

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



COMPARACION DE LA ELECTROACTIVIDAD DE BIOPELICULAS
FORMADAS POR *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* PARA POSIBLE
USO EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

EDUARDO ROBERTO CASTRO TORRES

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2019

SAN SALVADOR EL SALVADOR CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORA DE AREA EN MICROIOLOGIA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

ASESORA DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD Y RECURSOS NATURALES

MSc. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

DOCENTES ASESORAS

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

Lcda. Dalila Guadalupe Anaya Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a las docentes asesoras: Dra. Tania Ethel Cuadra, Licda. Dalila Anaya; asimismo a los docentes del tribunal evaluador: MSc. Coralia González de Díaz y Licda. Zenia Arévalo de Márquez quienes han dirigido el presente trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias y enseñanzas. Agradezco a la Licda. Rosa Rivas de Lara y al Lic. Henry Hernández quienes muy amablemente me recibieron en las instalaciones del Laboratorio de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia para poder llevar a cabo el análisis parte de la demanda química de oxígeno, por sus valiosos consejos y su apoyo material. También agradezco a los laboratoristas de Microbiología y Físicofarmacia de la Facultad de Química y Farmacia. A todos gracias y que Dios les bendiga, deseándoles muchos éxitos en sus labores.

Eduardo Castro.

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero agradecer a Dios a quien dedico todos mis logros, por darme el don de la perseverancia, sabiduría y la fuerza de voluntad necesaria para alcanzar mis metas, y por guiarme para tomar una de las mejores decisiones de mi vida. A mi mamá Rosa Glendis Torres por ser un gran ejemplo de perseverancia y valentía en mi vida, y por incentivar mi interés en la ciencia y su apoyo para poder culminar mi carrera, por sus consejos y amor que siempre me ha brindado, gracias por enseñarme a dar gracias a Dios en todo momento. A mi tía Edith Torres de Cantón quien me ha brindado su cariñoso apoyo, porque siempre ha estado dispuesta a ofrecer sus valiosos consejos y por creer en mis esfuerzos. A mi hermana por creer en mí, por apoyarme en todos mis proyectos, por su ejemplo de superación y sacrificio. A mis amigos que siempre me han dado su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo, por creer en mí gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas y por compartir momentos inolvidables. A todos esos docentes que saben transmitir elocuentemente sus experiencias, enseñanzas y por ser ejemplo de motivación. A todas las personas que de alguna forma fueron parte de este trabajo por crecer en nuestro trabajo y brindarnos su apoyo. Infinitas gracias a todos que Dios todopoderoso y la Virgencita los cuiden y les llenen de bendiciones sus vidas y sus hogares

“Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida”.

Marco Aurelio

Sin dudar esta meta solo es el comienzo de grandes cosas que están por venir en mi carrera profesional y espero que sea mi primer granito de arena en este mundo.

Eduardo Roberto Castro Torres.

INDICE

Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 Celdas de Combustible	22
3.2 Celdas de Combustible Biológicas	24
3.3 Tipos de celdas de combustibles biológicas	25
3.4 Celdas de Combustible Microbianas (CCM)	25
3.5 Arquitectura de una celda de combustible	27
3.5.1 Ánodo	28
3.5.2 Cátodo	29
3.5.3 Membrana de intercambio de protones (MIP)	29
3.5.4 Condiciones de operación de una CCM	30
3.6 Microorganismos en una CCM	31
3.6.1 Microorganismos a utilizar	32
3.7 Bioánodo	34
3.7.1 Materiales para la construcción del bioánodo	34
3.8 Biopelícula	36
3.8.1 Mecanismos de comunicación intercelular	36
3.8.2 Quorum Sensing	37

3.8.3 Formación de una Biopelícula	38
3.8.4 Estudio de una biopelícula	39
3.9 Mecanismos de transferencia de electrones en biopelículas	40
3.9.1 Transferencia directa de electrones	40
3.9.2 Transferencia de electrones mediada por transportadores	41
3.10 Principios electroquímicos y caracterización del ánodo	42
3.10.1 Métodos voltamétricos para la caracterización del ánodo.	43
3.11 Comportamiento microbiano del ánodo	44
3.12 Aplicaciones de una celda de combustible microbiana	45
3.12.1 Tratamiento de aguas residuales	45
3.12.2 Demanda Química de Oxígeno	46
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 Investigación Bibliográfica	49
4.3 Parte experimental	50
4.3.1 Identificación del microorganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
4.3.2 Identificación del microorganismo <i>Bacillus subtilis</i>	50
4.3.3 Procedimiento para la estandarización de los microorganismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	51
4.3.4 Cuantificación de biopelículas producida por los microorganismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	52
4.3.5 Cuantificación de biopelículas	53
4.3.6 Construcción de los electrodos	54

4.3.7 Inoculación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i> sobre su respectivo electrodo y medición voltamétrica de los mismos.	54
4.3.8 Evaluación de la eficiencia en remoción de residuos de los bioelectrodos.	55
4.3.9 Procedimiento para la determinación de la demanda química de oxígeno	56
Capítulo V	
5.0 Resultados	58
5.1 Resultados la verificación de la identidad de las cepas	58
5.1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	58
5.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
5.2 Estandarización de los inóculos.	61
5.3 Cuantificación de Biopelículas	62
5.4 Construcción de los bioelectrodos	65
5.5 Generación de energía a partir de ARS como sustrato	70
5.6 Eficiencia en la remoción de residuos	76
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	79
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	82
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Procedimiento para la identificación de *Pseudomona aeruginosa*.
2. Procedimiento para la identificación de *Bacillus subtilis*.
3. Procedimiento para la estandarización de los microorganismos.
4. Procedimiento para la cuantificación de biopelículas.
5. Procedimiento para la construcción de los electrodos.
6. Procedimiento para la inoculación de los microorganismos sobre el electrodo y medición voltamétrica de los mismos
7. Preparación de reactivos.
8. Preparación de medios de cultivo.
9. Método de tabulación de datos de absorbancia en la cuantificación de biopelícula.
10. Evidencia del análisis de cuantificación de biopelículas.
11. Reactivos utilizados para la determinación de DQO. Las cubetas contienen dicromato de potasio y ácido sulfúrico.
12. Equipos utilizados para la determinación de DQO, A: Termoreactor TR 300; Fotometro

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pag. N°
1. Principio de operación de una celda de combustible de hidrógeno	23
2. Funcionamiento de una celda de combustible microbiana	27
3. Arquitectura de una celda de combustible microbiana	28
4. Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de <i>Bacillus subtilis</i> . A: cultivo en TSA, B: tinción de Gram, C: prueba de citrato, D: degradación del almidón.	58
5. Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A: cultivo en TSA, B: tinción de Gram, C: prueba de Oxidasa.	60
6. Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A: cultivo en agar Cetrimide, B: prueba de TSI.	61
7. División de la microplaca utilizada para el análisis De cuantificación de biopelículas	63
8. Comparación de las densidades ópticas obtenidas de las ocho repeticiones entre ambos microorganismos. Línea A <i>Bacillus subtilis</i> , Línea B: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	64
9. Sistema construido para el monitoreo del bioelectrodo A: Camara anódica, B: ánodo, C: cátodo, D: cámara catódica, E: Puente salino, F: multímetro, G: tubo para realizar las inoculaciones.	66

10. Voltaje generado por las barras recubiertas con biopelícula durante tres inoculaciones sucesivas. A: <i>Bacillus subtilis</i> Multímetro Dawson®; B: <i>Bacillus subtilis</i> multímetro Truper®; C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multímetro Dawson®; D: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multímetro Truper®.	67
11. Aclimatación de la celda con tres aplicaciones sucesivas de inóculo, las flechas indican los tiempos de inoculación.	68
12. Burbujeo en la cámara catódica.	69
13. Generación de voltaje a partir de glucosa como combustible, contenida en una muestra de agua residual sintética. A: <i>Bacillus subtilis</i> Multímetro Dawson®; B: <i>Bacillus subtilis</i> multímetro Truper® C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Multímetro Dawson®; D: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multímetro Truper®.	71
14. Burbujas en la cámara anódica.	72
15. Generación de voltaje a partir de glucosa como sustrato	73
16. Formación de gradiente de concentración en la cámara anódica	75

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pag. N°
1. Clasificación de la capacidad de producción de biopelícula según el resultado de densidad óptica.	53
2. Resumen de las pruebas para la verificación de la identidad de <i>Bacillus subtilis</i> .	59
3. Resultados de la estandarización de los microorganismos <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
4. Densidades ópticas de corte resultantes de los triplicados de las densidades ópticas de los controles de las 8 repeticiones.	63
5. Resultados de los recuentos realizados a las barras de carbono para confirmar la presencia de una biopelícula.	70
6. Resultados del análisis del DQO inicial y de la muestra tratada por cada microorganismo.	76
7. Comparación de los parámetros evaluados entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	77

ABREVIATURAS

ARS:	Agua residual sintética.
CASOY:	Caseína-soya
CC:	Celdas de combustible.
CCM:	Celdas de combustible microbianas.
cm:	Centímetros.
KCl:	Cloruro de potasio
NaCl:	Cloruro de sodio.
CO₂:	Dióxido de carbono.
DO:	Densidad óptica.
DOc:	Densidad óptica de corte.
DQO:	Demanda Química de Oxígeno.
EPS:	Exopolisacáridos.
ERR:	Eficiencia en remoción de residuos.
°C:	Grados Celsius.
g:	Gramos
Cr₂O₇²⁻:	Ion dicromato
L:	Litros.
MEC:	Matriz extracelular.
MIP:	Membrana de intercambio protónico.
mL:	Mililitros.
mV:	Mili voltios.
nm:	Nanómetros.

- N₂:** Nitrógeno gaseoso o molecular.
- O₂:** Oxígeno gaseoso o molecular.
- %T:** Porcentaje de transmitancia.
- SD:** Desviación estándar
- TSA:** Agar tripticasa-soya.
- TSB:** Caldo tripticasa-soya.
- TSI:** Triple azúcar-hierro.
- UFC:** Unidades formadoras de colonias.

RESUMEN

Los sistemas basados en el uso de microorganismos como catalizadores, a través de las cuales se pretende convertir sustratos degradables, como por ejemplo la materia orgánica en aguas contaminadas, a energía eléctrica mediante el metabolismo microbiano, se denominan celdas de combustibles microbianas. Debido a que esta tecnología se encuentra en una etapa temprana de desarrollo, es necesario realizar estudios que permitan caracterizar la capacidad que tienen los microorganismos de convertir la energía química de la materia orgánica en electricidad. Esta investigación se realizó con el propósito de comparar la electroactividad de biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* con la finalidad de contemplar el posible uso de estas bacterias en celdas de combustible microbiana. Para lo cual primero se demostró la capacidad de estas especies para producir una biopelícula, luego se construyeron los electrodos, posteriormente se fijaron las bacterias sobre esos electrodos y se midió el voltaje generado por los mismos. Finalmente, se evaluó la eficiencia en remoción de residuos. La construcción de los bioelectrodos fue posible, sin embargo, se observaron voltajes negativos alrededor de -15 mV y durante el uso de agua residual sintética, los voltajes generados por los electrodos llegan alrededor de -30 mV, mientras que los resultados del análisis de DQO no fueron concluyentes. De esa forma se logró cumplir algunos de los objetivos. Esta tendencia observada de las mediciones de voltaje, sugiere que el sistema construido sufrió un fenómeno conocido como inversión del voltaje, a pesar de esto, se observó la generación de gas en la cámara catódica, que deja en evidencia la transferencia electrónica producida en el sistema. Por lo tanto, lo más recomendable es realizar modificaciones al diseño del sistema construido para lograr reducir la incidencia del fenómeno de inversión del voltaje y permita aumentar la eficiencia en la generación de voltaje.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua limpia, así como de energía asequible y no contaminante constituyen los objetivos 6 y 7 respectivamente del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. En el país, de acuerdo al informe de la calidad del agua de los ríos de El Salvador 2017 del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN), ningún sitio cumple con la aptitud de uso de agua cruda para potabilizar por métodos convencionales, evaluados a través de las guías de calidad de agua.

Lo anterior sumado al requerimiento de controlar y limitar las emisiones de carbono, nos exige hacer hincapié en buscar soluciones y desarrollar tecnologías sostenibles que reduzcan la incidencia de estas problemáticas.

Se tiene una alternativa que es viable y se presenta como una posible opción para reducir la incidencia de estas problemáticas, la cual es, el uso de Celdas de Combustible Microbianas (CCM) conocidas también como MFC por sus siglas en inglés (Microbial Fuel Cell), estas celdas utilizan microorganismos como catalizadores para transformar la energía química de sustratos biodegradables a electricidad. El tipo de especie y como logra colonizar el electrodo tendrá influencia en el desempeño de la celda. Estos dispositivos han creado grandes expectativas en la comunidad científica porque es posible utilizar la materia orgánica de las aguas residuales como combustible y así, simultáneamente a la producción de electricidad se consigue la depuración de las aguas contaminadas. Sin embargo, estas celdas se encuentran en una etapa temprana de desarrollo y es necesario realizar estudios significativos para mejorar esta tecnología.

Esta investigación se llevó a cabo con el propósito de ampliar el conocimiento sobre la electroactividad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Primero

se demostró la capacidad de estas especies para producir una biopelícula, luego se construyeron los electrodos y se fijaron las bacterias sobre la superficie de los electrodos. Se midió el voltaje generado por los electrodos después de realizar inoculaciones sucesivas. Por último, se evaluó la eficiencia en remoción de residuos en agua residual sintética, utilizando la Demanda Química de Oxígeno (DQO). Se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* tiene mayor potencial de formar biopelícula, además fue la posible construir los bioelectrodos.

Con el desarrollo de estos de esta investigación se logró obteniendo evidencia de la actividad eléctrica de los microorganismos a pesar de que el sistema desarrollo el fenómeno de inversión del voltaje. Por lo tanto, lo más recomendable es realizar modificaciones al diseño del sistema construido para lograr reducir la incidencia del fenómeno de inversión del voltaje y aumentar la eficiencia en la generación de voltaje

La investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Microbiología y Físicofarmacia de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador durante los meses de julio a septiembre del año 2018

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Comparar la electroactividad de biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* para posible uso en celdas de combustible microbiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 Cuantificar la capacidad de producción de biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

2.2.2 Construir electrodos de barra de grafito recubiertos con biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Bacillus subtilis*.

2.2.3 Evaluar la actividad eléctrica de la biopelícula formada en los electrodos a partir de la medición de voltaje en función del tiempo.

