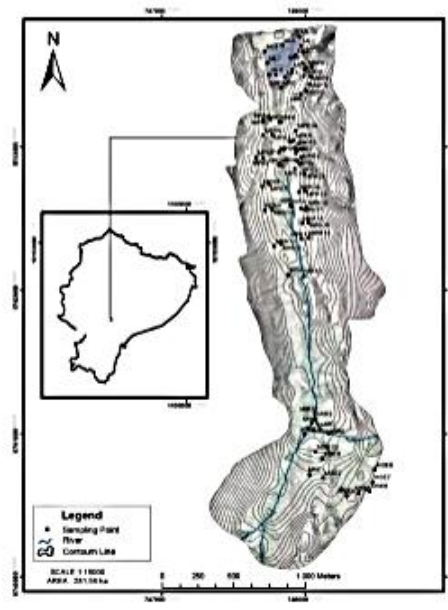


Figura 1-2. Distribución del punto de muestreo del área de estudio

Fuente:(Calderón et al. 2016, p.24)

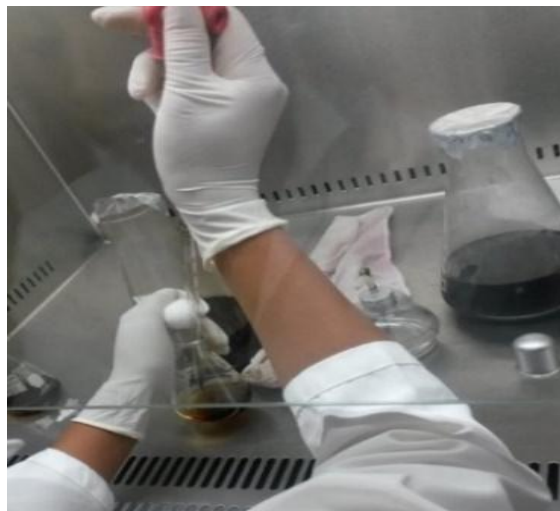
Una vez tomada la muestra objeto de estudio, que se encontraba en un Erlenmeyer de 1000 mL (Ver fotografía 1-2), incubada a una temperatura de 30 °C se procedió a realizar la réplica de la bacteria *Pseudomona spp.* mediante una pipeta de 5 mL a cuatro Erlenmeyers de 125 mL (debidamente esterilizados), los cuales contenían caldos nutritivos, dos de ellos caldo cerebro-

corazón y los dos restantes caldo nutritivo de soya (Ver fotografía 2-2).; posteriormente estas muestras fueron transportadas al laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias-ESPOCH para su posterior manejo, identificación mediante pruebas bioquímicas y aprovechamiento energético en las CCMs.



Fotografía 1-2: Cepa bacteriana *Pseudomonas* spp.

Fuente: Paña V, S. 2016



Fotografía 2-2: Muestreo de la cepa bacteriana

Fuente: Paña V, S. 2016

2.2. Adecuación de la cepa bacteriana

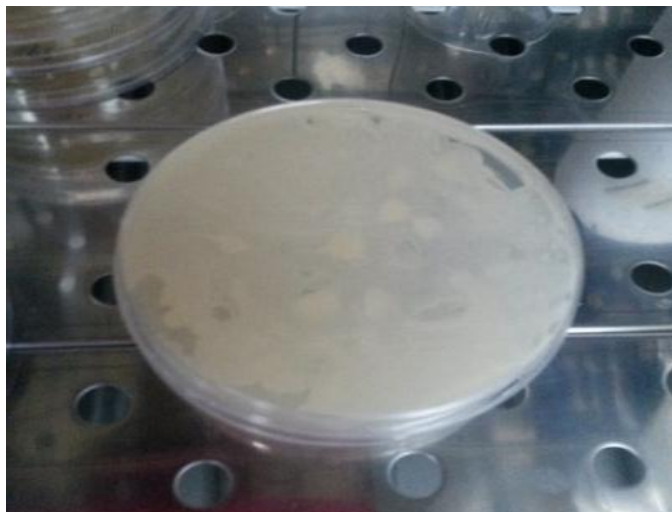
En el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH se dispuso la adecuación de la cepa bacteriana a una temperatura de 30°C para su posterior magnificación y replicación en agares Mueller, Nutritivo y Eosin; observando el crecimiento bacteriano a partir de las 24 horas (Ver fotografía 3-2), teniendo cada uno de estos agares en su composición química los componentes mencionados a continuación (Ver tabla 1-2):

Tabla 1-2. Componentes de los agares nutritivos.

Mueller Hilton:		Agar Nutritivo:		Eosin Methylene Blue:	
Infusión de carne	300.0 g/L	Pluripeptona	5.0 g/L	Peptona	10.0 g/L
Peptona ácida de caseína	17.5 g/L	Extracto de carne	3.0 g/L	Lactosa	5.0 g/L
Almidón	1.5 g/L	Cloruro de sodio		Sacarosa	5.0 g/L
Agar	15.0 g/L	Agar	8.0 g/L	Fosfato dipotásico	2.0 g/L
			15.0 g/L	Agar	13.5 g/L
				Eosina Azul de metileno	0.4 g/L
					0.065 g/L

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: Reactivos del Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias-ESPOCH



Fotografía 3-2: Crecimiento de la cepa *Pseudomonas* spp.

Fuente: Paña V, S. 2016

2.3. Identificación morfológica de la cepa bacteriana

2.3.1. Tinción Gram

Previo a las pruebas bioquímicas se realizó la tinción Gram para lo cual se preparó el porta objetos mediante un lavado con agua y jabón, se procedió a limpiarlo suavemente con un algodón empapado en alcohol. Luego se procedió a flamear el porta objetos sobre la llama del mechero, para así eliminar restos de suciedad y grasas, todo esto con la finalidad de que la muestra se fije adecuadamente, posteriormente se depositó una gota de cloruro de sodio al 85% sobre el porta

objetos y se colocó una muestra de la cepa *Pseudomona spp.* con un asa bacteriológica esterilizada. Se esperó que la muestra se secase al aire libre. Una vez que la muestra fue enfriada se procedió a realizar la Tinción Gram. Algo indispensable que se realizó fue cumplir con los tiempos adecuados con la ayuda de un cronómetro esto es para que los colorantes (Ver figura 4-2) puedan introducirse de una forma adecuada en las células siguiendo los siguientes 4 pasos de una forma cronológica:



Fotografía 4-2: Colorantes aplicados en la tinción de Gram.

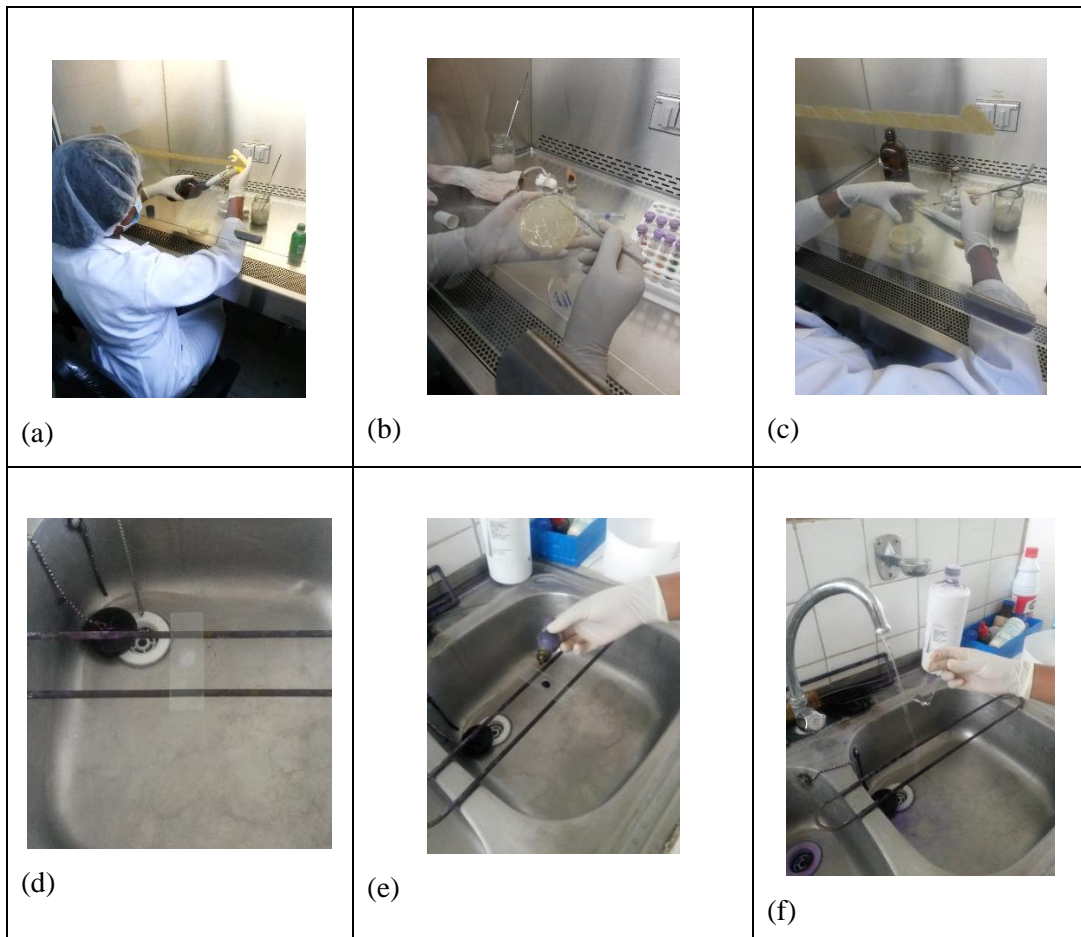
Fuente: Paña V, S. 2016

1. El primer colorante que se aplicó a la muestra fue cristal violeta (azul violeta), dejándolo actuar por un lapso de 1 minuto. Esta tinción de 1 min está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25°C. El colorante es soluble en H₂O y entra en todas las bacterias tiñéndolas de violeta. Se procedió a enjuagar con agua, tomando en cuenta que el chorro de esta agua no debe caer directamente sobre la muestra sino más bien de una forma inclinada con la finalidad de que la muestra no sea afectada con la fuerza de la misma.
2. Seguidamente se usó lugol que actuó como “mordiente” en un lapso de 1 minuto. Es necesario recalcar que cuando se aplica un mordiente se debe eliminar los excesos de agua para evitar que esta infiera cuando se aplique la otra sustancia. El Lugol cumple con la función de cristalizar al azul violeta formando un complejo insoluble en H₂O pero que a su vez es soluble en alcohol-acetona.
3. Posteriormente se procedió a decolorar con una gota de alcohol la misma que actuó durante 30 segundos. Cabe mencionar que este paso es de gran importancia ya que en él reside la respuesta diferencial entre las bacterias Gram (+) y Gram (-). Como se sabe que el alcohol deshidrata y contrae las células por contacto y los poros de las Gram (+) son más pequeños que los de las Gram (-). Entonces, el alcohol se encargó de cerrar completamente los poros de las Gram (+) y de una forma parcial el de las Gram (-), motivo por el cual la solución

ingresó en estas últimas decolorándolas es decir las Gram (+) se encontraban violetas y cerradas y las Gram (-) incoloras y abiertas.

4. A continuación, se cubrió con safranina durante 1min. Ésta es la tinción diferencial. El reactivo es parcialmente soluble en H₂O e ingresará sólo en las Gram (-) ya que las otras continúan cerradas por efecto del alcohol. Además, interactúa con la membrana celular y forma un complejo insoluble en H₂O. Esta propiedad permitió realizar el último paso que fue eliminar el exceso y lavar con H₂O (López et al. 2014, p.12-13).

Una vez que se secó la placa colocamos una gota de aceite de inmersión para posteriormente visualizar en el microscopio electrónico (Ver fotografía 5-2).