2.2.4 Monitorear el desempeño de los electrodos construidos a través de la medición del cambio del voltaje y el porcentaje de reducción de residuos durante el tratamiento de agua residual sintética.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

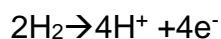
3.1 Celdas de Combustible

Las celdas de combustible (CC) son dispositivos electroquímicos que convierten la energía química intrínseca o latente en los combustibles, directamente en energía eléctrica. Estos dispositivos pueden procesar una amplia variedad de combustibles y oxidantes, aunque los más utilizados son el gas natural y el hidrogeno en los que se utiliza aire como oxidante. ⁽¹⁴⁾

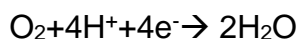
Se define como combustible a: todo aquel material que, al ser quemado u oxidado, puede producir calor, energía o luz; y como oxidante o comburente: a todo compuesto químico que oxida a otra sustancia en reacciones electroquímicas o de óxido-reducción. En estas reacciones, el compuesto oxidante se reduce, es decir gana electrones. ⁽¹⁴⁾

En una CC, el combustible alimenta continuamente al ánodo (electrodo negativo) y un oxidante (a menudo oxígeno en el aire) alimenta continuamente al cátodo (electrodo positivo). Las reacciones electroquímicas tienen lugar en los electrodos para producir una corriente eléctrica a través de un electrolito, mientras se conduce una corriente eléctrica complementaria que realiza trabajo en la carga (ver figura N°1). ⁽¹⁴⁾

Por ejemplo, en el ánodo de una celda de combustible que utiliza hidrogeno, se lleva a cabo la reacción de oxidación en donde el gas hidrogeno es ionizado. ⁽¹⁴⁾



En el cátodo, se lleva a cabo la reacción de reducción en donde el oxígeno del aire, reacciona con los protones y los electrones tomados del ánodo para formar agua. ⁽¹⁴⁾



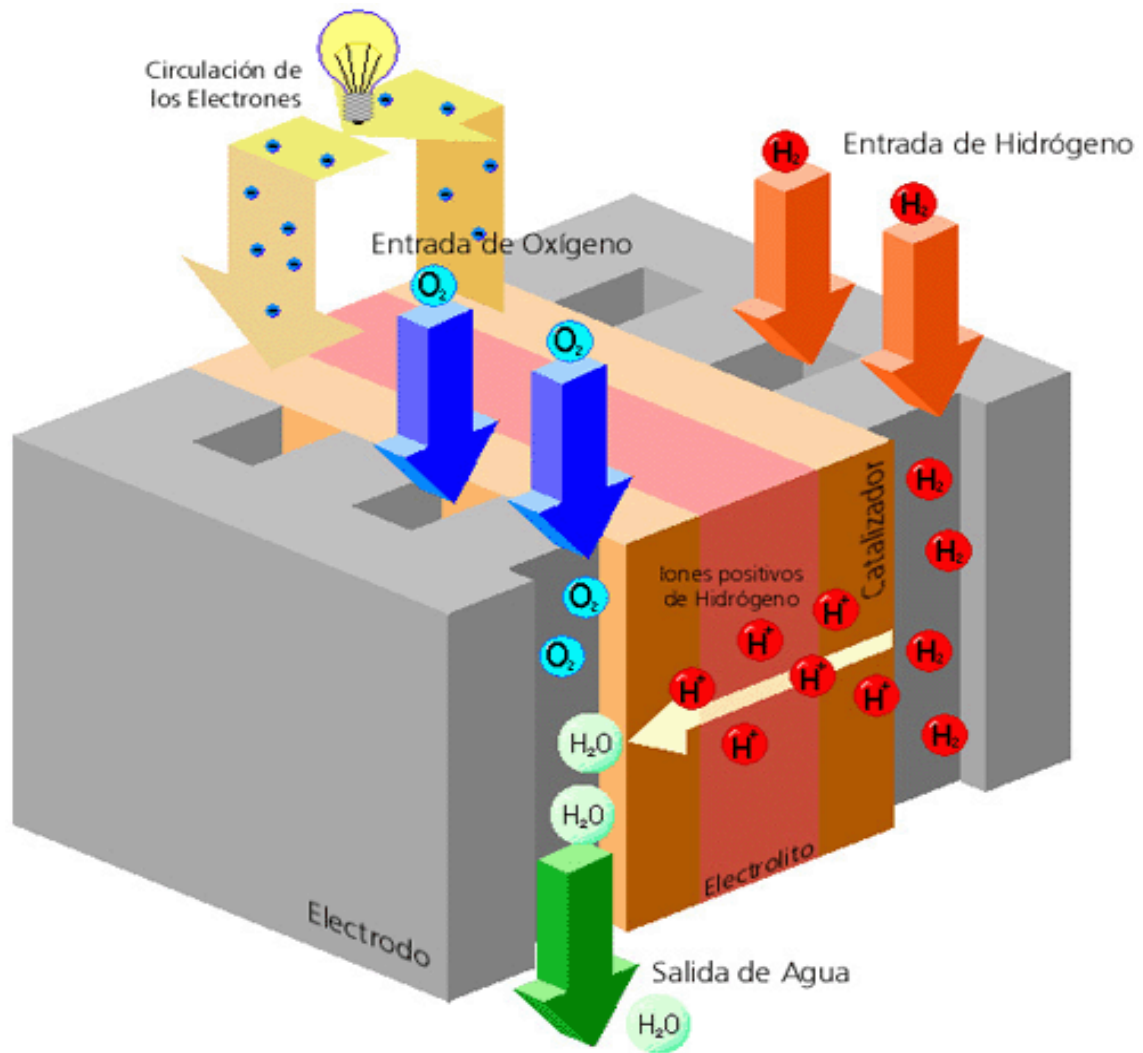


Figura N°1: Principio de operación de una celda de combustible de hidrógeno. ⁽¹⁴⁾

Los electrones liberados por el gas hidrogeno fluyen desde el ánodo hacia el cátodo en un circuito externo y los protones (H^+) pasan a través de electrolitos. Es importante destacar que el electrolito solo debe permitir únicamente la transferencia de protones (u otros iones en el caso de otros tipos CC) y no la transferencia de electrones (es decir, el electrolito debe ser un aislador electrónico). De lo contrario, los electrones no pasarían por el circuito externo y, por lo tanto, "cortocircuitarían" la celda. ⁽¹⁴⁾

En teoría, cualquier sustancia susceptible a oxidación química que puede suministrarse continuamente, se puede usar para generar electricidad como combustible en el ánodo, de manera similar, el oxidante puede ser cualquier fluido que pueda reducirse a una velocidad suficiente. Por razones prácticas, el oxidante más común es el oxígeno gaseoso, que está fácilmente disponible en el aire. Además, debido a las limitaciones cinéticas de los catalizadores para la oxidación, los combustibles que se usan habitualmente son aquellos con moléculas simples como hidrógeno, metano y metanol. ⁽¹⁴⁾

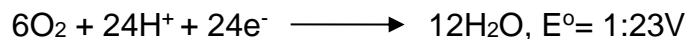
3.2 Celdas de Combustible Biológicas

Las CC biológicas funcionan de manera similar a las CC químicas con un suministro de combustible al ánodo y un suministro de oxidante al cátodo. La característica distintiva, central de un CC biológica, es el uso de un microorganismo vivo o parte de uno, como biocatalizador. ⁽¹⁴⁾

Las CC biológicas convierten la energía química de sustratos, directamente en energía eléctrica. En el ánodo, un combustible como, por ejemplo, la glucosa se oxida por la presencia de un biocatalizador de acuerdo con la reacción ⁽¹⁴⁾:



En el cátodo, el oxidante se reduce (por ejemplo, oxígeno):



La reacción electroquímica resultante crea una corriente eléctrica a medida que se desprenden electrones y protones a partir de la oxidación del combustible. Los potenciales de celda teóricos para tales reacciones son similares a los de CC convencionales. ⁽¹⁴⁾

3.3 Tipos de celdas de combustibles biológicas ⁽¹⁴⁾

Se clasifican con base en las 4 distintas maneras en que pueden utilizarse los microorganismos, para producir energía eléctrica:

1. Produciendo una sustancia electroquímicamente activa a través del metabolismo o fermentación. Esta sustancia formada es bombeada al ánodo de una celda de combustible convencional, para producir energía eléctrica.
2. El proceso de fermentación microbológica se realiza directamente en el compartimiento anódico de la CC.
3. A través de mediadores de transferencia, que aceptan electrones de la cadena de transporte biológico de electrones de los microorganismos y los suministran al ánodo de la CC biológica.
4. Utilizando los citocromos de la membrana externa de bacterias reductoras de metales, que pueden comunicarse directa y eléctricamente con la superficie del electrodo, creando una CC biológica sin mediadores.

Considerando lo anteriormente expuesto se puede decir que hay dos tipos básicos de CC biológicas: las celdas de combustible microbianas (CCM) y las celdas combustibles enzimáticas. Un problema con la mayoría de las enzimas redox es que no participan en la transferencia directa de electrones con soportes conductores. Por lo tanto, los mediadores de electrones se utilizan para la conexión eléctrica del biocatalizador y el electrodo. ⁽¹⁴⁾

3.4 Celdas de Combustible Microbianas (CCM)

Una CCM es un dispositivo que convierte la energía química de un sustrato biodegradable directamente a electricidad. Esto se consigue cuando las bacterias, a través de su metabolismo, transfieren electrones desde un donador, a un aceptor de electrones. ⁽²⁵⁾

En este tipo de celdas las bacterias no transfieren directamente los electrones producidos a su aceptor terminal, sino que estos son desviados hacia el ánodo (ver figura N°2). Esta transferencia puede ocurrir ya sea a través de la membrana celular o a partir de un mediador soluble, y los electrones fluyen a través de un circuito externo. Por lo que los electrones generados en la reacción son convertidos directamente en energía eléctrica y el carbono orgánico es transformado a CO_2 . El ciclo se cierra cuando los protones migran hacia el cátodo en aerobiosis donde se combinan con el oxígeno y se forma agua. ⁽⁷⁾

Las CCM tienen ventajas sobre otras tecnologías usadas para la generación de energía a partir de materia orgánica porque:

- Operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a muy bajas temperaturas.
- Producen menor cantidad de CO_2 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.
- Tienen aplicación potencial en lugares alejados con ausencia de infraestructura eléctrica, convirtiéndose en una opción más de energía renovable para los requerimientos de energía a nivel mundial ⁽¹⁾.

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 microorganismos provenientes de diferentes fuentes como por ejemplo las aguas residuales domésticas e industriales. ⁽²⁵⁾

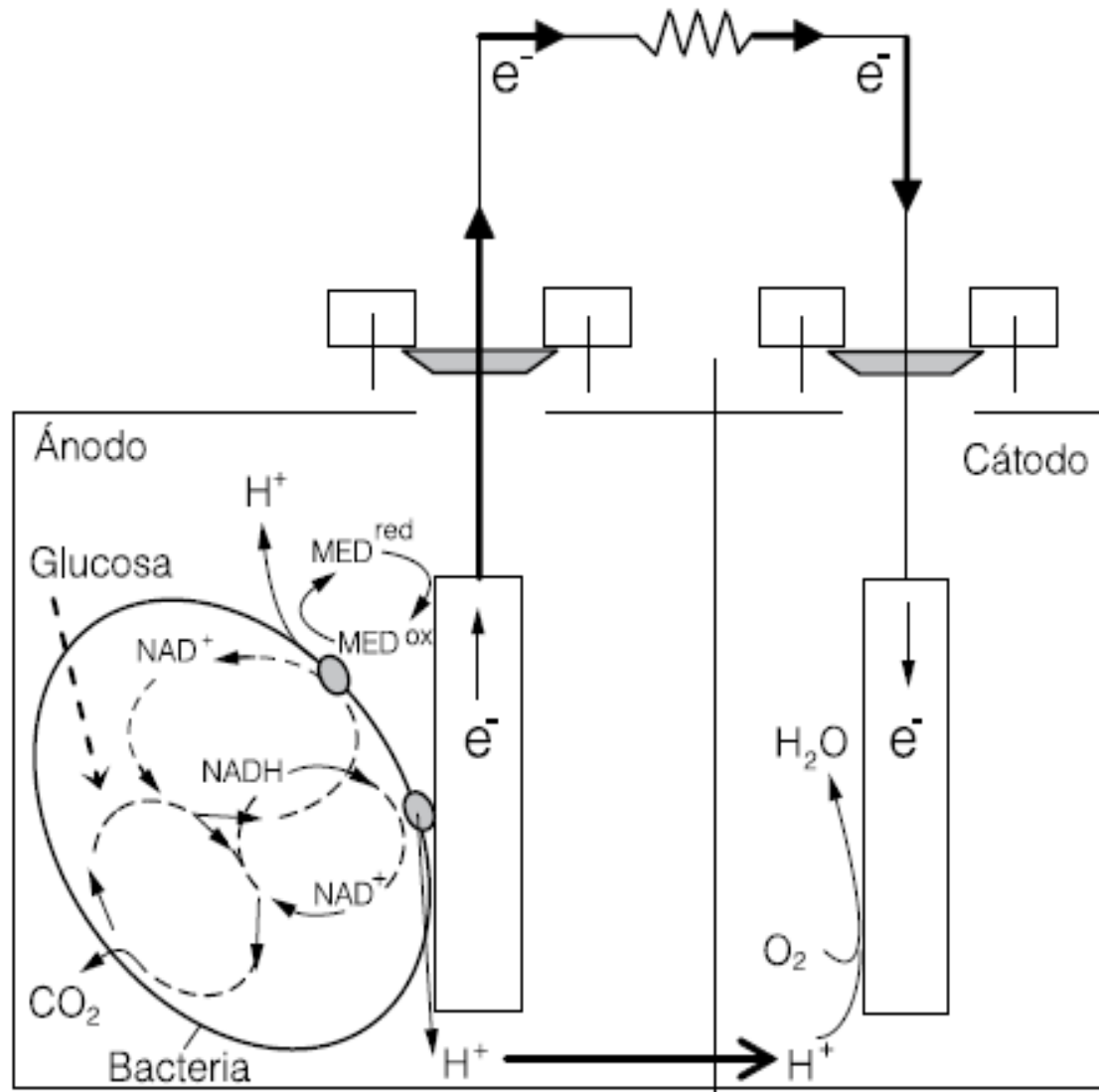


Figura N°2: Funcionamiento de una celda de combustible microbiana ⁽¹⁾.

3.5 Arquitectura de una celda de combustible

La estructura básica de una CCM para la producción de electricidad se puede observar en la Fig. N°3; consta de dos cámaras una catódica y una anódica, separadas por una membrana de intercambio de protones (MIP). ⁽⁷⁾⁽²⁵⁾

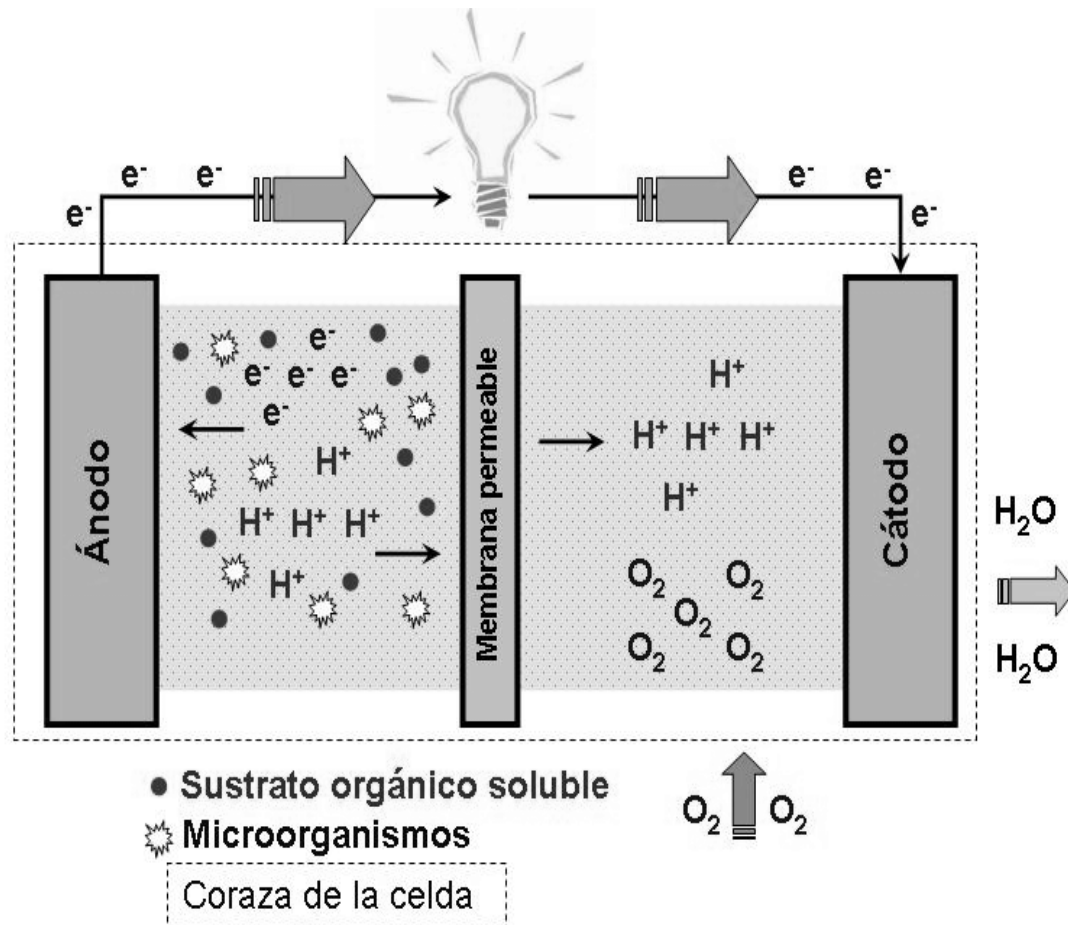


Figura N°3: Arquitectura de una celda de combustible microbiana. (7)

3.5.1 Ánodo

Los materiales con los que se deben construir el ánodo deben ser conductivos, biocompatibles y químicamente estables en la solución del reactor. Ánodos metálicos consistentes de malla de acero inoxidable no corrosivo pueden ser utilizados. El material de electrodo más versátil es el carbón, disponible como placas de grafito compacto, barras o gránulos. Mayores áreas superficiales pueden ser alcanzadas usando materiales compactos como carbón vítreo reticulado, el cual se encuentra disponible con diferentes tamaños de poro o usando capas de gránulos de carbón o esferas. (7) La cámara anaeróbica contiene

sustratos orgánicos que, al oxidarse por acción de los microorganismos, generan electrones, protones y dióxido de carbono. ⁽¹⁵⁾

3.5.2 **Cátodo**

Debido a su buen desempeño, el ferrocianuro es muy popular como un aceptor experimental de electrones en CCMs. La ventaja del ferrocianuro es el bajo potencial, y la desventaja de su empleo es la oxidación insuficiente por el oxígeno, el cual requiere un catalizador. El desempeño a largo plazo del sistema puede ser afectado por difusión del ferrocianuro a través de la MIP y en la cámara anódica. ⁽⁷⁾

El oxígeno es el aceptor más adecuado de electrones para una CCM debido a su alto potencial de oxidación, disponibilidad, bajo costo, sustentabilidad, y la carencia de residuos químicos. La elección del material del cátodo afecta de manera importante el desempeño, y su variedad de aplicaciones. Para incrementar la velocidad de reducción de oxígeno, los catalizadores de platino son usualmente usados para oxígeno disuelto o cátodos de difusión de gas. Para bajar el costo de la CCM, la cantidad de platino puede mantenerse a 0.1 mg/cm². ⁽⁷⁾

3.5.3 **Membrana de intercambio de protones (MIP)**

La mayoría de los diseños de las CCMs requieren la separación de la cámara anódica y la cámara catódica por una membrana de intercambio de protones. Una MIP no es más que un material selectivo el cual permite el paso únicamente de iones con carga positivas (cationes). La MIP más comúnmente utilizada es Nafion®, que es un copolímero de tetrafluoroetileno (Teflon®) y perfluoro-3,6-dioxa-4-metil-7-octeno-sulfónico, el cual tiene la ventaja de ser altamente resistente al ataque químico, aunque existen otras opciones como Ultrex CMI-7000 que también son adecuadas para una CCM. ⁽⁷⁾

3.5.4 Condiciones de operación de una CCM

El interés en las CCM se deriva de su capacidad para operar bajo condiciones de reacción suaves (a temperatura y presión ambiente) y típicamente emplean electrolito neutro y pueden usar catalizadores económicos (por ejemplo, microorganismos).⁽¹⁴⁾

El rendimiento de una CCM a escala de laboratorio es mucho menor que el desempeño ideal que se necesita de estos sistemas. Según Falcon et al. en el 2009⁽⁷⁾, esto es porque el sistema se ve alterado por diferentes factores como:

- Tipo de microorganismos usados.
- Concentración de Biomasa
- Fuerza iónica
- pH
- temperatura
- parámetros del biorreactor.

3.5.4.1 Tipo de microorganismos

El factor más importante para que una CCM genere una corriente de electrones que pueda ser utilizada es, sin duda alguna, el microorganismo o microorganismos utilizados para llevar a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica a compuestos como CO_2 y H_2O y la liberación de electrones al sistema. Otro factor es la concentración del inóculo, se pueden emplear diferentes tipos de concentraciones en estos dispositivos⁽⁷⁾.

El comportamiento de los microorganismos en una CCM puede implicar varios procesos complejos. Las especies y cómo colonizan el ánodo tendrá una gran

influencia tanto en el tratamiento de los desechos como en la generación de energía. Además de los microorganismos que pueden transferir electrones al ánodo, la presencia de otros organismos puede influir en el rendimiento de la CCM, tanto positiva como negativamente. Las especies mixtas pueden provocar una eliminación más rápida del sustrato de alimentación sin generación de energía. ⁽¹⁴⁾

Cuanto mayor sea la diferencia de potencial entre el donador y el aceptor, mayor será la ganancia energética para la bacteria y mejor será la transferencia de electrones al ánodo (aceptor), sin embargo, si el potencial del ánodo disminuye los electrones probablemente se depositarán sobre aceptores de electrones alternativos (sulfato, nitrato, entre otros). ⁽¹²⁾

3.5.4.2 pH y Fuerza iónica

Es necesaria una solución amortiguadora en una CCM, para que no exista una diferencia de pH entre la cámara anódica y la cámara catódica, aunque teóricamente no habría tal cambio cuando la velocidad de reacción de protones, electrones y oxígeno en el cátodo es igual a la velocidad de producción de protones en el ánodo. Sin embargo, la membrana de intercambio de protones causa una barrera en el transporte a través de la membrana de difusión de protones, y dicho transporte es más lento que la velocidad de producción en el ánodo y la velocidad de consumo en la cámara catódica, esto genera una diferencia de pH en la etapa inicial de una CCM. Se ha detectado que con la adición de un amortiguador de fosfatos (pH 7), el cambio de pH en el ánodo y cátodo fue menor de 0.5 unidades y la salida de corriente se incrementó alrededor de 1 a 2 veces. ⁽¹⁰⁾

3.6 Microorganismos en una CCM

Como inóculo para las CCMs se pueden emplear cultivos de una especie microbiana o cultivos mixtos (consorcios). En el primer caso, existe la posibilidad

de modificar genéticamente la especie microbiana e interpretar más fácilmente los estudios con respecto a genómica y proteómica. Las bacterias más comunes usadas en el ánodo pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter* y *Pseudomonas*, se destacan las especies *S. putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*. Entre los microorganismos que pueden transferir electrones a la superficie del cátodo de manera directa o mediada, sobresalen especies como *G. sulfurreducens* y *S. putrefaciens*, la mayoría de las bacterias en biocátodos son Gram-negativas, pero algunas Gram-positivas tales como *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus carnosus*, también hacen una transferencia directa de electrones, otras como *Acinetobacter calcoaceticus* que excreta compuestos activos redox para transferir electrones al oxígeno. ⁽¹⁸⁾

3.6.1 Microorganismos a utilizar

3.6.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria en forma de bacilos Gram negativos móviles que mide casi 0.6 x2 µm. Muestra una disposición de bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas, es aerobia obligada que puede producir pigmentos hidrosolubles. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos y en los hospitales. Puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito y causa enfermedades en personas inmunosuprimidas. ⁽¹³⁾

P. aeruginosa crece fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, produciendo en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz. Algunas cepas producen hemólisis y forma colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente. Además, suele producir el pigmento azulado no fluorescente piocianina, que se difunde hacia el agar. No todas las especies del género *Pseudomonas* producen piocianina, muchas también producen el

pigmento fluorescente pioverdina, que le confiere un color verdoso al agar, y algunas producen el pigmento rojo oscuro piorrubinao y el pigmento negro piomelanina. ⁽²¹⁾

La *Pseudomonas aeruginosa* se multiplica bien a una temperatura de 37 a 42°C; su crecimiento a 42°C ayuda a distinguirla de otras especies de pseudomonas en el grupo fluorescente. Es oxidasa positiva. No fermenta carbohidratos, pero muchas cepas oxidan glucosa. La identificación suele basarse en la morfología de la colonia, la positividad para oxidasa, la presencia de pigmentos característicos y su multiplicación a una temperatura de 42°C. ⁽²¹⁾

Ha sido relacionada con la capacidad para desarrollar biopelículas; debido a su matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pili, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos. Los componentes de los EPS involucrados en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* están codificados principalmente por diversos genes que se encuentran localizados en tres operones independientes: *algU*, *psl* y *pel*. ⁽²¹⁾

3.6.1.2 *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram positiva, produce endosporas que son termo-resistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos; produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos y ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina; fermenta la caseína y el almidón ⁽²⁹⁾. Una característica es la apariencia de las colonias, de forma irregular, color crema, los bordes aserrados, lobulados, digitiforme y ondulada; las elevaciones de las colonias suelen ser planas o acuminadas, presentan el centro más elevado en forma de anillo, la consistencia

suele ser seca, pero también se presentan colonias cremosas y ligosas. En cuanto a su microscopia se observa en bastones con un diámetro <0.9 micras. ⁽⁶⁾

B. subtilis, es una bacteria no patógena, se ha convertido en un organismo modelo alternativo para estudiar las bases moleculares de la formación de biopelículas. El proceso comienza con la expresión de los genes de la matriz en respuesta a alguna señal externa. Inicialmente, las células son varillas cortas y móviles, pero a medida que se desarrolla la biopelícula, forman largas cadenas de células no móviles que se adhieren unas a otras y a la superficie al secretar una matriz extracelular. Esta sustancia es esencial para la integridad de la biopelícula, ya que mantiene unida a la comunidad. El exopolisacárido requerido para la biopelícula es sintetizado por el operón *epsA-epsO* 13, 32, 33. ^{(6),(28)}

3.7 Bioánodo

El material y el área del electrodo también influyen en el rendimiento de las CCMs ya que los microorganismos usados tienen la capacidad de ceder electrones a materiales rocosos. Para la aplicación práctica de una CCM, los materiales del ánodo ideales requieren alta conductividad eléctrica, biocompatibilidad, altas estabildades químicas y físicas y de bajo costo. Para enfrentar este desafío, se han utilizado diversos materiales, como carbono y metal para mejorar el desempeño del ánodo. ^{(14),(18)}

3.7.1 Materiales para la construcción del bioánodo

3.7.1.1 Materiales de carbono

El material de carbono con diferentes configuraciones (planar, empacado o cepillado) debido a su estabilidad química frente al inóculo microbiano, alta conductividad, alta superficie específica, buena biocompatibilidad y costo relativamente

bajo se ha utilizado con frecuencia como material anódico en CCMs. Los materiales tradicionales utilizados para CCM incluyen papel carbón, malla, fieltro, espuma de tela, barra de grafito, gránulos, hojas, cepillo y el vítreo reticulado. Las características conductivas del grafito lo hacen un material ideal para aprovechar las cargas obtenidas del proceso de metabolización de la materia orgánica que hacen las bacterias. ^{(14),(18)}

3.7.1.2 Materiales metálicos

Varios metales se han utilizado como ánodo en CCMs debido a su mayor conductividad sobre los materiales de carbono. El requisito de ser no corrosivo, limita la elección de los materiales metálicos utilizados para una CCM. El cobre se investigó como ánodo para una CCM, los resultados mostraron que es un material inapropiado debido a su alta corrosión y toxicidad para los microorganismos, incluso si inicialmente mostró una generación de corriente alta comparable a la del electrodo de carbono. El acero inoxidable y el titanio son metales comunes propuestos como materiales potenciales de ánodo. Varios estudios investigaron el acero inoxidable como el ánodo en una CCM, debido a las mejores propiedades mecánicas esperadas para la operación a largo plazo y las aplicaciones para el escalamiento de un CCM. ⁽¹⁴⁾

El acero inoxidable puede ser un material potencialmente competitivo para formar bioanodos con consorcios microbianos naturales utilizando procedimientos de inoculación apropiados combinados. Se sugirió titanio como ánodo y se usó especialmente en CCM como colector de corriente. Se han comparado el titanio, el titanio revestido con platino y el grafito en términos de su idoneidad como un ánodo para una CCM, y los resultados mostraron que no se observó corriente para el titanio sin recubrimiento. ⁽¹⁴⁾

3.8 Biopelícula

Una biopelícula es una asociación compleja de microorganismos, constituida por una o varias especies, unidos a una superficie y embebidos en una matriz extracelular (MEC), en las cuales despliegan fenotipos únicos o característicos de adaptación especiales, comparados con la forma de vida libre de estos microorganismos, también conocida como planctónica. ⁽¹²⁾

En el interior de una biopelícula las bacterias forman una comunidad funcional coordinada. De hecho, las biopelículas se asemejarían a los tejidos formados por células eucariotas en su cooperatividad, y en que están protegidas de las variaciones bruscas de las condiciones ambientales mediante el mantenimiento de una "homeostasis primitiva" dentro de la MEC. Esta matriz retiene la humedad y los nutrientes, y permite la formación de microambientes. ⁽¹²⁾

La formación de una biopelícula es dirigida por un conjunto de respuestas moduladas por mecanismos de comunicación intercelular a través de sistemas específicos, entre los que se encuentra el *quorum sensing* (QS), que les permite sobrevivir aún en ambientes extremadamente adversos para el desarrollo de su vida planctónica. ⁽¹²⁾

3.8.1 Mecanismos de comunicación intercelular

Los organismos superiores tienen sistemas de comunicación intercelular que abarcan desde el cigoto y su desarrollo hasta la formación de los tejidos y el desarrollo de cada una de sus funciones. Hasta hace muy pocos años se pensaba que en las bacterias no existían estos mecanismos de comunicación intercelular, y que únicamente eran capaces de desarrollar mecanismos sencillos que les permitieran detectar cambios en la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, pH, cambios de presión o nivel de oxígeno. ⁽¹³⁾

Recientemente se ha constatado la existencia de otros mecanismos de cooperatividad entre microorganismos, tales como la formación de biopelículas. Esto permite suponer que algunas bacterias pueden desarrollar un comportamiento “multicelular” que les suponga una ventaja selectiva frente a las que no poseen estos mecanismos. ⁽¹²⁾

Los microorganismos tienen por tanto un comportamiento multicelular cuando reúnen tres condiciones:

- Ser capaces de generar una señal de comunicación.
- Que sea percibida por el resto de la población.
- Que la población reaccione mediante una acción concertada cuando dicha población alcanza una concentración determinada denominada *Quórum*. ⁽¹²⁾

3.8.2 Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS) o percepción de quórum es definido como: el mecanismo bacteriano de comunicación intercelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular. ⁽¹⁷⁾ Se han descrito numerosos procesos fisiológicos regulados por *Quórum Sensing*, tales como:

- Bioluminiscencia.
- Maduración de biopelículas.
- Pigmentación.
- Producción de algunos metabolitos secundarios.
- Inducción del proceso de esporulación.
- Producción de exopolisacáridos.
- Producción de factores de virulencia por microorganismos patógenos en humanos, animales y vegetales, entre otros. ⁽¹⁷⁾