Fotografía 5-2: Pasos aplicados a la tinción de Gram

Fuente: Paña V, S. 2016

En las fotografías se puede apreciar que el literal a) se refiere a la aplicación de cloruro de sodio al porta objetos, el literal b) es la toma de la muestra de la bacteria, el literal c) es la aplicación de la bacteria en el porta objetos, el literal d) tiempo de secado de la placa antes de la aplicación de

los colorantes, el literal (e) se basa a la aplicación del colorante directamente sobre la muestra de la bacteria, y finalmente el literal (f) el lavado del colorante del porta objetos.

2.4. Pruebas bioquímicas para la caracterización de género pseudomona.

Posteriormente al muestreo de la cepa bacteriana y la identificación morfológica de la cepa bacteriana se procedió aplicar las pruebas bioquímicas que se llevaron a cabo en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias para lo cual se usó los medios: SIM, Simmons citrato, Kligler y Urea (Álvarez Benito, et al., 1990) los cuáles serán explicados en los siguientes párrafos. Se realizó la preparación de los medios en tubos de 5 mL y por cada tubo una réplica teniendo un total de 8 tubos para las pruebas pertinentes, la preparación de estos se dio en condiciones totalmente estériles (Ver fotografía 6-2).



Fotografía 6-2: Tubos esterilizados para la realización de pruebas bioquímicas

Fuente: Paña V, S. 2016

2.4.1. Medio SIM

Esta prueba se basó en la determinación de la motilidad de la bacteria y producción de H_2S , el medio de preparación consiste en 30gr/L. Realizando una relación para 10 mL de agua destilada se tomó 0.3 gr del medio, el mismo que fue disuelto con la ayuda de un reverbero y colocado en el autoclave durante 30min. Posterior a esto en la cámara de flujo previamente esterilizada se colocó 5 mL de medio en los dos tubos incluida la réplica, para luego ubicarlos en una gradilla hasta que se enfrié totalmente; en una posición recta. Una vez ya enfriado el medio con la ayuda de un aza totalmente estéril se tomó la cepa bacteriana se realizó una punción profunda y se tapó

el tubo herméticamente. Al transcurrir las 24 horas se anotaron los resultados (Ver fotografía 7-2)



Fotografía 7-2: Medio SIM con bacteria

Fuente: Paña V, S. 2016

2.4.2. Medio citrato según Simons

Este medio tiene como fundamento ayudar a determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo y su crecimiento (Álvarez Benito, et al., 1990, p.116).

El medio de preparación consiste en 22,5 gr/L. Realizando una relación para 10 mL de agua destilada se tomó 0.22 gr del medio, el cual se disolvió con la ayuda de un reverbero y fue colocado en el autoclave durante 30min, posterior a esto en la cámara de flujo previamente esterilizada se situó el medio en dos tubos una cantidad de 5mL y se lo colocó en una posición inclinada (pico de flauta) hasta que se enfrió totalmente. Una vez ya enfriado el medio con la ayuda de un asa totalmente estéril se tomó la cepa bacteriana de la caja petri, mediante punción profunda y a lo largo del pico de flauta se procedió a estriar y tapan el tubo. Al transcurrir las 24 horas se procedió a observar. (Ver fotografía 8-2)



Fotografía 8-2: Siembra de la bacteria en medio SIM.

Fuente: Paña V, S. 2016

2.4.3. Medio *KLIGLER*

Medio de cultivo para la diferenciación de enterobacterias en base a su capacidad para fermentar glucosa y lactosa, y para producir ácido sulfhídrico (Universidad Nacional de San Martín 2008).

El medio de preparación consiste en 52 gr/L. Realizando una relación para 10 mL de agua destilada tomamos 0.52 gr del medio, el cual se disolvió con la ayuda de un reverbero y se colocó en el autoclave durante 30 min, posterior a esto en la cámara de flujo previamente esterilizada se colocó el medio en dos tubos con una cantidad de 5mL y se lo situó en una posición inclinada (pico de flauta) hasta que se enfrió totalmente. Una vez ya enfriado el medio con la ayuda de un asa totalmente estéril se tomó la cepa bacteriana de la caja petri, mediante punción profunda y a lo largo del pico de flauta se procedió a estriar y tapar el tubo. Al transcurrir las 24 horas se procedió a observar (Ver fotografía 9-2).



Fotografía 9-2: Medio SIM con bacteria

Fuente: Paña V, S. 2016

2.4.4. Medio Urea

Este medio se basa en el principio de determinar la capacidad de un microorganismo en hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa (MacFaddin 2003).

El medio de preparación consiste en 21 gr/L. Realizando una relación para 10 mL de agua destilada se tomó 0.21 gr del medio urea agar base, el mismo que se disolvió con la ayuda de un reverbero y se colocó en el autoclave durante 30min. Luego se procedió a pesar 4 gr de urea y aforar a 10 mL de agua destilada estéril para así cumplir con la preparación detallada en el frasco de urea agar base. Mediante una relación se tomó 0.5 mL de la solución aforada y se colocó en la solución de urea agar base. Posterior a esto en la cámara de flujo previamente esterilizada se colocó el medio en dos tubos de 5mL y se situó en una posición inclinada (pico de flauta) hasta que se enfrió totalmente. Una vez ya enfriado el medio con el ayuda de un asa totalmente estéril se tomó la cepa bacteriana de la caja petri, mediante punción profunda y a lo largo del pico de flauta se procedió a estriar y tapar el tubo. Al transcurrir las 24 horas se anotaron los resultados (ver fotografía). Una vez culminadas estas pruebas se realizó 2 pruebas de constatación de especie que se explicara más adelante (Ver fotografía 10-2)



Fotografía 10-2: Medio SIM
con bacteria

Fuente: Paña V, S. 2016

2.5. Pruebas Extras de constatación de especie

Se aplicó dos pruebas extras de constatación de especie las cuales se realizaron de la siguiente manera:

2.5.1. Crecimiento bacteriano a 42°C

Esta Prueba se realizó sembrando la cepa bacteriana en agar nutritivo en dos cajas petri las cuales contenían 20 mL de dicho agar (cada una) posteriormente se procedió a incubarla a una temperatura de 42°C (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78) esperando así observar los resultados de crecimiento o no a las 48h (Ver gráfica 11-2).



Fotografía 11-2: Crecimiento bacteriano en agar nutritivo a 42°C

Fuente: Paña V, S. 2016

2.5.2. Licuefacción de la gelatina

Esta prueba fue aplicada para la determinación de la capacidad de la bacteria de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas, el desarrollo de esta prueba se dio mediante la realización de un medio específico (Ver tabla), es así que una vez listo el medio de cultivo se procedió a llevarlo a la cámara de flujo para distribuirlo en 4 tubos con un aproximado de 4 a 5 mL por tubo. Posteriormente se procedió a autoclavar y a dejar enfriar el medio en el tubo en una posición vertical llevándolos a un tiempo aproximado de 5 min en refrigeración con la finalidad que el medio quede totalmente sólido.

Una vez limpia y estéril la cámara de flujo se procedió a realizar la siembra de la bacteria en los tubos con la ayuda de una asa estéril y por picadura se atravesó con la alícuota bacteriana el medio hasta una profundidad de 2 a 2,5 cm, posteriormente se procedió a incubar a una temperatura de

23°C durante un periodo de 6 días (ver fotografía 12-2), cabe mencionar que esta prueba puede ser verificada en el lapso de 1 día hasta 14 días (Álvarez Benito, et al., 1990, p.123).



Fotografía 12-2: Aplicación de la prueba de hidrólisis de gelatina a 23°C a) Incubadora a 23°C y b) Tubos de ensayo a prueba a 23°C

Fuente: Paña V, S. 2016

2.6. Configuración de la celda de combustible microbiano (CCM)

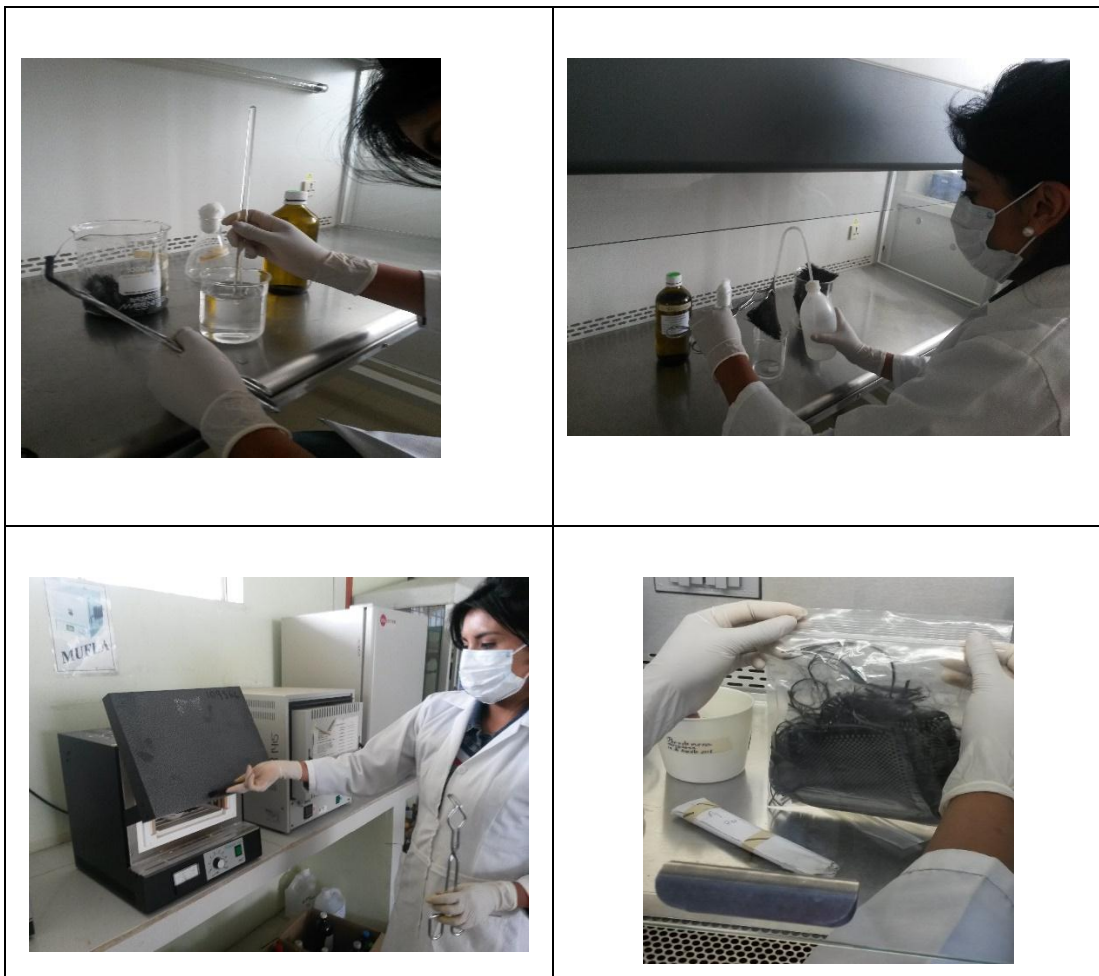
Una vez realizada la identificación de la cepa bacteriana se procedió a diseñar la celda de combustible microbiano la misma que fue seleccionada de acorde a investigaciones anteriores que toman en cuenta aspectos como:

El material del cual se encuentran formadas las CCM para estudios investigativos que es en acrílico y vidrio, en cuanto a electrodos se pueden utilizar diferentes materiales como el cobre, grafito entre otros (Revelo & Hurtado 2013, p.19). Existen algunas modificaciones que se han dado a las CCM como lo es la adecuación en una sola cámara sin la necesidad de mantener sumergido al cátodo en el agua es así que este se encuentra directamente en contacto con el aire (Buitrón y Pérez 2011). Y que emplea oxígeno como aceptor de electrones, pero bajo un flujo ascendente (You et al. 2008, pp.1157-1158).

En base a estos aspectos se diseñó 6 CCMs cúbicas ($5 \times 5 \times 5 \text{ cm}^3$) de cámara simple realizando la impresión de las mismas en acrílico de 3 mm de espesor las mismas que se encontraban correctamente armadas y desinfectadas para su uso posterior.

2.6.1. *Pretratamiento de las MIC:*

Las membranas de intercambio anódico cumplen una función principal tanto en la transferencia de energía (ánodo y cátodo) como en la formación de biopelículas (ánodo) de las celdas de combustible microbiano por lo que es necesario darle un adecuado tratamiento el mismo que se empezó remojando en acetona (durante la noche) y lavándola el día siguiente 5 veces en agua destilada o desionizada; se remojó en peroxidisulfato de amonio (200 gr / L) y ácido sulfúrico concentrado (100 mL / L) durante 15 minutos; posteriormente , los electrodos se calentaron durante 30 minutos en un horno de mufla a 450 ° C (Feng et al. 2010, pp. 1842-1844), finalmente se lavó cinco veces antes de ser utilizados. Sin embargo, a la membrana de intercambio del cátodo solo se empapó en agua desionizada durante la noche anterior con el fin de eliminar las impurezas ya que esta no necesita el mismo tratamiento que la membrana de intercambio anódico (Ver fotografía 13-2).



Fotografía 13-2: Proceso del tratamiento de la membrana de intercambio catiónico (MIC)

Fuente: Paña V, S. 2016

2.6.2. Preparación del agua residual sintética

El agua residual sintética fue formada a base de agua tesalia y nitrato de potasio, la elección de este reactivo fue debido a que es el fertilizante más usado a nivel agronómico (IPNI 2017) y que menos compuestos contiene en su formulación; de esta manera se manejó rangos de concentraciones que permitieron valorar de mejor manera el comportamiento dentro de una celda de combustible microbiano.

Al utilizar agua residual sintética minimizamos factores intervinientes que podrían influenciar en el experimento y en la reacción de producción de bioelectricidad por tratarse de un cultivo puro. Es así que se determinó realizar el agua residual sintética en base a estudios anteriores como lo fue el “Tratamiento de aguas residuales y generación simultánea de energía eléctrica mediante celdas de combustible microbianas” en la que el agua residual sintética servía para generar energía simultáneamente estandarizando 3 fases de experimentación (Algecira, Hernández y Ibáñez 2010, pp.1-2).

Otro estudio de gran interés evaluó la eficiencia de la *Moringa oleífera* como coagulante en la potabilización de aguas crudas sintéticas con valores de turbidez entre 7 y 49 NTU (Mendoza, Fernández y Ettiene 2000, pp.235-236). Así mismo en estudios científicos de gran interés; una celda de combustible microbiano terrestre de cámara única basado como biosensor de la demanda bioquímica de oxígeno de aguas residuales lavadas con arroz sintético (Logroño et al. 2016, p.2), se creó agua residual a partir de muestras de granos de arroz para la incorporación en las respectivas celdas de estudio.

La especie *Pseudomonas spp* es una de las bacterias que poseen propiedades fijadoras de nitrógeno (Rodríguez y Toro 2013, pp.16-18) por ende al usar esta agua residual sintética aprovechamos estas propiedades metabólicas de la bacteria con respecto al contaminante.

El agua residual sintética nitrogenada poseía las siguientes características químicas-físicas del agua tesalia y de nitrato de potasio: (Ver tabla 2-2).

Tabla 2-2: Características del agua residual sintética

Solución	Características Químicas	% de agua del total de agua sintética	
a) Agua Tesalia	(mg/l)	95.2%	
	Calcio:		22
	Magnesio:		58
	Sodio:		51
	Potasio:		5,2
	Bicarbonatos:		380
	Sulfatos:		27
	Cloruros:		32
Sólidos Disueltos:	440		
b) Solución de nitrato de Potasio		4,76%	

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: Análisis químico de agua Tesalia

2.6.3. Prueba ensayo

Se armaron dos CCMs como pruebas de ensayo en base a la configuración y a los tratamientos realizados anteriormente en el literal 2.6.1. y 2.6.2. En éstas CCMs se aplicó dos tipos de medios (Ver fotografía 14-2) el uno químico (glucosa) y el otro biológico (*pseudomona aeruginosa*) mediante la ayuda de una jeringuilla totalmente estéril, los cuales fueron de gran importancia para definir el tiempo de monitoreo debido a la estabilidad que iba tomando cada una de las celdas con los tratamientos que cada una poseía. El registro de datos se dio de forma manual en intervalos de tiempo por un día mediante la ayuda de un multímetro digital de marca STEREN.



Fotografía 14-2: Monitoreo de las pruebas de CCM con tratamiento químico y biológico

Fuente: Paña V, S. 2016

2.6.4. Prueba final

Posteriormente a las pruebas ensayo usando las instalaciones del laboratorio de biotecnología perteneciente a la ESPOCH se aplicó la prueba final, es así que una vez listas las seis CCMs para usarse en la cámara de flujo laminar (Ver fotografía 15-2) se procedió a colocar 2 mL de la cepa bacteriana en cada una de las celdas con la ayuda de una jeringuilla estéril para así evitar contaminación con otros agentes. (Ver fotografía 16-2).



Fotografía 15-2: CCMs armadas y desinfectadas

Fuente: Paña V, S. 2017



Fotografía 16-2: CCMs armadas y desinfectadas

Fuente: Paña V, S. 2017

Se procedió a colocar el agua residual sintética previamente elaborada en cada una de las celdas dos de las cuales contenían una concentración de nitratos de 30 ppm y las dos siguientes una concentración de 60 ppm, cabe recalcar que estas concentraciones fueron determinadas debido a la Norma de calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua (Tulsma; 2014). Las dos celdas restantes fueron un grupo control siendo estas de gran ayuda para establecer una comparación con las celdas que poseían como sustrato las concentraciones antes mencionadas consideradas como agua sintética contaminada en comparación a un grupo control que solamente poseía la cepa bacteriana con agua natural (tesalia). (Ver fotografía 17-2)



Fotografía 17-2: Colocación del agua residual sintética

Fuente: Paña V, S. 2017

En la cámara anódica se colocó las membranas de intercambio catiónico (MIC) que era la fibra de carbono (Ver fotografía 18-2) que se trató en los pasos anteriormente explicados, con el fin de eliminar impurezas y permitir una mejor formación de la biopelícula. Como medio de separación del ánodo y cátodo se usó papel celofán debidamente adecuado y cortado de acuerdo a las dimensiones de las celdas y finalmente se colocó la membrana de intercambio catiónico en la cámara del cátodo (Hsieh y Chung 2014, pp.2204-2205). En las celdas de combustible microbiano fueron instaladas puertos de entrada y salida (Ver fotografía 19-2) con dos finalidades una de ellas para la alimentación de la misma con el sustrato de la solución de agua sintética y la otra entrada se utilizaba para purgar gases que podrían inferir en los datos emitidos durante el desarrollo de cada una de las celdas.



Fotografía 18-2: Fibra de carbono tratada (ánodo)

Fuente: Paña V, S. 2017



Fotografía 19-2: Inyección de los 5 mL de glucosa

Fuente: Paña V, S. 2017

2.6.5. Instalación de los sensores y transmisión de datos de las CCMs

La instalación y ejecución del proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Ambiental 3^{er} piso de la Facultad de Ciencias, debido a que se trata de un cultivo puro y por cuanto se evitó una contaminación cruzada tomando las medidas adecuadas de asepsia, después de que cada una de las celdas fueron armadas correctamente se las traslado a la oficina del CEAA para su respectivo monitoreo (Ver fotografía 20-2).



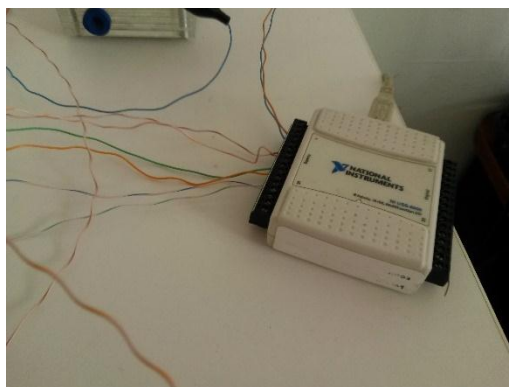
Fotografía 20-2: Lugar de monitoreo CEAA.

Fuente: Paña V, S. 2017

Para el manejo y análisis de datos se utilizó el Software LabVIEW que es muy utilizado a nivel científico e ingenieril para la realización de pruebas, control y medida. Para este estudio se usó este software con la finalidad de obtener una base de datos óptima y reflejar el funcionamiento de los dispositivos electrónicos en los resultados finales que ayudaron a determinar la bioelectricidad producida por cada una de las celdas.

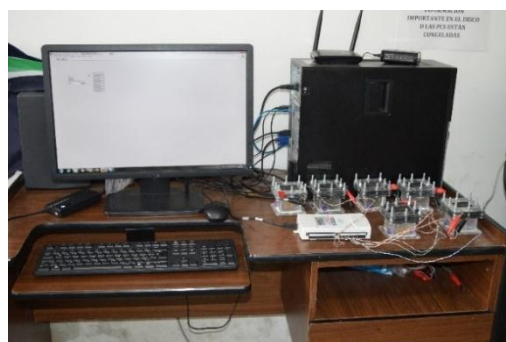
Al momento en el que se colocaron las celdas a monitorear correctamente armadas, se suministró 5mL de glucosa con la ayuda de una jeringuilla estéril para observar el efecto que esta sustancia producía en las celdas observando su comportamiento a las 24 horas, luego ya no se suministró dicha sustancia esperando la adaptación de las bacterias al entorno en la que se encontraban, observando la capacidad bioenergética que sería capaz la bacteria de producir por si sola.

Finalmente se procedió a realizar conexiones para cada una de las celdas, las cuales constaban de una conexión de salida tanto para la cámara catódica y otra para la cámara anódica, formando de esta manera un circuito cerrado conectadas a un dispositivo DAQ NI 6009 (Ver fotografía 21-2) y a la vez a un ordenador (Ver Fotografía 22-2) para su registro inmediato de generación de bioelectricidad por cada celda con un tiempo de recepción de un minuto por el transcurso de 15 días.



Fotografía 21-2: DAQ NI 6009

Fuente: Paña V, S. 2017



Fotografía 22-2: Conexión de la DAQ NI 6009 a las CCM y al procesador

Fuente: Paña V, S. 2017

2.7. Análisis de nitratos del agua sintética

El análisis de nitratos en el agua sintética formada a base de tesalia y nitrato de potasio se dio en el laboratorio de aguas de la Facultad de Ciencias, el mismo que consistió en llevar a cabo un procedimiento definido. Es así que una vez que se obtuvo las muestras antes del experimento y posterior a este se procedió a llevarlas al laboratorio antes mencionado, en el cual cada muestra tuvo que ser filtrada con la ayuda de un embudo y papel filtro; este fue efectivo para las 2 muestras antes del experimento debido a que estas no presentaban turbidez. Para las otras muestras fue necesario realizar una filtración al vacío debido a que al momento que entro en contacto con la bacteria durante el monitoreo iba presentando turbidez en el agua. Una vez ya filtradas las muestras se tomó una alícuota de 10mL de la muestra con la ayuda de una pipeta y una pera de succión, colocándola en un recipiente limpio. Posteriormente se revisó que el equipo se encontrara en buen estado. Posterior a eso se realizó la programación del mismo, tocando el botón de Hach programas, para seleccionar el programa el cual fue 353 N, de esta manera se dió inicio a la medición en el espectrofotómetro. Se procedió a calibrar el equipo con la ayuda de un blanco en

este caso fue agua destilada (10mL), a la muestra analizar que se encontraba en el recipiente estéril se le añadió el contenido de un sobre del reactivo NitraVer 5 (polvo de nitrato), para posteriormente proceder a iniciar el cronómetro del equipo y conjuntamente con este empezar el tiempo de agitación en un tiempo de 30 segundos, con la finalidad de homogenizar uniformemente la sustancia. Seguidamente se colocó la muestra en el vial y con la ayuda de una toalla seca se limpió la parte externa en el caso de existir posibles huellas o marcas que provoquen alguna alteración en la lectura de los nitratos por parte del equipo. Se programó el reloj interno o temporizador a un tiempo de 2 min, como periodo de reacción de la sustancia. Una vez que transcurrió ese tiempo, el equipo nos mostró la medición de nitratos la cual fue anotada en mg/L de NO₃ valores que se reflejarán en la sección de resultados (Torres Molinares y Espino 2006, p.3).