El sistema QS comprende el proceso de comunicación bacteriana que utiliza pequeñas moléculas señalizadoras denominadas autoinductores que coordina la expresión de genes necesarios para la formación de la biopelícula y otros procesos fisiológicos al detectar una determinada densidad celular. ⁽¹⁷⁾

El fenómeno se basa en que las bacterias excretan al medio, moléculas señalizadoras (autoinductores), al alcanzar una densidad poblacional específica y estas son reconocidas por los mismos o incluso otros microorganismos. Esta forma de comunicación no corresponde a un único lenguaje, ya que existen diversas clases de moléculas señal, y el mensaje emitido por una bacteria puede ser o no captado por otra, dependiendo de si esta última dispone o no del mecanismo de reconocimiento adecuado. ⁽¹⁷⁾

Este mecanismo, asegura que un número suficiente de bacterias se organicen regulando una acción que le permita a la especie actuar como un organismo multicelular, con el fin de producir y detectar señales moleculares que favorezcan la expresión de factores génicos y la sincronización de grupos microbianos, en respuesta a una densidad poblacional, es decir, una vez alcanzado un número adecuado de bacterias (Quorum) en un hábitat o nicho en particular, y así puedan expresar ciertos factores que favorezcan el inicio de distintos procesos fisiológicos. ⁽¹²⁾

3.8.3 Formación de una Biopelícula

Primera fase: adhesión reversible a la superficie

Los microorganismos normalmente se perciben como seres solitarios que flotan libremente, es decir, en estado planctónico. Sin embargo, en condiciones naturales, la mayoría de los microorganismos tiende a adherirse a superficies y finalmente conforman las biopelículas. La adhesión inicial es reversible. ⁽²³⁾

Segunda fase: adhesión irreversible a la superficie

A medida que las bacterias se multiplican, se adhieren más firmemente (sésiles) y se diferencian, cambiando los patrones de expresión génica en formas que promueven la supervivencia. Esto suele ser el resultado de un tipo de comunicación bacteriana conocida como percepción de quórum (autoinducción). ⁽²³⁾

Tercera fase: biopelícula/matriz protectora viscosa

Una vez bien adheridas, las bacterias comienzan a segregar una matriz circundante conocida como matriz extracelular (MEC). Se trata de una matriz protectora o “limo”. A partir de ahí, las pequeñas colonias bacterianas empiezan a formar una biopelícula inicial. ⁽²³⁾

3.8.4 Estudio de una biopelícula

Para analizar las biopelículas existen en general dos tipos de métodos: los cualitativos y los cuantitativos. Los primeros utilizan frecuentemente una tinción de las biopelículas en un tubo de cultivo o una placa de microtitulación, lo cual solo demuestra la presencia o ausencia de la misma, pero no la relación entre su presencia y la capacidad del microorganismo de producirla. ⁽⁹⁾

Entre los métodos cuantitativos se encuentra la determinación de la densidad óptica. Esta propiedad varía de acuerdo a las características intrínsecas de la biopelícula, lo que permite cuantificar su producción, aporta información sobre la estructura de ésta en relación al tipo de microorganismo que la sintetiza, es aplicable a cualquier microorganismo y reproducible en cualquier tipo de circunstancia. ⁽⁹⁾

3.9 Mecanismos de transferencia de electrones en biopelículas

A pesar de que muchas bacterias capaces de donar electrones a un ánodo han sido descritas, para la mayoría de éstas permanece desconocido cómo transportan electrones fuera de sus células hacia un aceptor de electrones extracelular. Solo para los electrógenos modelo *G. sulfurreducens* y *S. oneidensis* se han estudiado intensamente los mecanismos de transferencia extracelular de electrones. Ambas especies se conocían como reductoras de Fe (III), antes de mostrar su capacidad electrogénica. El estudio de sus mecanismos para donar electrones a un ánodo benefició la información genómica y las herramientas de ingeniería genética, que han estado disponibles para ambas bacterias en la última década, lo que facilitó en gran medida el estudio de sus mecanismos de transferencia de electrones ⁽¹⁵⁾. Los mecanismos de transferencia de electrones aceptados y debatidos en las especies mencionadas son: el mecanismo de transferencia de electrones directos y mediados por transportadores. ^{(14), (25)}

3.9.1 Transferencia directa de electrones

Las bacterias capaces de donar electrones directamente a un electrodo utilizan principalmente citocromos de tipo C para transferir electrones de sus células hacia un aceptor de electrones en estado sólido. Los citocromos de tipo C son proteínas redox que contienen uno o más grupos hemo, que regulan el transporte de electrones respiratorios en muchos organismos; los utilizados para la transferencia extracelular de electrones microbiana suelen ser proteínas múltiples ubicadas en las membranas bacterianas. La especie *G. sulfurreducens*, por ejemplo, tiene más de 100 citocromos de tipo C codificados en su genoma y muchos de estos se encuentran en la membrana externa; y probablemente transfiera electrones desde su membrana interna a la superficie externa de la célula mediante una serie de citocromos de membrana periplásmica y externa,

pero hasta ahora, la configuración exacta de esta cadena de transporte de electrones permanece desconocida. ⁽¹⁴⁾

Se dispone de más información sobre los citocromos que forman el paso terminal de esta cadena e interactúan directamente con los aceptores de electrones de estado sólido. Para la reducción de Fe (III), se descubrió que el citocromo OmcS es esencial, mientras que el citocromo más importante para la transferencia de electrones al ánodo es OmcZ. Los mutantes sin este último citocromo son incapaces de producir corriente y también se ha demostrado que la OmcZ se acumula en la interfaz de la biopelícula y el ánodo. ⁽¹⁴⁾

3.9.2 Transferencia de electrones mediada por transportadores

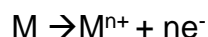
El transporte de electrones de microorganismos a un ánodo también puede estar mediado por transportadores de electrones. Un transportador de electrones normalmente es un compuesto orgánico que puede reducirse de forma reversible. Los compuestos inorgánicos, como las especies de hidrógeno y azufre, también pueden actuar como mediadores de electrones. Los transportadores de electrones pueden ser compuestos que se agregan al sistema de forma artificial para mediar la transferencia extracelular de electrones de bacterias no electrogénicas a un ánodo, como, por ejemplo: azul de metileno, viológeno de metilo, 2,6-disulfonato de antraquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y resazurina; mientras que algunas bacterias establecen la transferencia extracelular mediante moléculas de transferencia de electrones auto-secretadas. Por ejemplo, la transferencia puede ser mediada por flavinas. La biosíntesis de flavinas es un proceso metabólico central en el que este grupo de moléculas se producen en forma de FAD (flavinadenin dinucleótido) y FMN (flavinmononucleotido), que son cofactores esenciales en muchos otros procesos celulares. ⁽¹⁴⁾

Los mediadores artificiales, sin embargo, pueden tener efectos tóxicos, que deben ser comprendidos antes de que puedan ser utilizados. Para azul de metileno, por ejemplo, se encontró una concentración inhibitoria mínima entre 18 y 37 mg/ L para organismos no electrogénicos seleccionados. ⁽¹⁴⁾

3.10 Principios electroquímicos y caracterización del ánodo

Se puede formar una celda electroquímica colocando dos materiales conductores (electrodos) en una solución de electrolito y conectándolos electrónicamente. La solución electrolito es un líquido iónicamente conductor que contiene típicamente una proporción de sal o de ácido disociado. Dentro de la celda, dos conjuntos de reacciones tienen lugar en los electrodos, que están vinculados por el flujo de corriente. Esta corriente fluye en la forma de electrones en los electrodos y como iones en el electrolito, que separa los electrodos. ^{(14),(18)}

En el proceso anódico, se retiran los electrones de la celda y, por lo tanto, ocurre una oxidación



La reacción del cátodo suministra electrones a la celda y, por lo tanto, ocurre una reducción.



El movimiento de los iones es por lo tanto responsable de la transferencia de carga en solución de un electrodo al otro. En la práctica, la carga será transportada por ambos iones, cationes (cargados positivamente) y aniones (cargados negativamente). ⁽¹⁴⁾ Los electrodos de una CCM pueden ser monitoreados a través de parámetros electroquímicos tales como densidad de potencia, corriente eléctrica generada y voltaje. ⁽¹⁾

Existen diferentes métodos para la caracterización electroquímica del electrodo entre ellas están:

1. Métodos voltamétricos
2. Espectroscopia de impedancia electroquímica
3. Cronoamperometria

3.10.1 Métodos voltamétricos para la caracterización del ánodo.

La voltametría es una de las técnicas más importantes utilizadas para investigar los mecanismos de reacción electroquímicos. Existen numerosas formas de voltametría dentro de las cuales la medición de voltaje con un multímetro es la más común, pero existen otros métodos como: paso potencial, voltametría cíclica, voltametría de barrido lineal, voltametría de onda cuadrada, voltametría de pulso diferencial. Para cada uno de estos últimos casos, se aplica una tensión o serie de voltajes al electrodo y se mide la corriente correspondiente que fluye. ^{(14),(18)}

3.10.1.1 Voltametría en presencia de sustratos donadores

En un electrodo de CCM, las primeras células que se unen al electrodo crean algo similar a una matriz de microelectrodos individuales. Al permitir el crecimiento celular, crean capas de células más gruesas e introduce factores como la heterogeneidad de la película, las interacciones célula-célula y la difusión a través de biopelículas. Existe evidencia de que las primeras capas adicionales de células no limitan significativamente la transferencia de electrones de célula a célula al electrodo; es decir, el microorganismo continúa el crecimiento exponencialmente cerca de su tasa de crecimiento máxima mucho más allá de esta fase monocapa, lo cual se verifica al obtener una respuesta electroquímica de voltaje constante. Por lo tanto, un experimento de voltametría típico puede

usar una película delgada de bacterias. Normalmente, en experimentos, la cantidad sustrato se proporciona en exceso. A medida que el voltaje aumenta por encima de un umbral (alrededor de 0.2 V), la corriente positiva indica la oxidación continua del sustrato y la transferencia de electrones al ánodo. Por lo tanto, si la película microbiana no está limitada por el suministro de un donador de electrones, entonces factores tales como la oxidación interna o las tasas de transferencia de electrones de células y electrodos probablemente sean las influencias dominantes de control. Para profundizar en el entendimiento de estos factores de control puede utilizarse voltametría cíclica. ⁽¹⁴⁾

3.11 Comportamiento microbiano del ánodo

Una CCM depende de la generación de electrones por parte de la cadena de transporte de electrones del microorganismo. Esta cadena involucra la pared celular, donde existen proteínas responsables de la generación de energía. En el caso de la respiración aeróbica, la reacción central es la oxidación de un compuesto rico en energía, para permitir la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a NADH por los electrones donados de la glucosa. A su vez, NADH se oxida y sus electrones se transfieren a trifosfato de adenosina (ATP).

⁽¹⁴⁾

En la respiración anaeróbica, la acetil-CoA funciona como el aceptor de electrones y luego es procesada por el ciclo del ácido cítrico para generar ATP. Las CCMs toman electrones antes que el ATP los acepte. Debido a que las especies reductoras generadas por procesos metabólicos dentro de las células microbianas son aisladas por una membrana, el contacto de las células microbianas con un electrodo generalmente resulta en una pequeña cantidad de transferencia de electrones, excepto en ciertos casos especiales, donde es posible la transferencia directa de electrones a la superficie del ánodo. Los grupos

electroactivos responsables de la actividad redox de las enzimas presentes en las células microbianas están profundamente enterrados dentro de sus grupos prostéticos, lo que generalmente conduce a una mala comunicación eléctrica entre las células y la superficie del electrodo. ⁽¹⁴⁾

3.12 Aplicaciones de una celda de combustible microbiana

Las CCM se encuentran en una etapa de investigación y desarrollo. Sin embargo, los esfuerzos que han realizado diferentes grupos de investigación a nivel mundial, han logrado avances significativos en el desarrollo de las CCM y encontraron usos alternativos para esta tecnología que ya pueden aplicarse para solucionar problemas de gran importancia a nivel mundial. ⁽⁷⁾

Algunas importantes aplicaciones que se han descrito son:

- Los biosensores para medir la Demanda Biológica de Oxígeno, y monitorear compuestos tóxicos;
- El tratamiento de aguas residuales a pequeña escala para la eliminación de proteínas y otro tipo de compuestos químicos;
- Biorremediación de suelos y aguas subterráneas, siendo capaz de actuar sobre uranio (VI) in situ, reducción de cromo (VI), eliminación de cloro, reducción de perclorato y principalmente reducción de nitrato;
- La producción de hidrógeno por medio del proceso de electrólisis, esta modificación se puede realizar mediante la remoción del oxígeno de la cámara catódica y añadiendo un pequeño voltaje. ⁽²⁵⁾

3.12.1 Tratamiento de aguas residuales

Las aguas residuales provenientes de la industria, la agricultura y de las casas contienen materia orgánica disuelta que requiere ser removida antes de ser

descargada al medio ambiente. Actualmente existen procesos para remover los contaminantes orgánicos presentes en esta agua de deshecho, pero la mayoría son tratamientos aeróbicos, los cuales consumen grandes cantidades de energía para brindar la aireación necesaria. Sin embargo, el tratamiento de aguas residuales ha comenzado a ser reconocido como una fuente renovable para la producción de electricidad, que, si bien no es generada en grandes cantidades, puede emplearse para el mismo proceso de tratamiento de efluentes. ⁽⁷⁾

El tratamiento bioelectroquímico está basado en el uso de microorganismos electroactivos. Estos microorganismos son capaces de transferir electrones a un electrodo mientras oxidan la materia orgánica presente en las aguas residuales. Este proceso puede ser modificado por una conexión eléctrica del ánodo a un electrodo auxiliar (cátodo) que desempeñará una reacción de reducción. Como resultado de esta conexión eléctrica entre el ánodo y el cátodo, y de las reacciones que ocurren, los electrones pueden fluir del ánodo al cátodo produciendo así una corriente eléctrica. ⁽⁷⁾

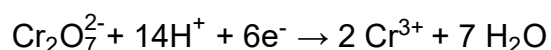
Diferentes grupos de investigación ya han demostrado que es posible obtener electricidad en una CCM a partir de aguas residuales domésticas, acompañando el proceso de una remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), llegando a obtener hasta un 96% de reducción de la DQO inicial y generar voltajes del orden de 200 a 400 mV. Cabe destacar que este sistema ha sido aplicado también en el tratamiento de aguas de diversos orígenes y no solo para el tratamiento de aguas residuales. ⁽⁵⁾

3.12.2 Demanda Química de Oxígeno

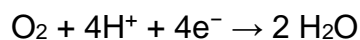
La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida de la cantidad de oxígeno requerida para oxidar químicamente la fracción orgánica disuelta o en suspensión

de una muestra. Por lo que este parámetro es representativo de la contaminación orgánica de un agua. Se expresa en miligramos de DQO por litro. Se define como la cantidad de O_2 químicamente equivalente al $Cr_2O_7^{2-}$ consumido en este proceso. ⁽¹⁰⁾ Dicha equivalencia queda establecida a partir de las reacciones de reducción-oxidación correspondientes en medio ácido:

Semireaccion para el dicromato:



Semireaccion para el oxígeno:



Como se puede observar, cada ion $Cr_2O_7^{2-}$ consume 6 electrones al reducirse, mientras que cada molécula de oxígeno consume 4 electrones. Por consiguiente, el consumo de 1 mol de $Cr_2O_7^{2-}$ en la oxidación es equivalente al consumo de 1.6 moles de O_2 . El método empleado se basa en la reacción de una muestra de agua contaminada (por ejemplo, un supuesto vertido industrial) con un oxidante energético, como es el dicromato de potasio, en medio ácido con iones plata como catalizador y la posterior determinación de la cantidad de dicromato consumida en este proceso. Los compuestos orgánicos oxidables actúan reduciendo el dicromato, (Cr VI), a ion crómico (Cr III). La cantidad de dicromato consumido proporciona una medida de la concentración de contaminantes en el agua. ⁽¹⁰⁾

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

- **Experimental:**

Se cuantificó la capacidad de producción de biopelículas utilizando un método de medición de la densidad óptica por espectrofotometría ultravioleta. Además, se construyeron electrodos recubiertos con la biopelícula de cada especie, y se midió del voltaje generado en ellos.