2.8. Cálculos:

2.8.1. *Calculo de Nitrato de potasio (KNO₃):*

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

50ppm	100ppm
$V_1 = \frac{50ppm * 250mL}{1000ppm}$	$V_1 = \frac{100ppm * 250mL}{1000ppm}$
$V_1 = 12.5 mL$	$V_1 = 25 mL$

2.8.2. *Cálculos de Nitratos (NO₃):*

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$C_1 = \frac{C_2 * V_2}{V_1}$$

A partir de 50ppm de KNO ₃		A partir de 100ppm KNO ₃
$V_1 = \frac{61 * 3.19 mg/L * 12.5mL}{250 mL}$		$V_1 = \frac{613.19 mg/L * 25mL}{250 mL}$
$V_1 = 30 ppm$		$V_1 = 60 ppm$

2.9. Lugar experimental

El trabajo de titulación a nivel experimental se lo desarrollo en el laboratorio de biotecnología ubicado en el 3^{er} piso del edificio central de la Facultad de Ciencias-ESPOCH de la ciudad de Riobamba y su respectivo monitoreo se desarrolló en las instalaciones del Centro de Investigaciones y Energías Alternativas (CEAA).

2.10. Materiales experimentales

En la Tabla 3-2 se describe los materiales y cantidades utilizadas durante todas las etapas de la investigación.

Tabla 3-2: Equipos y materiales usados en el trabajo investigativo.

ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN	EQUIPOS Y MATERIALES	CANTIDAD
Muestreo, y Transporte de la cepa bacteriana <i>Pseudomona spp.</i>	Guantes	2
	Mascarilla	
	Balanza	1
	Autoclave	1
	Reverbero	1
	Cámara de flujo laminar	1
	Erlenmeyers	4
	Pipetas	4
	Pera de succión	1
	Tubos de ensayo 20 mL	4
	Cooler	1
Muestreo y preparación del agua residual sintética	Guantes	2
	Mascarilla	1
	Balanza	1
	Vidrio reloj	1
	Vaso de precipitación	1
	Balón de aforo de 500mL	1
	Balón de aforo de 1000mL	1
Varilla de agitación	1	
Configuración de las CCMs	Guantes	2
	Mascarilla	1

	Gorro	1
	Celdas de acrílico con sus respectivas entradas y salidas	6
	Pernos con rosca	54
	Papel celofán	0,25 m ²
	Tejido de fibra de carbono	10 cm x 5 cm
	Alambre de titanio	1 m
	Lagartos de conexión	12
	Tijera	1
Instalación de sensores y transmisión	Cable de timbre	1m
	DATA-NI	1
	Computador de escritorio	1
Análisis de Nitratos	Vaso de precipitación 50mL	4
	Pipeta	1
	Pera de succión	1
	Embudo	1
	Tijera	1

Realizado por: Silvia Paña

2.11. Materiales de laboratorio

Los materiales de laboratorio, reactivos, sustancias y equipos se detallan en la Tabla 4-2, y los análisis microbiológicos y físico-químicos del agua sintética efectuados en el transcurso del experimento:

Tabla 4-2: Materiales, reactivos, sustancias y equipos utilizados en el laboratorio

MATERIALES	REACTIVOS	SUSTANCIAS	EQUIPOS
Cajas Petri	Caldo de soya	Agua destilada	Cámara de flujo
Erlenmeyers de 250mL	Caldo cerebro-	Alcohol industrial	laminar
Vaso de precipitación	corazón		Balanza analítica
Agitador	Agar mueller		Autoclave
Vidrio reloj	Agar nutritivo		Incubadora
Balón de aforo de 500 y 1000 mL	Agar Urea		Refrigeradora
Tubos ensayo con tapas de 20ml Gradilla	Agar kligler		pH metro
	Agar Simmons		Espectrofotómetro
	Agar citrato		

Micropipeteador de 100µl	Glucosa		
Puntas volumétricas para micropipeteador	NaCl		
Pipetas de 10mL Peras de succión	KNO ₃		
Asa de siembra			
Espátula			
Papel aluminio			
Parafilm			
Asa de vidrio			
Portaobjetos			
Cubreobjetos			
Algodón			
Mechero			
Marcador			
Cinta masking			

Realizado por: Silvia Paña

2.12. Planteamiento de hipótesis

Hipótesis Textual

- “El uso y aprovechamiento de una cepa de *pseudomona spp.* en una celda de combustible microbiano incide en la producción de bioelectricidad”.

Hipótesis estadística

Las concentraciones del agua residual sintética influyen en la producción media de voltaje de salida al final del experimento.

H₀: $\delta_{CCM1} = \delta_{CCM2} = \delta_{CCM3} = \delta_{CCM4}$.

Las varianzas de los niveles de producción de bioelectricidad son las mismas

H_a: No todas las varianzas son iguales.

Dónde:

δ_{CCM1} = Celdas de Combustibles microbianas inducidas a diferentes dosis de campos magnéticos

Variables dependientes: Generación de Bioelectricidad (mV).

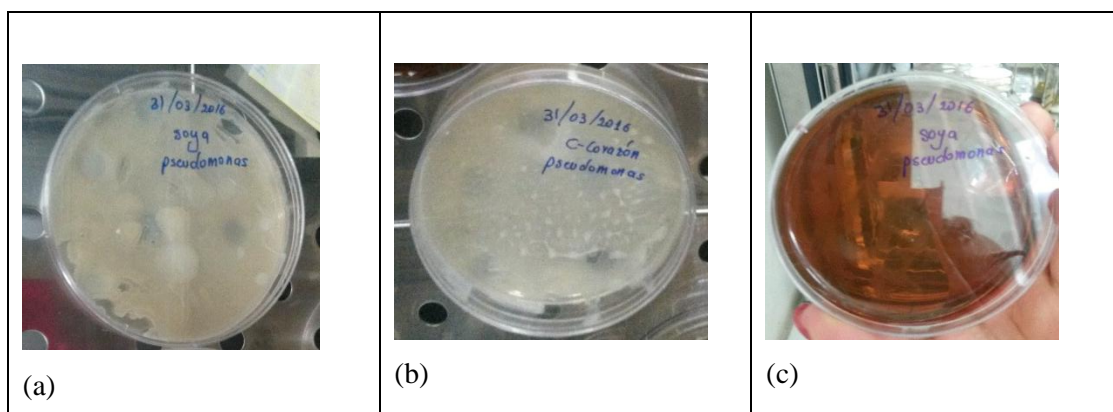
Variables independientes: Concentración de nitratos (ppm).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Muestreo y reactivación de la cepa bacteriana

La bacteria una vez replicada en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias (ESPOCH), en medios de cultivo tales como: Mueller Hilton, Agar Nutritivo y Eosin Methylene Blue, dio como resultado un mejor desarrollo y crecimiento en los agares Mueller y Agar Nutritivo con un aproximado del 80% del total de la caja Petri de los cuales se procedió a trabajar a lo largo del experimento con agar nutritivo debido a su mayor disponibilidad en el laboratorio (Ver fotografía 1-3)

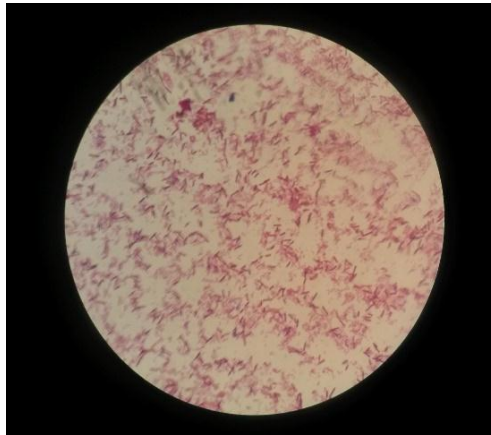


Fotografía 1-3: a) Crecimiento bacteriano con agar Mueller, b) Crecimiento microbiano con agar Nutritivo, y c) Crecimiento bacteriano con agar Eosin.

Fuente: Paña V, S. 2016

3.2. Tinción de Gram

Después de haber replicado la muestra bacteriana en el mejor medio de cultivo se determinó mediante la tinción Gram y a través de una observación realizada en el microscopio (Ver fotografía 2-3) que efectivamente se trataba de una bacteria Gram negativa, ya que presentaba características propias que poseen este tipo de bacterias como lo es su estructura en forma de bastoncillos alargados propios de organismos como bacilos y además la coloración final que tuvo la muestra fue rosácea.



Fotografía 2-3: Observación de la cepa bacteriana en el microscopio

Fuente: Paña V, S. 2016

3.3. Características del Género *Pseudomona*

Luego de haber realizado las pruebas de Tinción Gram se realizó 6 pruebas por duplicado en las cuales se pudo observar características propias del género *pseudomona* (Ver tabla 1-3), lo cual se contrasto y verificó en literatura encontrada en el Manual de técnicas en microbiología clínica (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78).

Tabla 1-3: Resultados de las Pruebas generales del género *pseudomona*

Morfología	Bacilos rectos o ligeramente curvados
Reacción frente a la coloración de Gram	Gram negativo
Formación de esporas	Negativo
Requerimiento de oxígeno	Aerobio estricto (1)
Oxidasa	Positiva
Movilidad	Positiva
Indol	Negativo
(1) Algunas cepas utilizan el oxígeno del nitrato como aceptor alternativo de electrones y crecen anaeróbicamente.	

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78)

3.4. Identificación bacteriana de la especie del género *pseudomona spp.* mediante pruebas bioquímicas.

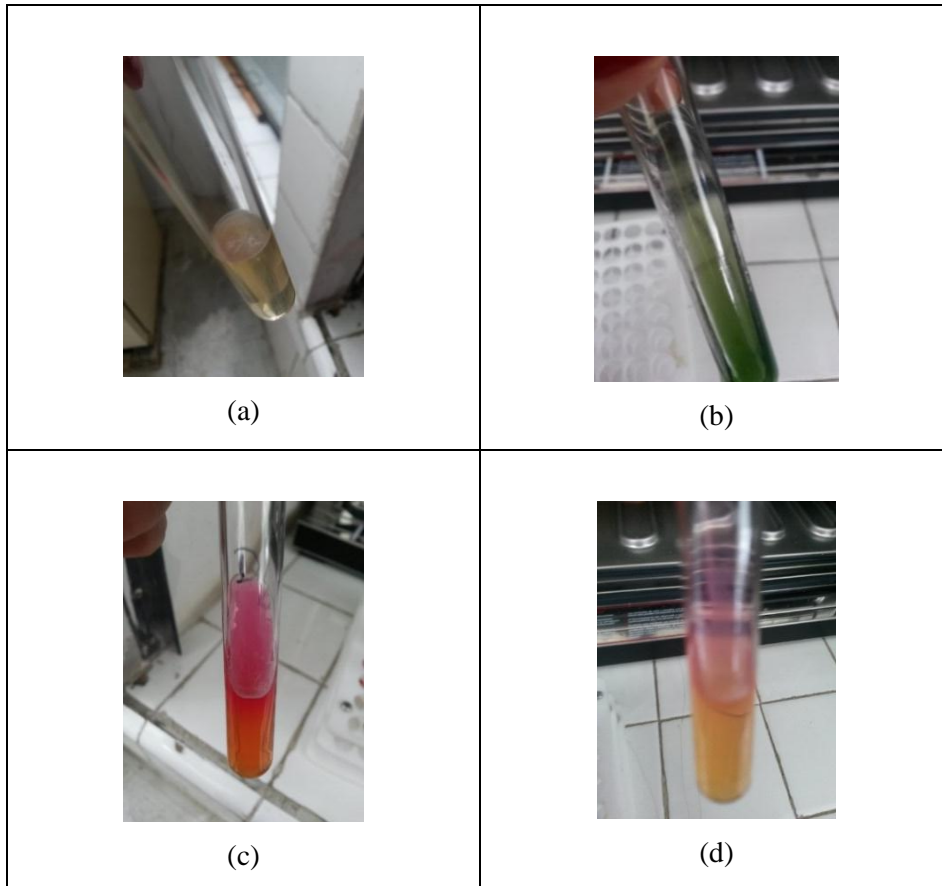
De las pruebas mencionadas anteriormente en el literal 3.3., cuatro de ellas pertenecieron a las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa bacteriana, es así que, en la Tabla 2-3 se puede observar los resultados que se obtuvieron a base a los medios SIM, Simmons Citrato, Kligler y Urea correspondiente a:

Tabla 2-3: Resultados de las Pruebas Bioquímicas

SIM	Movilidad	(+)
	Formación de H ₂ S	(-)
	Indol	(-)
Simmons Citrato	Citrato como única fuente de C.	(-)
Kligler	Glucosa	(+)
	Lactosa	(-)
Urea	Ureasa	(+)

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78).



Fotografía 3-3: Resultados de las Pruebas Bioquímicas en medios Sim, Simons,

Kligler y Urea.

Fuente: Paña V, S. 2016

En relación a la fotografía 3-3 el literal a) nos da a conocer el resultado que se obtuvo en la prueba bioquímica del medio SIM la cual fue positivo para motilidad debido a que creció más allá de la línea de punción, respecto a la producción de H_2S fue negativa manteniendo su tonalidad inicial y a las 24h se realizó la prueba de Indol que dio como resultado negativo manteniendo su tonalidad incolora-amarillenta.

En el literal b) Citrato dio como resultado negativo debido a que la tonalidad verde inicial no tuvo cambio a lo largo del transcurso de las 24h demostrando así que la única fuente de carbono de esta bacteria no es el citrato.

En el literal c) Kligler muestra un resultado positivo en su superficie es decir el microorganismo fermenta la glucosa y es negativo para la fermentación de lactosa debido a que mantiene su tonalidad inicial en el fondo.

Y finalmente el literal d) aplicando la prueba bioquímica del medio Urea tuvo una coloración amarilla dándonos a las 24 horas un resultado positivo lo que dignifica que la bacteria tuvo la capacidad de hidrolizar a la urea y mostrándonos una tonalidad rosada.

3.5. Pruebas extras de constatación de especie

De las 6 pruebas mencionadas en el literal 3.3., dos de ellas fueron de constatación de especie de la cepa bacteriana *Pseudomona spp* obteniendo el siguiente resultado:

Tabla 3-3: Resultados de las Pruebas de constatación de especie.

Pruebas	Resultados
Crecimiento a 42° C	(+)
Hidrólisis de gelatina	(+)

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78).

En base a la Tabla 3-3 se puede observar que la cepa bacteriana *Pseudomona* en este estudio pudo desarrollarse correctamente a altas temperaturas (42°C), capacidad que pocas especies en su género pueden hacerlo (Ver fotografía 4-3). Para finalizar con las pruebas de identificación de especie se aplicó la prueba de hidrólisis de gelatina, la misma que nos dio un resultado positivo debido a que su medio inicial fue sólido y con el transcurso de los días aproximadamente en el séptimo día de haber iniciado la prueba mostró que se iba tornando en un medio líquido (Ver fotografía 5-3) mostrando así que este microorganismo tiene la capacidad de producir enzimas proteolíticas(gelatinasas) que hidrolizan la gelatina (Álvarez Benito, et al., 1990, p.78).



Fotografía 4-3: Crecimiento bacteriano positivo de la cepa bacteriana *pseudomona spp* a 42°C

Fuente: Paña V, S. 2016



Fotografía 5-3: Resultado de la hidrólisis positiva de gelatina de la cepa bacteriana a 23°C

Fuente: Paña V, S. 2016

Es así que mediante las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa de estudio se pudo determinar que la bacteria de Género *Pseudomona* pertenecía a la especie *aeruginosa* la cual fue determinada gracias a la tinción Gram, pruebas bioquímicas y pruebas extras de confirmación como lo fue de crecimiento de la bacteria altas temperaturas (42°C) y la prueba de hidrolisis de gelatina.

3.6. Diseño de la celda de combustible microbiano (CCM)

El diseño fue realizado en el programa “Adobe Illustrator” (Ver la figura 1-3). Las estructuras de estas celdas son de acrílico de un espesor de 3 mm en sus paredes y una capacidad volumétrica de 125 mL, siendo así un cubo con medidas de 5x5x5 cm³, que una vez armadas herméticamente quedaron sin fugas y listas para el experimento final (Ver fotografía 7-3).

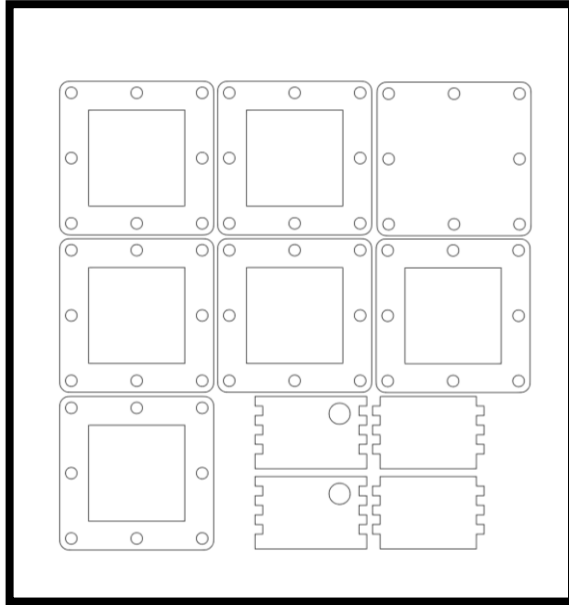
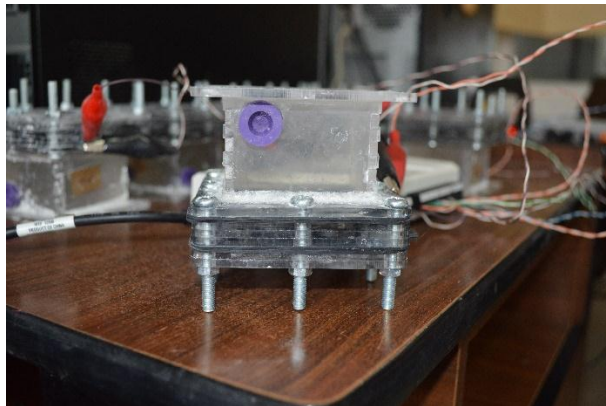


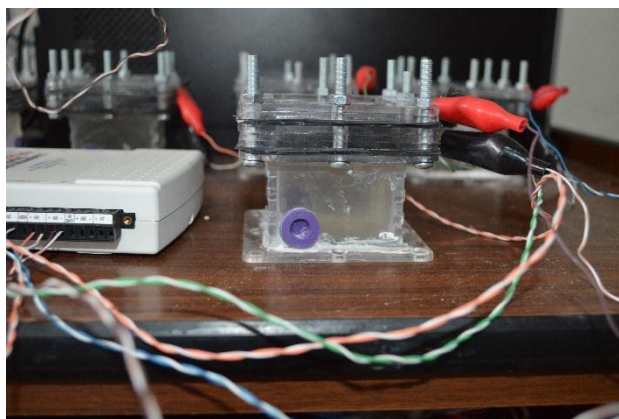
Figura 1-3: Planos de las celdas de combustible microbiano

Realizado por: Paña V, S. 2017



Fotografía 6-3: Posición de la celda para purgar gases y alimentación con sustrato

Fuente: Paña V, S. 2017



Fotografía 7-3: Posición de monitoreo de la celda

Realizado por: Paña V, S. 2017

3.7. Preparación de agua residual sintética

Para la preparación del agua residual una vez realizado los respectivos cálculos se pudieron determinar la alícuota exacta a ser aplicada a cada una de las celdas (Ver tabla 4-3).

Tabla 4-3: Preparación de disoluciones de la muestra a inocular en la MFC

<i>CCM</i>	<i>Concentración ppm</i>	<i>Método</i>
<i>CCM1</i>	50 ppm (Alícuota de 25 mL de la Solución madre de 1000mL)	Standard Method PEE/LS/CF/01
<i>CCM2</i>	100ppm (Alícuota de 50 mL de la Solución madre de 1000mL)	Standard Method PEE/LS/CF/01
<i>CCM3</i>	Agua tesalia-bacteria	Grupo control

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: Standart Method

3.8. Análisis del agua residual sintética después del experimento

El agua residual sintética elaborada a partir de nitrato de potasio y analizada en un fotómetro Marca HACH DR 2800™ (Ver fotografía 8-3) nos dio los resultados que se enmarcan en la Tabla 5-3.



Fotografía 8-3: Fotómetro

Fuente: Paña V, S. 2017

Tabla 5-3: Resultados de los análisis de nitratos en el agua sintética contaminada antes y después del experimento.

Concentración de nitratos de potasio en agua residual sintética	Concentración de nitratos antes del experimento	Concentración de nitratos después del experimento
50 ppm	26,7 mg/L	20,7 mg/L
100 ppm	46,6 mg/L	40,6 mg/L

Realizado por: Silvia Paña

Fuente: Paña V, S. 2017

El análisis de los nitratos se efectuó a los 15 días una vez terminado el monitoreo. La producción de voltaje promedio de salida de la celda CCM1 fue de 0,059 V, proveniente de la concentración de 30 ppm +/- 3,3% de Nitratos, que a su vez se redujo a una concentración de 20,7 ppm +/- 2,5% significando un porcentaje de reducción de 22,47% de su concentración inicial, la CCM2 produjo un voltaje promedio de salida de 0,105 V y la concentración de nitratos en este caso de 60 ppm +/- 13,4% se redujo a una concentración de 40,6ppm +/- 11,6% significando un porcentaje de reducción de 12,87% al final del experimento en 15 días para los dos casos.