- **Exploratorio:**

Debido a la escasa investigación de esta tecnología en El Salvador, se realizó el estudio con el fin de proporcionar información fundamental sobre comportamiento de los microorganismos en el electrodo durante su construcción y los tipos de medición eléctrica aplicable.

4.2 Investigación Bibliográfica

La búsqueda bibliográfica constituyó la base esencial para desarrollar la investigación, creando una base de datos con información de investigaciones sobre el tema en estudio. Esta investigación se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas:

- “Doctor Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- CBUES: Consorcio de Bibliotecas Universitarias de EL Salvador
- Internet.

4.3 Parte experimental

4.3.1 Identificación del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*. ^{(16), (29)} (Ver anexo N°1)

1. Tomar una asada del criovial de *Pseudomonas aeruginosa*, sembrar en caldo caseína y soya (CASOY) e incubar a temperatura de 35°C por 24 horas.
2. Tomar una asada del caldo CASOY y sembrar mediante el método de estrías en agar cetrimide y TSA (agar tripticasa soya) e incubar a temperatura de 35°C por 24 horas.
3. Observar las placas, si hay crecimiento en agar cetrimide indica la posible presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Verificar que la morfología macroscópica coincida con: colonias redondas, lisas, de bordes regulares, producción de pigmento verde (pioverdina).
5. Realizar la tinción de Gram a las colonias que han crecido en TSA y observar al microscopio, la morfología microscópica debe coincidir con bacilos alargados Gram negativos.
6. Realizar las pruebas de oxidasa, cultivo en agar cetrimide y TSI (triple azúcar hierro) para comprobar la identidad de este microorganismo.

4.3.2 Identificación del microorganismo *Bacillus subtilis*. ^{(16), (29)} (Ver anexo N°2)

1. Tomar una asada del crio-vial de *Bacillus subtilis*, sembrar en caldo CASOY e incubar a temperatura de 35°C por 24 horas.
2. Sembrar mediante el método de estrías en TSA e incubar a temperatura de 35°C por 24 horas
3. Verificar que la morfología macroscópica coincida con: colonias de forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias puede ser entre aserrada y lobulada.

4. Realizar la tinción de esporas y observar al microscopio. La presencia de esporas es característico de *Bacillus subtilis*.
5. Realizar la tinción de Gram y observar al microscopio. La morfología microscópica debe coincidir con bacilos Gram positivos.
6. Realizar las pruebas bioquímicas Citrato, Voges Proskauer, degradación de almidón, tolerancia a NaCl 6.5% y catalasa para comprobar la identidad de este microorganismo.

4.3.3 Procedimiento para la estandarización de los microorganismos

Pseudomonas aeruginosa y *Bacillus subtilis*. ⁽²⁹⁾ **(Ver anexo N°3)**

Para cada microorganismo realizar el siguiente procedimiento:

1. Sembrar en un tubo de agar inclinado con medio TSA.
2. Incubar a temperatura de 35°C por 24 horas.
3. Resembrar cada cultivo en 3 tubos de agar inclinado.
4. Incubar los 3 tubos a 35°C por 24 horas.
5. Adicionar 2 mL de solución salina estéril a cada uno de los 3 tubos más 2 perlas de ebullición para arrastrar el cultivo de la superficie del bisel.
6. Transferir la suspensión del microorganismo de los 3 tubos a un tubo estéril.
7. Leer la transmitancia en un espectrofotómetro UV/vis a 580 nm, registrar el %T de la suspensión del microorganismo, la cual se espera sea menor de 60% para *Pseudomonas aeruginosa* y menor de 5% para *Bacillus subtilis*, llevando como blanco solución salina; esta solución será la “suspensión estandarizada”
8. Hacer tres diluciones seriadas 1:100 seguidas de dos diluciones seriadas 1:10, hasta llegar a la dilución 10⁻⁸.
9. Realizar el recuento en placa por el método de vertido en placa de la siguiente manera:
 - i. Inocular 1 mL de la dilución 10⁻⁷ en una placa de Petri y verter aproximadamente 20 mL de agar TSA. Realizar por duplicado.

- ii. Inocular 1 mL de la dilución 10^{-8} en una placa de Petri y verter aproximadamente 20 mL de agar TSA. Realizar por duplicado.
 - iii. Inocular 0.1 mL de la dilución 10^{-8} en una placa de Petri y verter aproximadamente 20 mL de agar TSA. Realizar por duplicado.
10. Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismos presentes en la suspensión estandarizada.
11. Repetir el experimento 2 veces más, de tal forma que se confirme que con la tramitancia obtenida se logra la concentración esperada de 10^8 UFC/mL.

4.3.4 Cuantificación de biopelículas producida por los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. (Ver anexo N°4) . ⁽⁹⁾

1. A partir de la suspensión estandarizada realizar diluciones seriadas hasta obtener una suspensión de 10^4 UFC/mL, utilizando tubos con medio TSB (Caldo Tripticasa Soya).
2. Colocar 200 μ L de la suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* 10^4 UFC/mL en tres pocillos (1, 2, y 3) de una microplaca de 96 pocillos, después colocar 200 μ L de medio TSB sin inóculo en tres pocillos (5, 6 y 7) como controles negativos y colocar en otros tres pocillos (9,10 y 11) 200 μ L de la suspensión de *Bacillus subtilis* 10^4 UFC/mL. Repetir el mismo procedimiento 8 veces en una misma placa a manera de maximizar el uso de la misma (se usan las filas de la A a la H).
3. Incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Eliminar el medio de cultivo volteando la placa sobre un recipiente para descarte apropiado y golpear cuidadosamente el reverso de la placa, luego realizar 3 lavados con 200 μ L de solución salina.
5. Agregar 150 μ L de metanol a cada pocillo y mantener durante 20 minutos. Finalizado el tiempo, proceder a su eliminación y lavado con solución salina.
6. Agregar 200 μ L de cristal violeta (al 0.5% en agua) y dejar reposar por 20 minutos

7. Proceder a eliminar el cristal violeta y realizar un lavado con solución salina, dejar secar los pocillos a temperatura ambiente.
8. Extraer la biopelícula teñida, mediante la adición de 150 μL de etanol absoluto a los pocillos, dejar reposar por 3 minutos.
9. Leer la densidad óptica (DO) de cada pocillo a una longitud de onda de 630 nm y registrar los datos.

4.3.5 Cuantificación de biopelículas

Se requiere establecer un punto de corte ⁽⁹⁾, por lo que se debe proceder de la siguiente forma:

1. Calcular la media de la densidad óptica (DO) de los controles de cada cepa bacteriana individualmente.
2. Establecer un punto de corte (DOc) que separe a las bacterias no formadoras de biopelículas de aquellas que sí son formadoras. El DOc se define como tres desviaciones estándar (SD) sobre la DO media de los controles:

$$\text{DOc} = \text{DO media de los controles} + (3 \times \text{SD de los controles})$$

3. Si algún valor obtenido de DO resultase negativo, se tomará como valor cero, mientras que cualquier valor positivo indicará la producción de biopelícula. Atendiendo a los resultados obtenidos, las bacterias se clasificarán con base en la tabla N°1:

Tabla N°1: Clasificación de la capacidad de producción de biopelícula según el resultado de densidad óptica.

RESULTADO	INTERPRETACIÓN
$\text{DO} \leq \text{DOc}$.	No formadores
$\text{DOc} < \text{DO} \leq 2\text{DOc}$.	Formadores débiles
$2\text{DOc} < \text{DO} \leq 4\text{DOc}$.	Formadores moderados
$4\text{DOc} < \text{DO}$.	Formadores fuertes

4.3.6 Construcción de los electrodos. (ver anexo N°5)

1. Cortar una barra de grafito de 5 mm de diámetro en fragmentos de 8 cm de longitud.
2. Perforar el centro de uno de los extremos de la barra de grafito.
3. Colocar alambre de cobre en el orificio.
4. Cubrir con resina epóxica de endurecimiento lento el extremo donde se ha colocado el alambre de cobre.
5. Colocar un tapón de hule horadado por donde pueda pasar el alambre de cobre
6. Dejar endurecer por todo un día. En este punto el electrodo estará listo para ser inoculado y tendrá un área superficial de 12.76 cm², el cual se calcula con la fórmula:

$$A = 2 \pi r h + 2 \pi r^2$$

Donde:

A: área

r: es el radio (diámetro /2)

h: es la altura

7. Este procedimiento se aplicó a 2 barras de grafito

4.3.7 Inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* sobre su respectivo electrodo y medición voltamétrica de los mismos. ⁽¹⁾ (Ver anexo N°6)

Para cada microorganismo realizar lo siguiente:

1. Agregar 0.2 mL de inóculo estandarizado 10⁸ UFC/mL en un tubo con 19.8 mL de TSB, se obtendrá un inóculo de 10⁶ UFC/mL. ⁽¹⁸⁾
2. Inocular 5.50 mL del inóculo de 10⁶ UFC/mL en un balón reactor de tres bocas que contenga 550 mL de TSB (se obtendrá una suspensión con 1% de inóculo estandarizado 10⁶UFC/mL)

3. Sumergir en el balón una de las barras de grafito construidas en el apartado anterior, utilizando un tapón de hule horadado.
4. Colocar un puente salino de 0.5 cm de diámetro (rellenado con una solución que contiene 3 g de agar-agar y 30 g de KCl)
5. Sellar la entrada del electrodo con papel Parafilm
6. Agregar 200 ml de ácido sulfúrico 1 M en un Erlenmeyer de 250 mL y colocar en este un segundo electrodo
7. Conectar los extremos de los electrodos a un multímetro
8. Inocular de la misma forma indicada en el paso (1) y (2) el 4° y 7° día.
9. Registrar los voltajes que se generan cada hora durante el tiempo que tome obtener un voltaje máximo constante. A este voltaje le llamaremos voltaje de adhesión.
10. Construir con los datos obtenidos un gráfico cinético voltaje vs tiempo individualmente para cada especie.

4.3.8 Evaluación de la eficiencia en remoción de residuos de los bioelectrodos.

1. Preparar agua residual sintética (ARS) (Ver anexo N° 7 literal L).
2. Determinar la demanda química de oxígeno al ARS (DQO inicial).
3. Agregar a un balón reactor de 3 bocas, 545 mL de ARS.
4. Sumergir en el balón, el electrodo inoculado en el apartado anterior, con ayuda de un tapón de hule horadado.
5. Colocar un puente salino de 0.5 cm de diámetro (rellenado con una solución que contiene 3 g de agar-agar y 30 g de KCl)
6. Sellar la entrada del electrodo con papel Parafilm.
7. Agregar 200 ml de ácido sulfúrico 1M a un Erlenmeyer de 250 mL.
8. Colocar un segundo electrodo en el Erlenmeyer.
9. Conectar los extremos de los electrodos a un multímetro.
10. Dejar la celda operando por un periodo de 5 días.

11. Medir el voltaje que se genera durante este periodo.
12. Determinar la demanda química de oxígeno al ARS tratada (DQO final).
13. Calcular la eficiencia en remoción de residuos (ERR) con la siguiente formula:

$$ERR = \frac{DQO \text{ inicial} - DQO \text{ final}}{DQO \text{ inicial}} \times 100\%$$

14. Construir una gráfica cinética voltaje vs tiempo, que muestre el desarrollo de este proceso.

4.3.9 Procedimiento para la determinación de la demanda química de oxígeno. ⁽²⁾

Para la determinación del DQO se utilizó un Kit marca Merck ®. El procedimiento descrito por el kit corresponde a DIN ISO 15705 y es análogo a EPA 410.4, APHA 5220 D y ASTM D1252-06B.

1. Precalear el termo reactor a 148°C.
2. Agitar por balanceo la cubeta de reacción para poner en suspensión el sedimento.
3. Transferir cuidadosamente 1,0 ml de muestra sobre el reactivo en la pared interna de la cubeta de reacción.
4. Cerrar firmemente la cubeta con tapa rosca.
5. Mezclar vigorosamente el contenido de la cubeta. (agarrar la cubeta solamente por la tapa roscada).
6. Calentar la cubeta durante 120 minutos a 148 °C en el termorreactor precalentado.
7. Sacar del termorreactor la cubeta caliente y colocarla en un soporte para tubos de ensayo para que se enfríe. Al cabo de 10 minutos agitar la cubeta por balanceo y volver a colocarla en el soporte para tubos de ensayo (tiempo de enfriamiento mínimo 30 minutos).
8. Medir en el fotómetro.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Resultados la verificación de la identidad de las cepas

5.1.1 *Bacillus subtilis*

El cultivo de *Bacillus subtilis* en TSA mostró colonias color crema, mate y bordes irregulares de apariencia rugosa (Fig. N°4). La tinción de Gram reveló bacilos delgados Gram positivos, mientras que la tinción de esporas evidenció la presencia de dicha estructura en la cepa. Dio positiva la prueba de citrato lo que indicó que la cepa fue capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consecuente producción de alcalinidad cambiando la coloración del medio de verde a azul debido a la presencia de un indicador de pH. La cepa demostró ser capaz de degradar el almidón ya que al ser cultivada en un medio enriquecido con almidón y agregarle Lugol a la placa después del periodo de incubación, se tiñó de azul excepto a las orillas del crecimiento bacteriano en donde se observaba halos claros dejando evidenciado por acción de las enzimas amilasas que es capaz de degradar el almidón⁽¹⁶⁾.

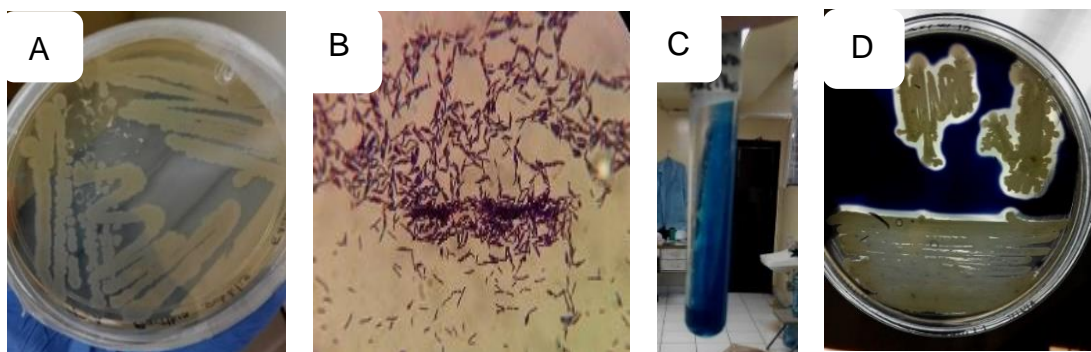


Figura N°4: Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de *Bacillus subtilis*. A: cultivo en TSA, B: tinción de Gram, C: prueba de citrato, D: degradación del almidón.

Además, en la prueba de catalasa, se observó burbujeo inmediato al entrar en contacto la cepa con el peróxido de hidrógeno, lo que significa que la cepa es capaz de producir una enzima conocida como catalasa. Para la prueba de Voges Proskauer se obtuvo un resultado positivo ya que al agregarle el alfa naftol y el hidróxido de potasio se observó una coloración roja. Esto se debe a que la cepa es capaz de metabolizar la glucosa en un compuesto final neutro, que es el acetil metil carbonil el cual se oxida por acción del alfa naftol y el hidróxido de potasio en diacetil que a la vez reacciona con la peptona del medio dando la coloración roja. ⁽¹⁶⁾ Por último, la cepa fue capaz de crecer en un medio con 6.5% de sal. Los resultados de estas pruebas se resumen en la tabla N°2.