3.9. Pruebas ensayo

Las pruebas ensayo realizadas con las CCM ayudaron a definir el medio idóneo aplicar en la prueba final del trabajo de titulación, es así que el medio biológico (MB) a base de bacterias(5mL), generó un menor voltaje que las celdas que funcionaron a base de la aplicación

de un medio químico (MQ) con glucosa (5 mL), el cual se desempeñó de mejor manera en comparación a otras celdas, cabe mencionar que es por tal motivo que se aplicó el medio químico en la prueba final. En base a eso se muestran los resultados en V (voltios) generados con cada uno de los sustratos puestos a prueba (Ver gráfico 1-3):

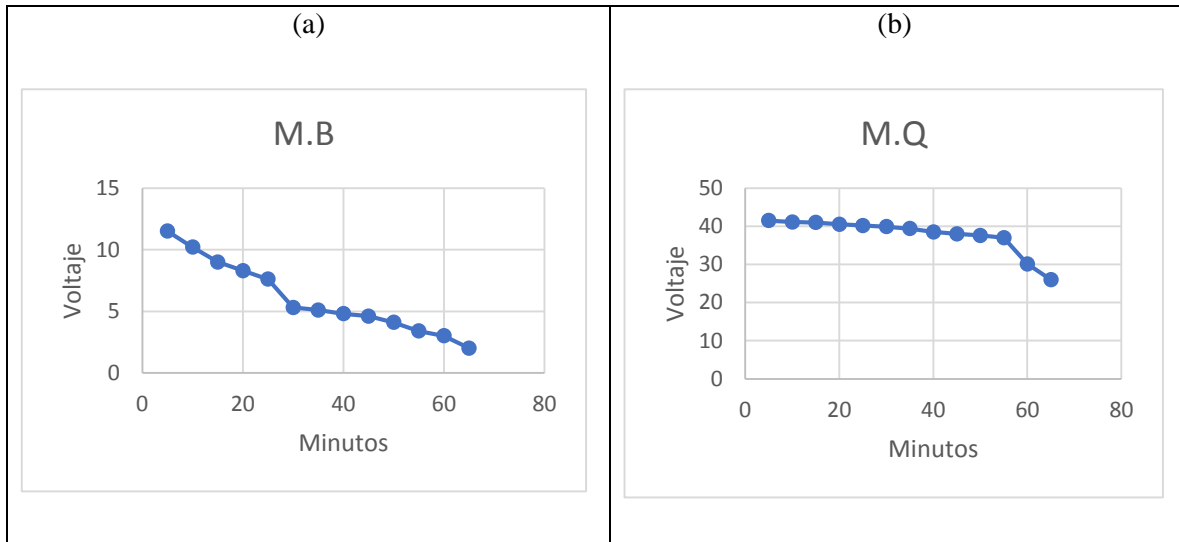


Gráfico 1-3: Producción de bioelectricidad a través de un medio biológico y químico

Fuente: Paña V, S. 2017

Se probó 2 tipos de mediadores el uno biológico y el otro químico probados al mismo tiempo donde (a) La celda con aplicación de un medio biológico tiende a perder su estabilidad en muy corto plazo es decir al minuto 5 ya empieza a decaer, posteriormente se puede observar que en la gráfica del literal b) La celda que funciona a base de la aplicación de un medio químico presenta una mayor estabilidad de generación de bioelectricidad siendo al minuto 55 donde empieza a decaer su producción de manera clara y radical.

Es por tal motivo que para la prueba final del trabajo de titulación se decidió aplicar el medio químico a las celdas en estudio por la razón de que generó una mayor cantidad de bioelectricidad en un mayor intervalo de tiempo, mayor que el medio biológico.

3.10. Prueba Final en la producción de bioelectricidad

Se realizó un registro automático por medio de un sistema de adquisición de datos DAQ NI 6009, este sistema almacenaba los datos de voltaje generado por las celdas en un procesador mediante el sistema de LABVIEW directamente y fueron analizados mediante Excel lo que describe la tabla 6-3; 7-3; 8-3:

Resumen estadístico de la producción de bioelectricidad de las celdas experimentales:

Tabla 6-3: Resultados del resumen estadístico para la celda CCM1 a 30ppm

<i>CCM1 30ppm</i>	
Media	0,061588857
Error típico	0,000226782
Desviación estándar	0,031966564
Varianza de la muestra	0,001021861
Rango	0,131989
Mínimo	0,000013
Máximo	0,132002
Nivel de confianza (95,0%)	0,000444511

Realizado por: Silvia Paña

Tabla 7-3: Resultados del resumen estadístico para la celda CCM2 a 60ppm

<i>CCM2 60ppm</i>	
Media	0,106819084
Error típico	0,000905305
Desviación estándar	0,127609437
Varianza de la muestra	0,016284168
Rango	0,619148
Mínimo	0,000013
Máximo	0,619161
Nivel de confianza (95,0%)	0,001774473

Realizado por: Silvia Paña

Tabla 8-3: Resultados del resumen estadístico para la celda CCM3 (control) solo bacteria con agua pura (tesalia).

<i>CCM3 (control) solo bacteria</i>	
Media	0,050195813
Error típico	0,00013708
Desviación estándar	0,019322429
Varianza de la muestra	0,000373356
Rango	0,112461

Mínimo	0,000149
Máximo	0,11261
Nivel de confianza (95,0%)	0,000268688

Realizado por: Silvia Paña

En los datos máximos y mínimos obtenidos se puede apreciar la relación directa con la concentración del contaminante (nitratos); es decir a mayor carga de contaminante (nitratos) mayor generación de electricidad momentánea y directa.

3.11. Discusión de Resultados

Los tratamientos que se aplicaron en la prueba de ensayo fueron dos en la que a una de ellas se aplicó un medio Biológico (*Pseudomona*) y el otro tratamiento se le aplicó un medio químico, dándonos como resultado que el mejor tratamiento es el químico el cual constaba de glucosa ayudando así a que exista una mayor producción de bioelectricidad y se mantenga su producción energética durante lapsos más largos de tiempo en comparación con el tratamiento biológico. Debido a esto en la prueba final del trabajo de titulación el medio aplicado a cada celda fue de 5mL al inicio del experimento, cabe mencionar que la prueba se formuló en base a dos concentraciones de nitratos de potasio 30 y 60 ppm. Para saber si la cepa bacteriana era capaz de producir bioelectricidad no se aplicó más glucosa en el transcurso del monitoreo, por lo tanto, se realizó un comparativo entre las celdas elegidas para saber cuál es la mejor, y observar si hay una influencia significativa entre las concentraciones del contaminante(nitratos) y la producción neta de bioelectricidad.

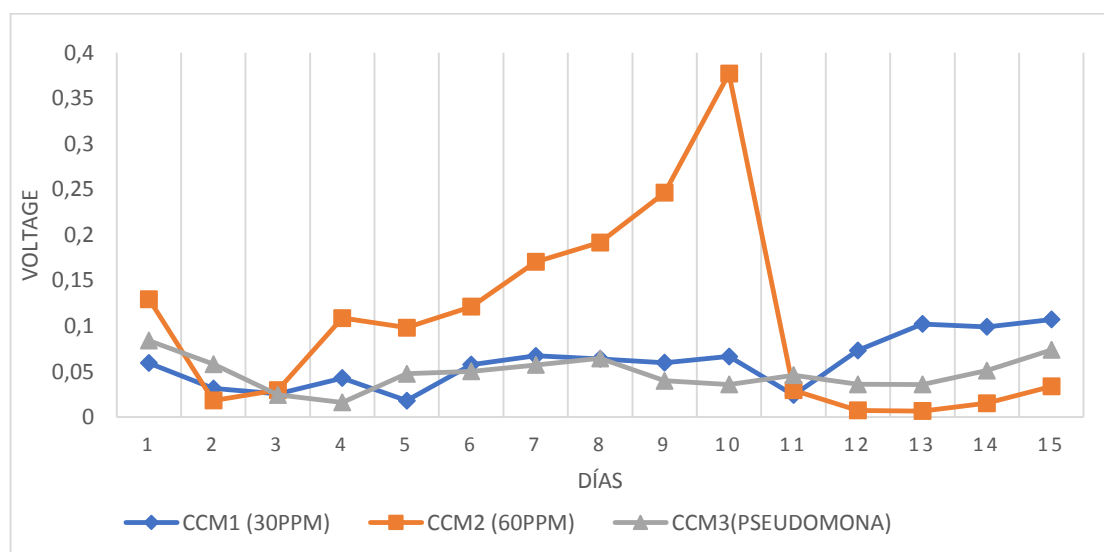


Gráfico 2-3: Bioelectricidad total producida en el transcurso de 15 días

Fuente: Paña V, S. 2017

Es así que en el Gráfico 2-3, se representa la cantidad de voltaje producido en relación a la concentración de nitratos suministradas a las diferentes celdas, en la celda dos (CCM2) con una concentración de nitratos de 60 ppm, que recibía la concentración mayor del contaminante (nitratos) presentaba picos por encima de las demás celdas alcanzando un voltaje máximo de 0,377 V, en comparación a la celda 1 (CCM1) que contenía una concentración menor de nitratos de 30ppm que alcanzo un voltaje máximo de 0,132 V y de igual forma superior a la celda tres (CCM3) que era el grupo control que alcanzo un voltaje máximo de 0,112 V, este grupo control se encontraba formado a base de agua natural(tesalia) y de solo bacteria; para de esa manera comparar la producción de voltaje obtenida a través de esta sin la presencia de contaminante. Por tal motivo este estudio sugiere que la producción de bioelectricidad está relacionada a la concentración del contaminante (nitratos), es decir a mayor concentración de nitratos existe una mayor producción de bioelectricidad.

3.12. Prueba de Hipótesis

3.12.1. Hipótesis Estadística

Relación entre una variable independiente (concentración de nitratos) con respecto a una variable dependiente (generación de bioelectricidad).

Ho: $\delta_{CCM1} = \delta_{CCM2} = \delta_{CCM3}$.

Las varianzas de los niveles de producción de bioelectricidad son las mismas

H1: $\delta_{CCM1} \neq \delta_{CCM2} \neq \delta_{CCM3}$.

No todas las varianzas son iguales al menos una es diferente.

La hipótesis nula menciona que las varianzas de los niveles de producción son iguales a los niveles de producción de bioelectricidad; mientras que la hipótesis alterna nos dice que al menos una es diferente. De esta forma se sabrá si estadísticamente existe una correlación entre las variables planteadas.

3.12.2. Análisis de normalidad

Este análisis permitió escoger el test adecuado para la interpretación de resultados.

Ho: Los datos siguen distribución normal

H1: Los datos no siguen distribución normal

Nivel de significancia " α " = 0.05

A través al análisis del test de normalidad de Shapiro que proyectó un p-value mayor al nivel de significancia de 0,05 se pudo establecer de que se rechaza la hipótesis alternativa H1 y se acepta la hipótesis nula Ho; indicando así que los datos de las celdas siguen una distribución normal al 95 % de confiabilidad.

3.12.3. *Análisis de homocedasticidad*

Este análisis de homocedasticidad en conjunto con el análisis de normalidad permite seleccionar un test ideal para la interpretación de la comprobación de la hipótesis global. Mediante el test de Bartlett a un nivel de significancia de 0,05%; el resultado obtenido fue mayor al nivel de significancia por lo cual el test a elegir es un test paramétrico.

3.12.4. *Test Anova de un factor*

Este análisis sirve para la comparación de varios grupos en una variable cuantitativa, la cual es aplicada para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal.

Ho= Todas las medias de las varianzas son iguales.

H1= Al menos una de las medias de las varianzas es diferente.

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 9-3: Resultados del test Anova de un factor

Factor	N	Media	SD	95% CI	P-Value
CCM1 (30PPM)	15	0,05987	0,02825	(0,02637; 0,09338)	0,045
CCM2 (60PPM)	15	0,1056	0,1062	(0,0721; 0,1391)	
CCM3(PSEUDOMONA)	15	0,04803	0,01799	(0,01452; 0,08154)	

Realizado por: Silvia Paña

Como resultado del test Anova se obtuvo un p value de 0,045 es decir que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa dando como resultado que al menos una de las medias de las varianzas es diferente. Debido a este resultado (Ver tabla 9-3) se menciona que hubo una influencia de la variable dependiente con respecto a la variable independiente según el test aplicado.

Las muestras N y la media con mayor producción de bioelectricidad es las CCM2 y su dispersión es de 0,1 es decir es mínima y su intervalo de confianza al 95% se encuentra entre los intervalos estimados. Entre la CCM1 y la CCM2 presentan una media mayor que la CCM3 siendo esta última utilizada como grupo control manifestándonos que la concentración de nitratos sea de un rango de 30 ppm y 60ppm incide en la producción media de voltaje al final del experimento.

La confiabilidad de los datos está regido al intervalo de 95% con relación a la media.

3.12.5. Comparaciones de medias a través del test de tukey

El método Tukey crea intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores. Este test ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual, de modo que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que especifique.

Por lo tanto, como se aprecia en las 3 celdas representan diferencias entre ellas; siendo la celda tres “CCM3” una representación de media menor en comparación a sus similares no obstante a la diferencia de niveles por cada uno de los tratamientos efectuados es comparable e incluso presenta diferencias entre las concentraciones suministrada de nitratos (Ver tabla 10-3).

Tabla 10-3: Resultado de comparaciones a través del test de tukey

Diferencia de Niveles	Diferencia de medias	SE de la diferencia	95% CI	P-Value
CCM2 (60PPM) - CCM1 (30PPM)	0,0457	0,0235	(-0,0114; 0,1028)	0,139
CCM3(PSEUDOM) - CCM1 (30PPM)	-0,0118	0,0235	(-0,0690; 0,0453)	0,870
CCM3(PSEUDOM) - CCM2 (60PPM)	-0,0575	0,0235	(-0,1146; -0,0004)	0,048

Realizado por: Silvia Paña

La diferencia entre CCM1 y CCM2 nos da un p-value de 0,139 a un nivel de significancia de 0,05 el mismo que es mayor y por lo tanto nos indica que no existe una diferencia e influencia entre las concentraciones de 30ppm y 60 ppm presumible por tratarse de un contaminante particular y específico suministradas al experimento a una confiabilidad del 95%. En cuanto a la CCM1 y

CCM3 nos indica un valor de p-value de 0,0870 que de igual manera es superior al nivel de significancia presumiendo que es debido a la contratación del contaminante que es de 30ppm es decir la más baja de los tratamientos y que con relación a la de la celda CCM3 que contiene la bacteria no existe una diferencia tan significativa entre el tratamiento y el grupo control.

Finalmente, la CCM2 con la CCM3 nos muestra un p-value de 0,048 que es menor al nivel de significancia mostrándonos, así que si existe entre estas dos celdas una diferencia entre la concentración de 60 ppm de la CCM2 y el grupo control CCM3.

3.13. Presentación de resultados

Para determinar la cantidad de energía producida (Voltaje) en las celdas de combustible microbiano se realizó la tabulación y análisis los datos de la Tabla 11-3.

Tabla 11-3: Datos promedio del monitoreo total de 15 días

Día	CCM1 (30PPM)	CCM2 (60PPM)	CCM3(PSEUDOMONA)
1	0,059428513	0,129560798	0,084015786
2	0,031329239	0,018240508	0,058176016
3	0,025471656	0,02967719	0,024374654
4	0,042888668	0,108717439	0,016161559
5	0,018118242	0,098144725	0,047485674
6	0,057536933	0,121269635	0,050178171
7	0,067194141	0,170416564	0,057309972
8	0,06383594	0,19163568	0,064521645
9	0,059681494	0,24628949	0,039803161
10	0,066625682	0,377096996	0,03583809
11	0,024190236	0,029546081	0,046028508
12	0,073314667	0,007309065	0,035952505
13	0,102202717	0,006547277	0,035734318
14	0,099097037	0,015256441	0,051062746
15	0,107191508	0,033670948	0,073837544
Promedio Total	0,059873778	0,105558589	0,048032023

Realizado por: Silvia Paña

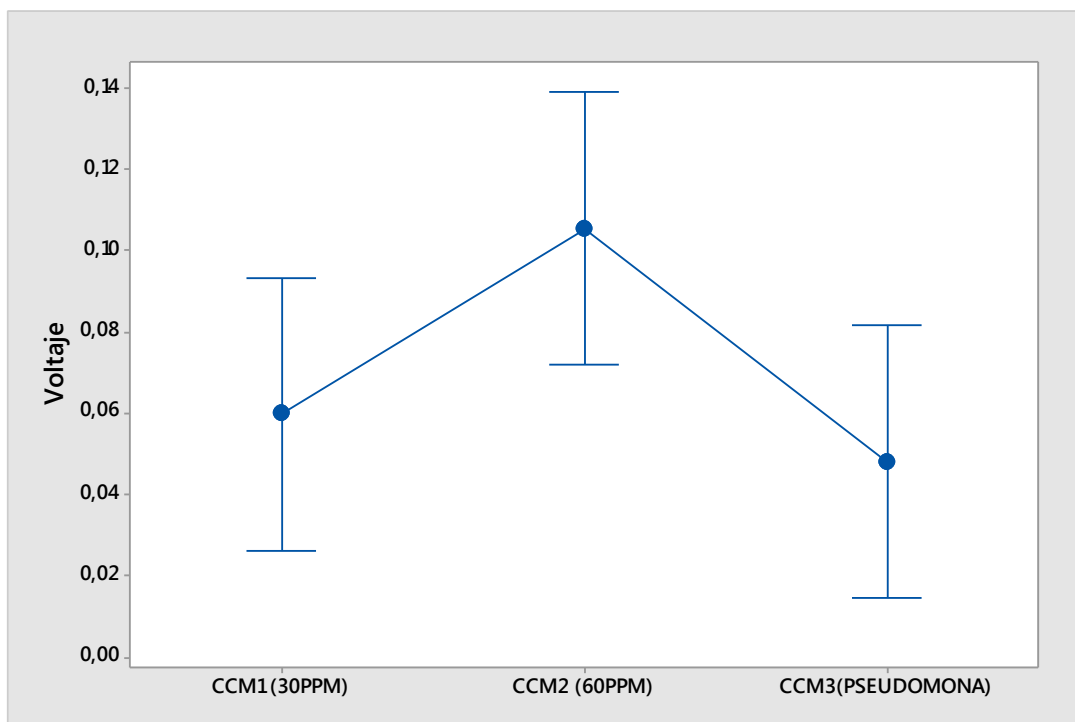


Gráfico 3-3: Producción de bioelectricidad en base a promedios final (Minitab).

Fuente: Paña V, S. 2017

En la Tabla 11-3, se muestran todos los valores promedios por día que se obtuvieron con la ayuda de un dispositivo DAQ NI 6009, que fueron tomados en el transcurso de 15 días cada minuto y estas sirvieron para el análisis y representación final como se observa en el diagrama de intervalos realizado en el programa Minitab (Ver gráfico 3-3) el cual de acuerdo a los datos monitoreados cada min da una relación e incidencia de las concentraciones de nitratos en cada celda es así que la CCM 1 de 30 ppm tiene un voltaje final promedio de 0,059 V, la CCM 2 de 0,105 V y la CCM3 0,048 V. Quedando comprobada la hipótesis en la que se manifiesta si hubo o no producción de bioelectricidad. Cabe recalcar que la toma de datos fue monitoreado al mismo tiempo por el transcurso de 15 días.

CONCLUSIONES

- La cepa bacteriana *Pseudomona* pertenece a la especie *aeruginosa*, la misma que tiene la capacidad de generar bioelectricidad gracias a sus propiedades nitrificantes, propias de dicha especie que al entrar en contacto con el agua residual sintética a base de nitrato de potasio fue capaz de liberar electrones y producir bioelectricidad.
- La configuración adecuada para las CCMs en este estudio investigativo, fue de cámara simple siendo una estructura sencilla formada a base de acrílico de 3mm de espesor, la cual se encontraba formada por dos cámaras la una anódica (microorganismos) y la otra catódica (parcialmente expuesta al aire), en esta configuración la cepa bacteriana fue ubicada en la cámara anódica debido a que este género de bacterias es considerada anaerobia facultativa y al encontrarse por lo tanto en un medio anóxico (cámara anódica) fue capaz de adaptarse al proceso de conversión electroquímica a energía eléctrica a través de un compuesto inorgánico (nitrato de potasio).
- Se utilizó nitrato de potasio como sustrato debido a que es uno de los fertilizantes más usados a nivel agronómico, y considerando que su uso excesivo podría ser un potencial contaminante debido a su bioacumulación en especies asociadas. La mejor producción de bioelectricidad fue a una concentración de nitratos de 60 ppm con un voltaje promedio final de salida de 0,105 V y con un porcentaje de reducción final del contaminante de 12,87%.

RECOMENDACIONES:

- Se recomienda analizar nuevas opciones de sustratos para esta cepa bacteriana con la finalidad de poder generar mayor voltaje dependiendo el estudio que se quiera comprobar.
- Usar las CCMS para producir electricidad a base de compuestos químicos y determinar la diferencia existente con las celdas que producen electricidad a base de compuestos biológicos.
- Analizar nuevos electrodos para las CCMS que resulten eficientes, económicos y amigables con el medio ambiente para un uso de las mismas en lo posterior a gran escala.

BIBLIOGRAFÍA:

ALGECIRA, N., HERNÁNDEZ, C. y IBÁÑEZ, R., "Tratamiento De Aguas Residuales Y Generación Simultánea De Energía Eléctrica Mediante Celdas De Combustible Microbianas" *Universidad Nacional De Colombia*, (2010), (Colombia) pp. 2010.

ASPRILLA, S. y NIZA, I. "Estudio de la bioelectricidad y su potencial aplicación como biotecnología ambiental emergente en el contexto del departamento del Chocó". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 1 (2015), (México) pp. 457-462.

ARGENTINA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN, 2008. Pruebas Bioquímicas. [en línea]. Argentina: Disponible en: [http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2008/MicroBiol/Pruebas Bioquimicas.pdf](http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2008/MicroBiol/PruebasBioquimicas.pdf)
[http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2008/MicroBiol/Pruebas Bioquimicas.pdf](http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2008/MicroBiol/PruebasBioquimicas.pdf).

BENAVIDES, J., et.al. "Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo". *Nova*, vol. 4, (2006), (Colombia) pp. 82-90. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf.

BISWAS, J.K., et.al. "Multi-metal resistance and plant growth promotion potential of a wastewater bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and its synergistic benefits". *Environmental Geochemistry and Health* [en línea], 2017,(India) 10(1007) pp.2-4.[Consulta: 27 Mayo 2017] ISSN 0269-4042. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10653-017-9950-5>.

BUITRÓN, G. & PÉREZ, J. "Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: efecto de la distancia entre electrodos" *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 14, (1), n°1 (2011), (México) pp. 5-11.

CALDERÓN, C., et.al. "Monitoring of Microbial Population of the Páramo Soil of the Charge Zone of Lake Mapahuiña in Chimborazo-Ecuador". *Perfiles*, vol. 1, n° 1(2016.),(Ecuador) pp. 23-30.

CHENG, S., LIU, H. & LOGAN, B. "Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure an improved cathode structure". *ResearchGate* [en línea], 2006, (USA) 8, pp. 489-491. [Consulta: 6 Mayo 2016]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/222433669_Increased_performance_of_single-chamber_microbial_fuel_cells_using_an_improved_cathode_structure.