Tabla N°2: Resumen de las pruebas para la verificación de la identidad de *Bacillus subtilis*.

Prueba	Resultado esperado	Resultado observado	Dictamen
Voges proskauer	Coloración roja	Coloración roja	La cepa cumple con las pruebas para <i>Bacillus subtilis</i>
Tolerancia al NaCl	Turbidez en el tubo	Turbidez en el tubo	
Tinción de esporas	Presenta endoesporas	Endoesporas presentes	
Catalasa	Catalasa positiva	Catalasa positiva	

Tomando en cuenta las pruebas de identificación anteriores y con base en lo descrito en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey ⁽⁴⁾, para esta cepa se puede confirmar su identidad como *Bacillus subtilis*.

5.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Por otro lado, el cultivo de la presunta *Pseudomonas aeruginosa* en agar TSA dio lugar a colonias lisas, amarillentas, ligeramente brillantes y bordes irregulares de consistencia levemente viscosa (Fig. N°5). La tinción de Gram mostró bacilos cortos Gram negativos. El cambio de color de las tiras reactivas de la prueba de

oxidasa a morado indicó que esta cepa posee la enzima citocromooxidasa que es capaz de oxidar al citocromo C reducido, este sistema (citocromooxidasa/citocromo C) en presencia de oxígeno puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo NaDi (1-naftol + dimetilfenilendiamina) con formación de la molécula azul de indofeno; esto se visualizó por el cambio del color de las tiras reactivas lo que indica prueba positiva para la prueba de oxidasa. ⁽¹⁶⁾

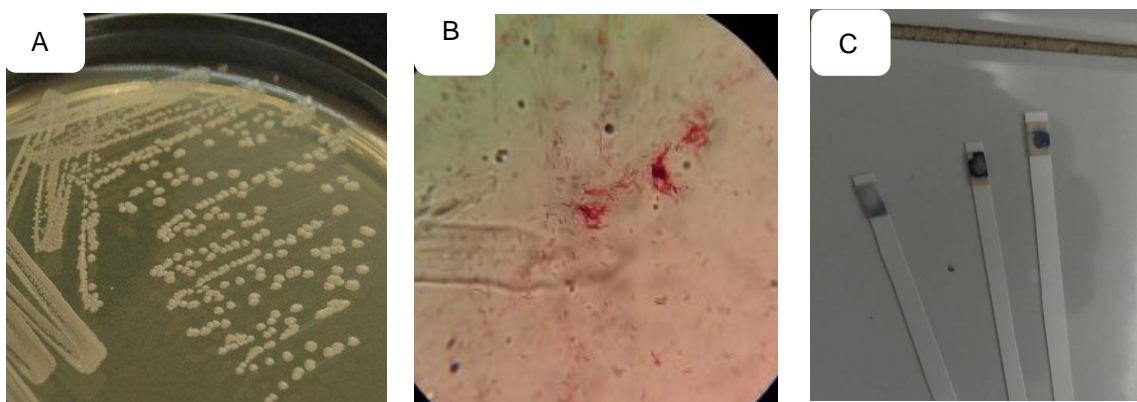


Figura N°5: Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de *Pseudomonas aeruginosa*. A: cultivo en TSA, B: tinción de Gram, C: prueba de Oxidasa.

El cultivo de esta cepa en agar cetrímide mostro colonias de color verde brillante (Fig. N°6), debido a que el medio de cultivo está diseñado para estimular en la *Pseudomonas aeruginosa* la producción de los pigmentos pioverdina y piocianina que en conjunto forman un color verde brillante característico de dicha bacteria. En la prueba de TSI (triple azúcar hierro), este medio contiene carbohidratos fermentables (glucosa, lactosa y sacarosa) Cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización. Se observó en esta prueba que la cepa presento un color rojo tanto en la parte inclinada del tubo como en el fondo(K/K), lo cual reveló que

esta cepa no es capaz de fermentar carbohidratos, o dicho de otra forma la cepa presenta reacción ácido negativa frente a la fermentación de carbohidratos ⁽¹⁷⁾. Tomando en cuenta las pruebas de identificación anteriores con base en lo descrito en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey ⁽³⁾, para esta cepa se puede confirmar su identidad como *Pseudomonas aeruginosa*.

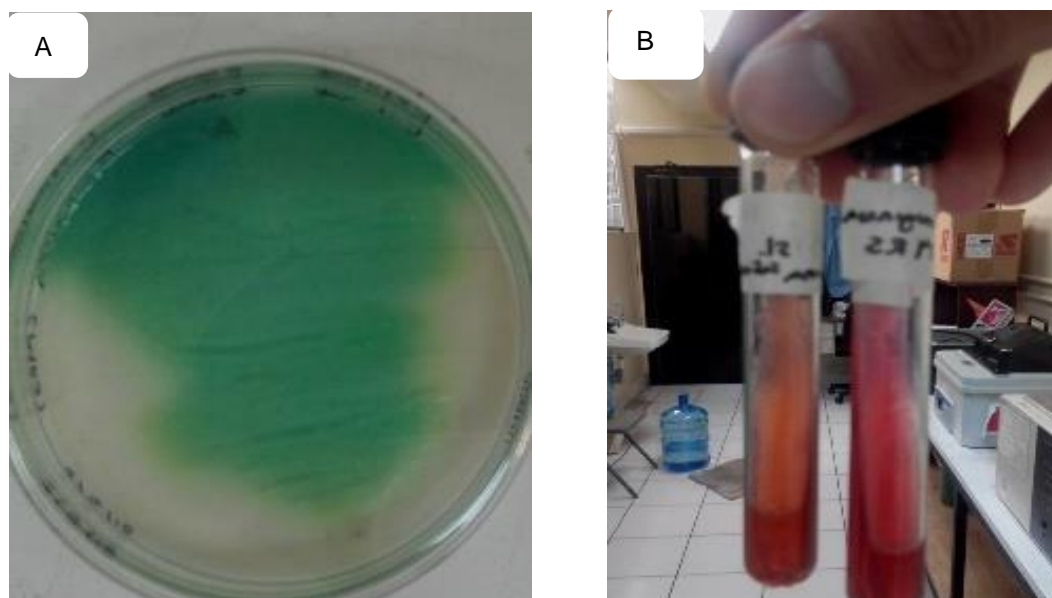


Figura N°6: Resultados de las pruebas para la verificación de la identidad de *Pseudomonas aeruginosa*. A: cultivo en agar Cetrimide, B: prueba de TSI

5.2 Estandarización de los inóculos.

Para verificar que mediante la estandarización se lograba obtener suspensión con 10^8 UFC/mL, se realizó el proceso tres veces como se describe en la metodología, obteniéndose los datos presentados en la Tabla N° 3, donde se presenta el resultado final del recuento obtenido de la dilución 10^{-7} debido a que en esta se obtuvo un conteo entre 25 y 250 colonias por placa, intervalo donde se obtienen recuentos más confiables, según la Farmacopea de los estados unidos (USP 25). ⁽⁸⁾

Tabla N°3: Resultados de la estandarización de los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Bacillus subtilis</i>											
Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3			
%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio	%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio	%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio
4.7	44	46	45	5.1	61	54	57.5	5.0	59	43	51
FD=10 ⁷				FD=10 ⁷				FD=10 ⁷			
Resultado final = 4.5 x10 ⁸ UFC/mL				Resultado final = 5.8 x10 ⁸ UFC/mL				Resultado final = 5.1 x10 ⁸ UFC/mL			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>											
Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3			
%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio	%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio	%T	10 ⁻⁷ (1mL)		Promedio
62.9	10	15	12.5	51.6	32	36	34	52.1	30	39	34.5
FD= 10 ⁷				FD= 10 ⁷				FD= 10 ⁷			
Resultado final = 1.3x10 ⁸ UFC/mL				Resultado final = 3.4x10 ⁸ UFC/mL				Resultado final = 3.5x10 ⁸ UFC/mL			

Con base en estos resultados se confirma para *Bacillus subtilis*, que una suspensión con tramitancia entre 0.5 y 5 % presenta una densidad celular del orden de 10⁸ UFC/mL. Para *Pseudomonas aeruginosa* una suspensión con tramitancia entre 50 – 60% presenta una densidad celular del orden de 10⁸ UFC/mL.

5.3 Cuantificación de Biopelículas

Se estableció un punto de corte (DOc) para separar las bacterias no formadoras de biopelículas de aquellas que sí son formadoras (Ver tabla N°4). La DOc quedó definido como tres desviaciones estándar (SD) sobre la densidad óptica media de los controles. Los controles fueron tres por cada fila del ensayo designadas de la A a la H en la placa (Ver figura N°7).

Tabla N°4: Densidades ópticas de corte resultantes de los triplicados de las densidades ópticas de los controles de las 8 repeticiones.

<i>Repeticiones</i>	<i>DO media Cx</i>	<i>SD Cx</i>	<i>DOc</i>
1	0.0193	0.0038	0.0307
2	0.0053	0.0030	0.0037
3	0.0127	0.0031	0.0218
4	0.0260	0.0006	0.0277
5	0.0140	0.0042	0.0265
6	0.0260	0.0105	0.0575
7	0.0233	0.0095	0.0520
8	0.0250	0.0134	0.0653

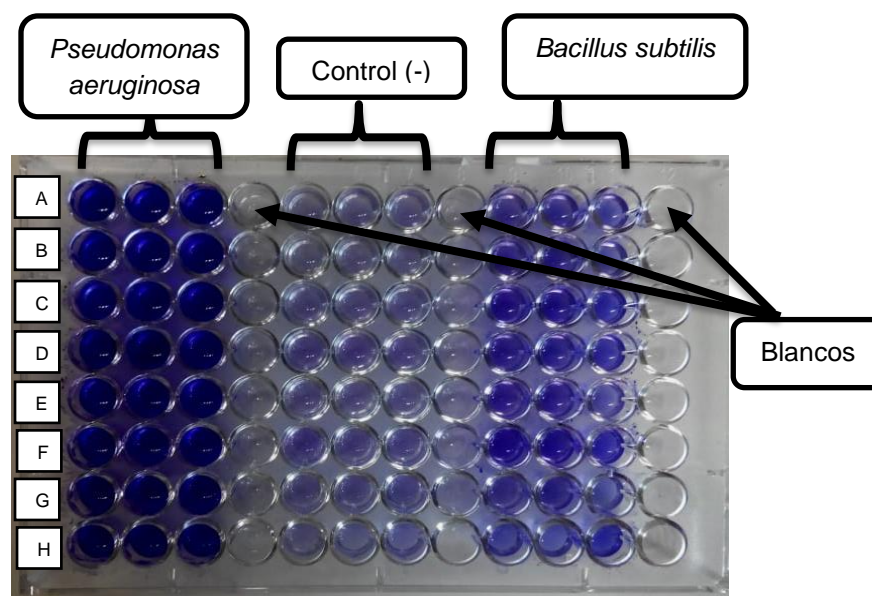


Figura N°7: División de la microplaca utilizada para el análisis de cuantificación de biopelículas.

Las densidades ópticas de corte que se obtuvieron variaron en un rango de 0.0037 hasta 0.0653. Esta variación puede deberse a errores sistemáticos como por ejemplo al momento de realizar los lavados con solución salina eliminar los vestigios de colorante y dejar secar la placa.

Para *Pseudomonas aeruginosa* las ocho repeticiones realizadas en este ensayo resultaron ser fuertemente formadoras de biopelícula ya que las densidades ópticas de la cepa fueron mayores que 4 veces la densidad óptica de corte correspondiente a cada repetición, tal como se observa en la figura N°8.

Mientras que para *Bacillus subtilis* dos de las repeticiones resultaron ser fuertemente productoras de biopelículas porque los valores de densidad óptica de la cepa eran mayores que 4 veces la densidad óptica de corte (DOc); tres repeticiones dieron como resultado formadora moderada debido a que las densidades ópticas de la cepa fueron mayores que dos veces la DOc pero menores que cuatro veces DOc; 2 de las repeticiones resultaron en formadora débil por el hecho de que estas era mayores que DOc pero menores que dos veces la DOc, y una repetición se consideró como no formadora de biopelícula ya que la densidad óptica de la cepa fue menor que la DOc.

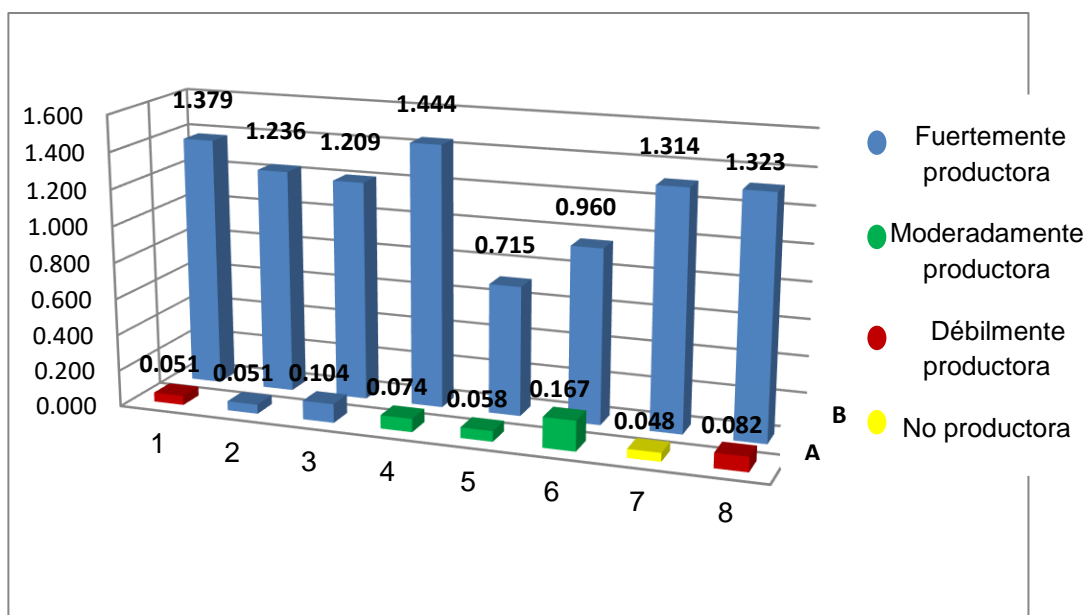


Figura N°8: Comparación de las densidades ópticas obtenidas de las ocho repeticiones entre ambos microorganismos. Línea A *Bacillus subtilis*, Línea B: *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados obtenidos en el estudio tras el análisis de la densidad óptica (DO) (ver anexo N°8) establecen que, de las 2 cepas estudiadas, *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria que presenta niveles más altos de densidades ópticas lo que significa mayor capacidad de formar biopelículas, llegando a clasificarla como productora fuerte de biopelícula, ya que las densidades ópticas obtenidas para esta bacteria sobrepasan el límite de cuatro veces la densidad óptica de corte ($4 \times DO_c$). Esto concuerda con estudios ya realizados ⁽⁹⁾, en donde claramente la *Pseudomonas aeruginosa* se clasifica como una bacteria fuertemente formadora de biopelículas. Mientras que *Bacillus subtilis* en términos generales se puede clasificar como una bacteria cuya capacidad de formar biopelícula está entre débil a moderada.

5.4 Construcción de los bioelectrodos

Un electrodo es un conductor eléctrico utilizado para hacer contacto con una parte no metálica en un circuito, en este caso harán contacto con las soluciones anódica y catódica. Los electrodos fueron construidos con barras de grafito y tuvieron las siguientes dimensiones: Altura = 5.492 cm y diámetro = 0.878 cm (cuyo radio = 0.439 cm). El área útil fue calculada de la siguiente forma: $A = 2 \pi (0.439 \text{ cm}) (5.492 \text{ cm}) + 2 \pi (0.439 \text{ cm})^2 \rightarrow A = 16.360 \text{ cm}^2$

Un electrodo por cada microorganismo fue expuesto a la suspensión bacteriana del orden 10^6 . Este sistema (electrodo + suspensión bacteriana) fue colocado en la cámara anódica. Para completar el circuito se colocó una disolución de ácido sulfúrico 1M en la cámara catódica la cual contenía también una barra de carbono y se unieron ambas cámaras con un puente salino constituido de Agar (0.03 g/mL) y cloruro de potasio (0.3 g/mL).

Por último, se conectaron los extremos positivo y negativo del multímetro. Se utilizaron dos multímetros uno marca Dawson® y otro marca Truper® (ver figura N°9), esto fue con fines comparativos ya que ambos microorganismos se midieron con los dos. Para permitir el desarrollo de una biopelícula, los electrodos fueron monitoreados por un periodo de 250 horas.

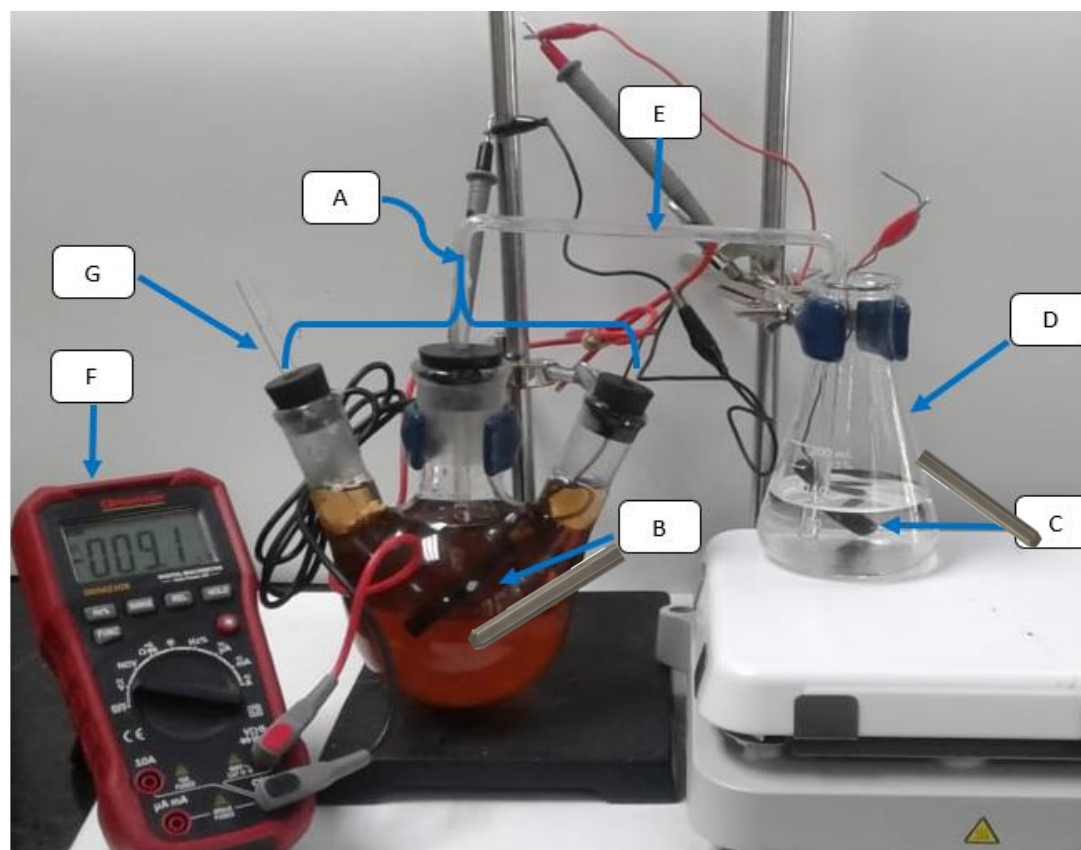


Figura N°9: Sistema construido para el monitoreo del bioelectrodo. A: Cámara anódica, B: ánodo, C: cátodo, D: cámara catódica, E: Puente salino, F: multímetro, G: tubo para realizar las inoculaciones.

En la figura N°10 se observan las gráficas que se obtuvieron tras las inoculaciones sucesivas con los multímetros Dawson® y Truper®. Las flechas indican el tiempo en que se realizaron las inoculaciones, siendo estas a las 0 horas, 88 horas y 160 horas.

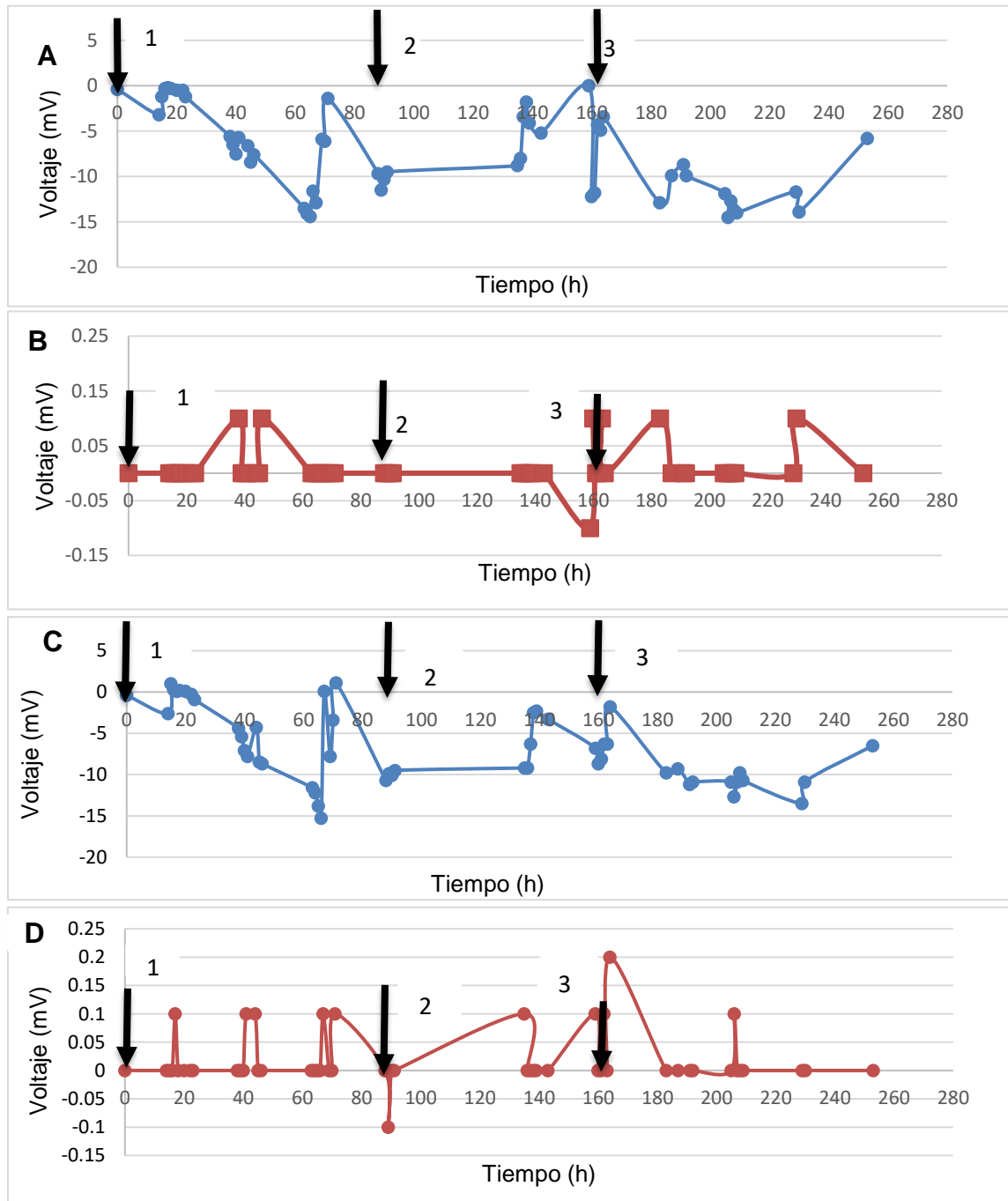


Figura N°10: Voltaje generado por las barras recubiertas con biopelícula durante tres inoculaciones sucesivas. A: *Bacillus subtilis* Multímetro Dawson®; B: *Bacillus subtilis* multímetro Truper®; C: *Pseudomonas aeruginosa* Multímetro Dawson®; D: *Pseudomonas aeruginosa* multímetro Truper®.

Durante las primeras horas del desarrollo de los electrodos tanto de *Bacillus subtilis* como de *Pseudomonas aeruginosa* y utilizando el multímetro Dawson® se observaron voltajes negativos muy cercanos al cero, sin embargo, a medida transcurre el tiempo el voltaje cayó hacia valores más negativos alrededor de -15 mV. Además, se aprecia en las gráficas que tras cada inoculación el voltaje no aumenta como se esperaba sino más bien se mantiene o disminuye.

Cabe mencionar que el patrón de cambio de voltaje que se esperaba, según lo reportado por Arzate y Gaviria, era similar al de la figura N°11, en la que se observa que después de cada inoculación aumenta el voltaje, llegando a puntos máximos (aproximadamente 0.4 V) seguidos de descensos rápidos después de la segunda y tercera inoculación. (1).

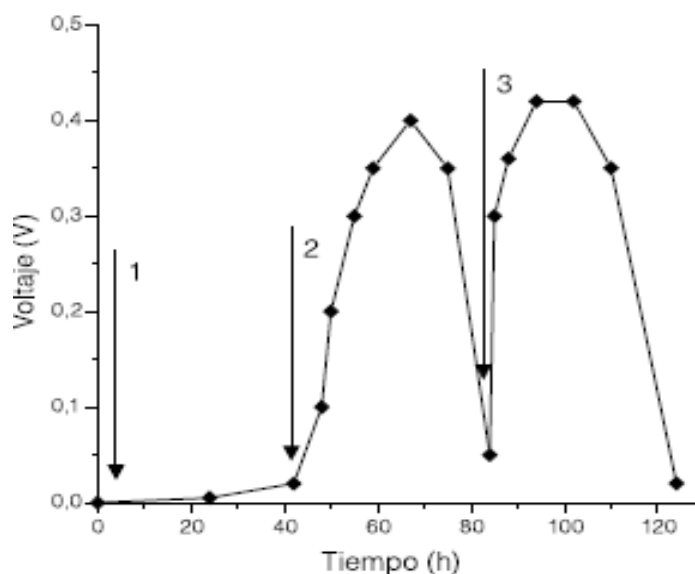


Figura N°11: Aclimatación de la celda con tres aplicaciones sucesivas de inóculo, las flechas indican los tiempos de inoculación. (1)

Comparando el desempeño de ambos microorganismos, los voltajes más altos fueron generados por el bioelectrodo recubierto con *Pseudomonas aeruginosa* en donde el máximo valor obtenido con el multímetro Dawson® fue de 0.2 mV y

con el multímetro Truper® fue de 0.1 mV; mientras que con *Bacillus subtilis* se obtuvo un voltaje máximo de 0 mV con el multímetro Dawson® y con él. multímetro Truper un máximo de 0.1 mV

Un punto importante que hay que mencionar es que en la cámara catódica se observó un burbujeo constante desde la hora 66 hasta la hora 206 del proceso de fijación de biopelículas (Ver figura N°12). Lo que sugiere la generación de gas producto de la transferencia electrónica, pero dicha transferencia no pudo ser monitoreada por lo cual no se ve reflejada en las gráficas ya que solo se obtuvieron voltajes negativos.



Figura N° 12: Burbujeo en la cámara catódica

Al mismo tiempo que se desarrollaba el experimento de construcción de bioelectrodos se inocularon, en un biorreactor aparte, 2 barras de carbono por cada microorganismo y bajo las mismas condiciones, con la finalidad de realizar recuentos y asegurar que en la barra se ha formado la biopelícula. Los resultados se muestran en la tabla N°5.

Tabla N°5: Resultados de los recuentos realizados a las barras de carbono para confirmar la presencia de una biopelícula.

Tiempo	Recuento <i>Bacillus subtilis</i>	Recuento <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Inicial	<10 UFC/g	<10 UFC/g
Final	9.65x10 ⁸ UFC/g	1.5 x10 ⁸ UFC/g

Se obtuvieron recuentos finales en el orden de 10⁸ UFC/g; esto confirma que efectivamente se logró fijar cada uno de los microorganismos en sus respectivas barras de carbono (bio-electrodo) a través de la formación de una biopelícula sobre la superficie de la barra.

5.5 Generación de energía a partir del Agua Residual Sintética como sustrato

Después de haber fijado las bacterias en su respectivo electrodo se reemplazó el medio de cultivo por agua residual sintética (ARS), utilizando la glucosa contenida en el ARS como combustible para la generación de energía.

En la figura N°13 se presentan las lecturas obtenidas utilizando el multímetro Dawson que mostraron voltajes negativos alrededor de los -25 mV. Mientras que con el multímetro Truper® se observaron voltajes que en promedio fluctuaban entre 0 y 0.2 mV.

Es de destacar que el máximo voltaje observado fue de 0.6 mV producido por *Bacillus subtilis* y medido con el multímetro Truper. Mientras que el voltaje más bajo fue registrado por *Pseudomonas aeruginosa* y ronda los -30 mV. Con base en la literatura, en este punto se esperaba una cinética de primer orden ⁽¹⁾.