- CHENG, S. & LOGAN, B.E.** "Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells" *ScienceDirect* [en línea], 2007, (USA) 9, pp. 492-496. [Consulta: 20 Junio 2016]. Disponible en: <https://www.engr.psu.edu/ce/enve/logan/publications/2006-Cheng&Logan-ElecComm.pdf>.
- DOMÍNGUEZ, J.A., et al.** "Disminución de la capacidad de intercambio catiónico en una pila de combustible microbiana y su relación con la densidad de potencia". *Revista Mexicana de Ingeniería Química* [en línea], 2013, (México) 10 (1), pp. 17-28. [Consulta: 20 mayo 2016]. ISSN 0571316522. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62031508015.pdf>
- DU, Z., LI, H. & GU, T.** "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy". *Biotechnology Advances* [en línea], 2007, (China) 25, pp. 464-482. [Consulta: 29 mayo 2016] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582720>.
- FALCÓN, A., LOZANO, E. & JUÁREZ, K.** "Bioelectricidad". *BioTecnología*, vol. 13, n°. 3(2009),(México) pp. 62-78.
- FENG, Y., et.al.** "Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells". *Journal of Power Sources*, vol. 195, n°. 7 (2010), (USA) pp. 1841-1844.
- FERNANDO, E., KESHAVARZ, T. y KYAZZE, G.** "Simultaneous co-metabolic decolourisation of azo dye mixtures and bio-electricity generation under thermophillic (50 ° C) and saline conditions by an adapted anaerobic mixed culture in microbial fuel cells". *Bioresource Technology* [en línea], 2013, (Francia) 127, pp. 1-8. [Consulta: 20 Julio 2016] ISSN 0960-8524. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.065>.
- GARCÍA, N., GARCÍA, D. y SÁNCHEZ, E.** "Producción de bioelectricidad utilizando nanofibras duales de TiO₂/carbón como electrodo de una celda de combustible microbiana" *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León*, vol. 71 (2015), pp. 102-103.
- HARDALO, C. y EDBERG, S.C.** "Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from drinking water". *Crit Rev Microbiol* [en línea], 1997, (USA) 23 (1), pp. 47-75. [Consulta: 21 junio 2016] Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9097014.
- HERNÁNDEZ, A. y LABBÉ, J.** "Microalgas, cultivo y beneficios". *Revista de Biología Marina*

- y *Oceanografía*[en línea], 2014, (Chile) 49 (2), pp. 157-173. [Consulta: 12 junio 2016] ISSN 07181957. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-19572014000200001&script=sci_arttext
- HORCAJADA, L. et al.** "Acoplamiento de celdas microbiológicas de combustible en humedales artificiales para depuración de aguas residuales" *AGUAS RESIDUALES. INFO.*(España) , pp. 4.
- HSIEH, M.-C. y CHUNG, Y.-C.**, 2014. Measurement of biochemical oxygen demand from different wastewater samples using a mediator-less microbial fuel cell biosensor. *Environmental Technology* [en línea], vol. 35, no. 17, pp. 2204-2211. ISSN 0959-3330. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2014.898700>.
- INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE**, *Nitrato de potasio* [en línea],(2017) S.l.: s.n. Disponible en: [https://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/E33AED1504ADCE3D85257BBA0059BEAE/\\$FILE/NSS-ES-11.pdf](https://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/E33AED1504ADCE3D85257BBA0059BEAE/$FILE/NSS-ES-11.pdf).
- KASHEFI, K., et.al.**, "Reductive Precipitation of Gold by Dissimilatory Fe (III)-Reducing Bacteria and Archaea Reductive Precipitation of Gold by Dissimilatory Fe (III)-Reducing Bacteria and Archaea". *Applied and environmental microbiology* [en línea], vol. 67, (2001), pp. 3275-3279. ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.67.7.3275. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=11425752&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum%5Cnhttp://www.ncbi.
- LARA, C., VILLALBA, M. y OVIEDO, L.**, "Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia". *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], vol. 9, no. 2, (2008) pp. 6-14. ISSN 1909-8758. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711>.
- LAWLOR, S.**, "Aislamiento de bacterias electrogénicas a p artir de suelos y sedimentos de uruguay" (2016) S.l.: s.n.
- LI, W., SHENG, G., LIU, X. y YU, H.**"Bioresource Technology Recent advances in the separators for microbial fuel cells". *Bioresource Technology* [en línea], vol. 102, no. 1, (2011), pp. 244-252. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2010.03.090. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.090>.
- LOGAN, B., et.al.**, "Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology". *Environmental Science &Technology*, vol. 40, no. 17 (2006), pp. 5181-5192.
- LOGAN, B.E. y RABAEY, K.** "Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by

- Using Microbial Electrochemical Technologies". *Science* [en línea], vol. 337, no. 6095(2012), pp. 686-690. ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.1217412. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1217412>.
- LOGAN, B.E., REGAN, J.M.** "Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells". *Trends in Microbiology*, vol. 14, no. 12 (2006), pp. 512-518. ISSN 0966842X. DOI 10.1016/j.tim.2006.10.003.
- LOGROÑO, W., et.al.** "A terrestrial single chamber microbial fuel cell-based biosensor for biochemical oxygen demand of synthetic ricewashed wastewater". *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 1 (2016) ISSN 14248220. DOI 10.3390/s16010101.
- LÓPEZ, L.E., et.al.** "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Investigación en Discapacidad*, vol. 3, (2014), pp. 10-18.
- LOVLEY, D.** "Extracellular electron transfer: Wires, capacitors, iron lungs, and more". *Geobiology*, vol. 6, no. 3, (2008), pp. 225-231. ISSN 14724677. DOI 10.1111/j.1472-4669.2008.00148.x.
- LUJÁN ROCA, D.Á.** "Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso". *Acta bioquímica-clínica latinoamericana* [en línea], vol. 48, no. 4, (2014), pp. 465-474. ISSN 0325-2957. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009.
- MACFADDIN, J.F.** "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica", (2003), S.l.: s.n. ISBN 950061572X, 9789500615723.
- MALVANKAR, N. y LOVLEY, D.** "Microbial Nanowires : A New Paradigm for Biological Electron Transfer and Bioelectronics". , vol. 1003 , (2012), pp. 1039-1046. DOI 10.1002/cssc.201100733.
- MEJÍA, A., VÁSQUEZ, J. y GONZÁLEZ, A.** "Bacterias, fuente de energía para el futuro". *Tecnura* [en línea], no. 32, (2012), pp. 118-143. ISSN 0123921X. DOI <http://dx.doi.org/10.14483/udistrital.jour.tecnura.2012.2.a10>. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/tecn/v16n32/v16n32a11.pdf>.
- MENDOZA, I., FERNÁNDEZ, N. y ETTIENE, G.** "Uso de la Moringa oleifera como coagulante en la potabilización de las aguas Use of Moringa oleifera as coagulant in the water treatment". *Ciencia 8*, vol. 8, no.8, (2000), pp. 235-242. ISSN 1315-2076.
- MIN, B., et.al.** "Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells". *Water Research*, vol. 39, (2005), pp. 4961-4968. DOI 10.1016/j.watres.2005.09.039.

- MORA, A. y BRAVO, E.** "Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente" *Acta Biológica Colombiana* [en línea], vol. 22, no. 1, (2017) pp. 27. ISSN 1900-1649. DOI 10.15446/abc.v22n1.57189. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/57189>.
- NUÑEZ, A.** "Bacterias productoras de electricidad". *Actualidad SEM* [en línea], (2008), pp. 1-6. Disponible en: <http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/45/Geobacter.pdf>.
- OCHOA, S.A., et.al.** "Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas" , vol. 70, no. 2, , (2013), pp. 138-150.
- ORTIZ, G., MORENO, L. y JIMÉNEZ, J.,** [sin fecha]. Bacterias Eléctricas. *Upo* [en línea], pp. 4. Disponible en: https://www.upo.es/moleqla/export/sites/moleqla/documentos/Articulo_destacado_numero_4.pdf.
- PANT, D., et.al.** Bioresource Technology A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *BIORESOURCE TECHNOLOGY* [en línea], (2009), pp. 1-11. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2009.10.017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>.
- PAREDES, M.C.** "Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas" [en línea], (2013), S.l.: s.n. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>.
- RAMÍREZ, F.,et.al.** "Aplicación de la tecnología de Pilas de Combustible Microbianas en depuración de aguas de origen urbano e industrial con producción simultánea de energía eléctrica" , (2010) S.l.: s.n.
- REVELO, D., HURTADO, N. y RUIZ, J.** "Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica Microbial Fuel Cells (MFCs): A Challenge for the Removal of Organic Matter and Electricity Generation". *Información Tecnológica*, vol. 24, no. 6, (2013) pp. 17-28. DOI 10.4067/S0718-07642013000600004.
- RÍOS, S.** "Generación de bioelectricidad microbiana con estiércol de ganado vacuno, mediante celdas de combustible microbiano, estación experimental TUNSHI ESPOCH» [en línea]. (2016) S.l.: ESPOCH. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5662/1/236T0214.pdf>.
- RODRÍGUEZ, F., SOLORZA, O. y HERNÁNDEZ, E.,** 2013. *Celdas de combustible*. S.l.: s.n.

ISBN 9788578110796.

- RODRIGUEZ, N. y TORO, C.** "Estandarización del tiempo de incubación y concentración de CaCO_3 , SO_4 $(\text{NH}_4)_2$ y KNO_3 para la prueba del NPM con bacterias nitrificantes y desnitrificantes usando como matriz compost". (2013) S.l.: s.n.
- SELL, D., KRAMER, P. y KREYSA, G.** "Applied Microbiology Biotechnology Rapid communication Use of an oxygen gas diffusion cathode". *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol.4, (1989), pp. 211-212. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00262465>.
- TORRES MOLINARES, C. y ESPINO, K.** "Laboratorio de Sistemas Ambientales". [en línea], (2006). S.l.: Disponible en: <http://www.utp.ac.pa/documentos/2011/pdf/PCUTP-CIHH-LSA-204-2006.pdf>.
- VASIL, M.L.** "Pseudomonas aeruginosa biology, mechanisms of virulence, epidemiology". *NCBI*, (1986), pp. 800-805.
- YOU, S., et.al.** "Increased sustainable electricity generation in up-flow air-cathode microbial fuel cells". *BIOSENSORS BIOELECTRONICS*, vol. 23, (2008), pp. 1157-1160. DOI 10.1016/j.bios.2007.10.010.
- ZHOU, M., et.al.,** Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 88, no. 4, pp. 508-518.

ANEXOS

ANEXO A: Muestreo de cepa bacteriana *Pseudomona spp.*



Fotografía 1A: Cepa bacteriana *Pseudomona spp.*



Fotografía 2A: Colocación de la bacteria *Pseudomona spp.* en el caldo nutritivo.

ANEXO B: Adecuación y replicación de la cepa *Pseudomona spp* en el laboratorio clínico-ESPOCH.

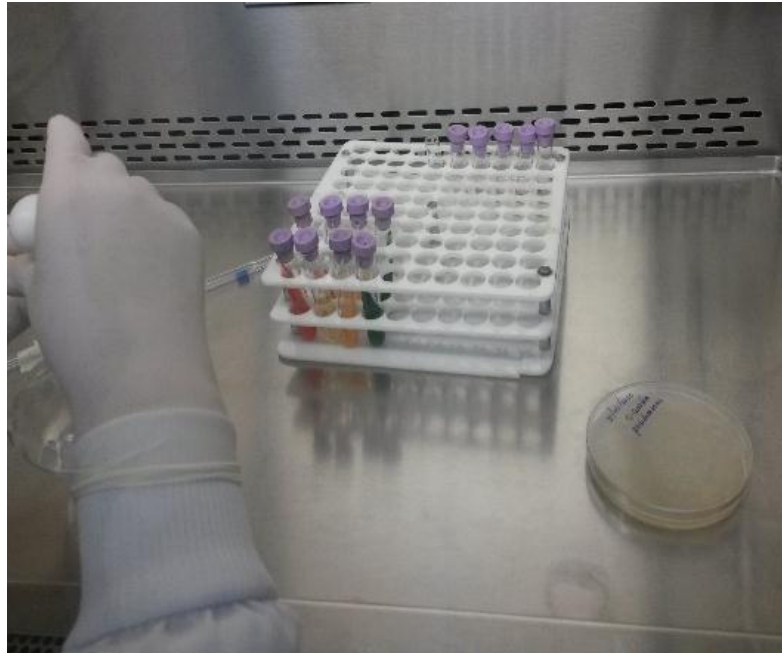


Fotografía 1B: Adecuación de las muestras de los caldos nutritivos (30°C) y crecimiento bacteriano de la cepa *Pseudomona spp*.



Fotografía 2B: Colocación de agares nutritivos en las cajas Petri para la replicación de la cepa bacteriana.

ANEXO C: Identificación de la cepa *Pseudomona spp.*



Fotografía 1C: Preparación de los medios a usar en la aplicación de las pruebas bioquímicas



Fotografía 2C: Toma de una alícuota bacteriana



Fotografía 3C: Siembra de la cepa bacteriana



Fotografía 4C: Pruebas bioquímicas en la estufa a 30 °C

ANEXO D: Monitoreo de las CCMS



Fotografía 1D: Inyección de glucosa antes iniciar el monitoreo



Fotografía 2D: CCMS durante el monitoreo (15 días)



Fotografía 3D: Inyección de sustrato (nitratos) durante el monitoreo