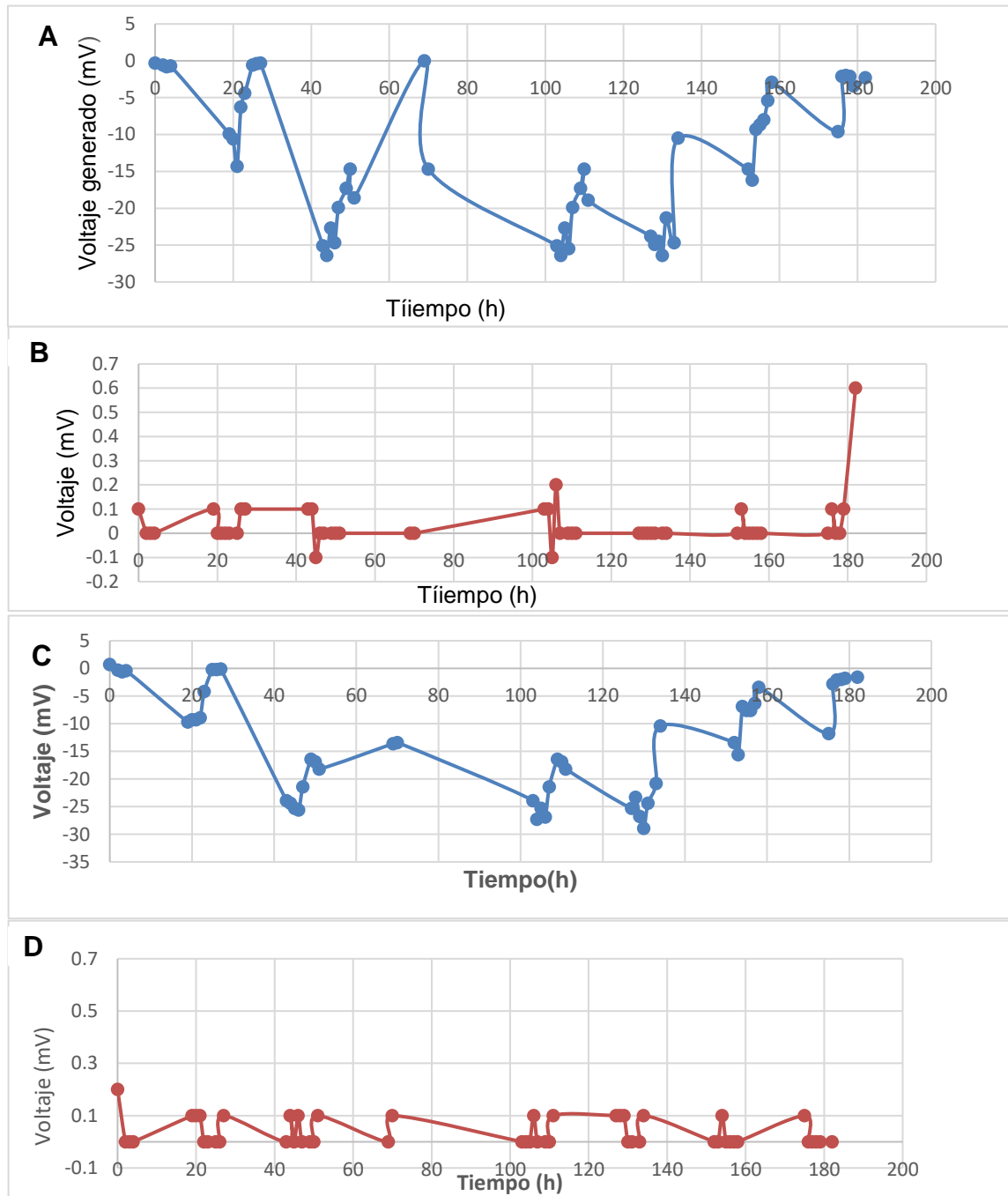


Figura N°13: Generación de voltaje a partir de glucosa como combustible, contenida en una muestra de agua residual sintética. A: *Bacillus subtilis* Multímetro Dawson®; B: *Bacillus subtilis* multímetro Truper® C: *Pseudomonas aeruginosa* Multímetro Dawson®; D: *Pseudomonas aeruginosa* multímetro Truper®.

En este experimento una observación importante fue la formación de burbujas en los biorreactores, tal como se observa en la figura N°14, algo que no ha sido reportado por otras investigaciones. un hecho que no se esperaba, pero creemos que es un reflejo de los microorganismos al consumir un sustrato como la glucosa en aerobiosis liberando CO_2 , este al encontrarse en un espacio reducido es el que pudo haber originado las burbujas.



Figura N°14: Burbujas en la cámara anódica.

La CCM fue construida con un espacio de cuello de botella reducido y sellado de tal forma que no permita la entrada de aire al sistema. Fue operada bajo el modo de cultivo en lote que de forma muy general se define como aquel proceso donde la alimentación del cultivo se hace al principio del proceso, y el contenido es removido en algún tiempo posterior. Este modo de operación permite evaluar eficientemente la influencia que generan los cambios de concentración del

sustrato como producto del metabolismo de los microorganismos, para obtener datos que permitan evaluar de forma más específica y contundente, otras variables que sean objetivo de los estudios que se generen; además permiten garantizar la reproducibilidad de los resultados y los análisis de los experimentos

(24).

La literatura reporta que la CCM funciona consumiendo un sustrato, produciendo un aumento de voltaje que llegue a un punto máximo y luego empieza a decaer, cuando alcanza valores mínimos de concentración de sustrato (Ver figura N° 15), el cual es reemplazado por uno fresco y nuevamente operado de la misma forma (24). Pero como se puede observar la evolución de la celda no fue la esperada y hubo una caída del voltaje desde el primer día de operación.

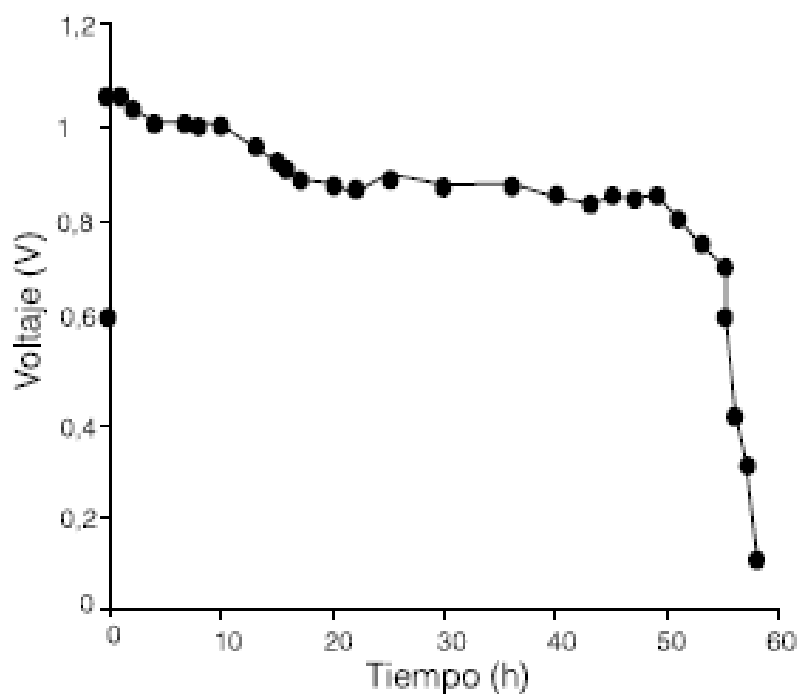


Figura N° 15: Generación de voltaje a partir de glucosa como sustrato. (1)

En el transcurso de esta investigación, repetidamente se obtuvieron mediciones de voltajes negativas en los diferentes procesos; lo cual ya ha sido reportado

anteriormente por Oh & Logan (2007) ⁽²³⁾ como un fenómeno denominado como “inversión del voltaje”. Tomando en cuenta que el voltaje de una celda es la diferencia de potencial entre los electrodos, la inversión del potencial o voltaje consiste en que el voltaje de la celda pasa de un valor positivo a uno negativo ⁽³⁾, dando como resultado la polaridad inversa de una celda, es decir se invierte el flujo de electrones y como consecuencia hay pérdida de generación de energía. Algunos investigadores atribuyen este fenómeno a dos factores como: la inanición de la celda y al modo de operación. La inanición de la celda es la pérdida de la actividad microbiana por falta de combustible; respecto al modo de operación, otros investigadores han observado que los cultivos en lote son más susceptibles a desarrollar el fenómeno ^{(22), (24)}.

Es posible que la inanición de la celda esté relacionada con la formación de un gradiente de concentración de glucosa en la cámara anódica, produciendo una zona alrededor del electrodo de baja concentración de glucosa y una zona alejada del electrodo rica en glucosa (Ver figura N° 16), y debido a que el sistema permaneció inerte mucho tiempo la glucosa tardo más en difundir, dificultando que las bacterias consumieran el combustible. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se da la inversión del voltaje, así como una descripción más detallada de las condiciones bajo las cuales puede darse este fenómeno no han sido suficientemente exploradas ⁽²⁾.

Otro factor que pudo contribuir a la inversión del voltaje fue la falta de establecimiento de condiciones anaeróbicas. Esto es importante pues se ha descrito que las bacterias necesitan realizar un metabolismo anaeróbico para la generación de electricidad ⁽¹⁾. Por lo cual en otras investigaciones han optado por burbujear la solución contenida en la cámara anódica con algún gas que desplace el oxígeno ya sea N₂ o CO₂.

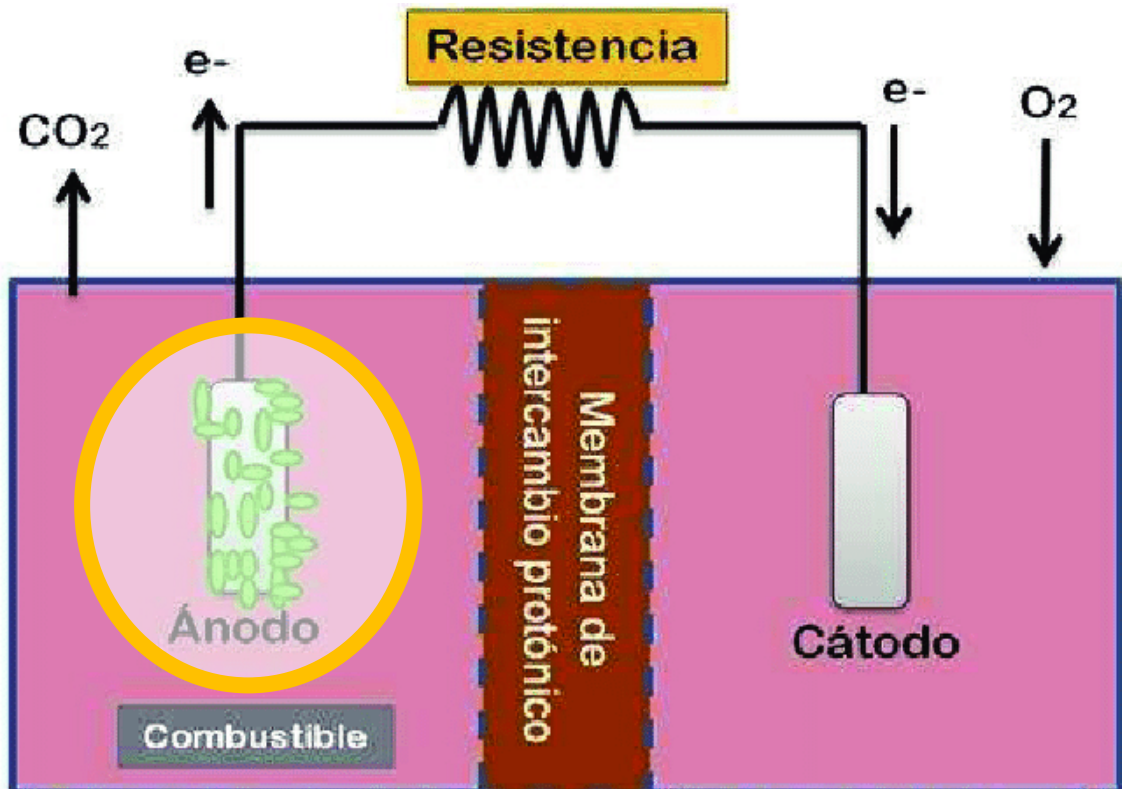
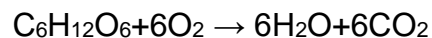


Figura N° 16: Formación de gradiente de concentración en la cámara anódica.

Lo anterior tiene sentido si se parte desde la premisa que en cada semi-celda debe llevarse a cabo una única reacción, por lo cual las bacterias contenidas en el ánodo de una celda de combustible microbiana deben realizar únicamente la oxidación del combustible en este caso la glucosa. Sin embargo, en un metabolismo aeróbico se llevan a cabo la siguiente reacción:



El oxígeno es reducido y forma agua al mismo tiempo que la glucosa es oxidada para formar CO₂, si bien aquí el microorganismo produce electrones, los consume para los procesos metabólicos de crecimiento aerobio y probablemente eso causo la inversión de voltaje y se polarizó la celda.

5.6 Eficiencia en la remoción de residuos

Se analizó la DQO al Agua Residual Sintética (ARS) antes que fuera sometida a la acción de los bioelectrodos construidos y posteriormente después del tratamiento por cada microorganismo. Tomando en cuenta que estaría presente masa bacteriana en el ARS se decidió filtrar la mitad de la muestra tratada y analizar ambas muestras, y los resultados se muestran en la tabla N°6.

Tabla N° 6: Resultados del análisis del DQO inicial y de la muestra tratada por cada microorganismo.

Inicial	Final			
4020 mg O ₂ /L	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
	Filtrada	No filtrada	Filtrada	No filtrada
	5940 mg O ₂ /L	6045 mg O ₂ /L	5910 mg O ₂ /L	6060 mg O ₂ /L

No fue posible realizar el cálculo de % de remoción de residuos debido a que al aplicar la fórmula el resultado será un valor matemáticamente erróneo.

$$ERR = \frac{DQO \text{ inicial} - DQO \text{ final}}{DQO \text{ inicial}} \times 100\%$$

Debido a que DQO aumentó en lugar de disminuir (es decir el valor final de la DQO es mayor que el inicial), se obtendría un valor negativo en el numerador y, por lo tanto, daría como resultado un porcentaje negativo.

La razón del aumento de la DQO puede atribuírsele a que los microorganismos utilizaron los electrones obtenidos del sustrato para la producción de biomasa en lugar de transferirlos al ánodo probablemente por la falta de un ambiente de

anaerobiosis en la cámara anódica, ya que al haber oxígeno en el ARS las bacterias lo utilizaron para llevar a cabo su metabolismo.

Debido a los fenómenos explicados anteriormente y como se puede observar en la tabla N°7, la capacidad de formación de biopelículas fue mayor en *Pseudomonas aeruginosa* que en *Bacillus subtilis*, no se observaron diferencias significativas entre los voltajes producidos por ambas, ni se observó reducción de residuos por acción de los bioelectrodos desarrollados. Sin embargo, de acuerdo a lo sugerido por la literatura, serán necesarios experimentos en sistemas anaerobios para poder concluir sobre la capacidad de los microorganismos de estudio de producir electricidad.

Tabla N° 7: Comparación de los parámetros evaluados entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

Parámetro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Cuantificación de biopelícula	Fuertemente formadora	Débilmente formadora
Voltaje máximo y mínimo generado a partir de la glucosa como combustible	Max: 0.2 mV Min: -3 0 mV	Max: 0.6 mV Min: -27 mV
% de remoción de residuos	No concluyente	No concluyente

**CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES**

6.0 CONCLUSIONES

1. El método de semi-cuantificación de biopelículas aporta una herramienta importante, atractiva y de realización sencilla que permite un conocimiento (semi-cuantitativo) acerca de la formación de este sistema de vida microbiano y para la selección de microorganismos potencialmente útiles para trabajar en una celda de combustible microbiana.
2. Las mediciones de cuantificación de biopelícula mostraron que de los dos microorganismos analizados la *Pseudomonas aeruginosa* presenta un mejor potencial para el desarrollo de películas sobre el material de ensayo utilizado en esta investigación; y aunque las mediciones de voltaje durante la construcción de los bioelectrodos no fueron significativamente diferentes, las lecturas ligeramente mayores de este parámetro producidas por este microorganismo sugieren su superioridad en la producción de electrones.
3. El burbujeo en la cámara catódica indica actividad durante el proceso de construcción de bioelectrodos, aunado a las diferencias entre los recuentos inicial y final del microorganismo de las barras de grafito, demuestran la formación de biopelícula sobre las barras utilizadas como estructura básica de los electrodos.
4. Se logró evidenciar la actividad eléctrica que pueden tener los microorganismos, a pesar de no haber obtenido los resultados esperados en la generación de voltaje.
5. La tendencia de las mediciones de voltaje observadas sugiere que el sistema construido sufrió el fenómeno de inversión del voltaje, posiblemente debido a

factores como la falta de agitación en la cámara anódica, ausencia de anaerobiosis o utilización de un sistema de cultivo en lotes

6. Las mediciones de DQO indicaron aumento de residuos en el sistema ya que, posiblemente debido a la aerobiosis del cultivo, hubo crecimiento de los microorganismos y por lo tanto fijación de materia orgánica en forma de biomasa en el medio

7. Este experimento constituye un precedente para futuras investigaciones, como una base nacional sobre la cual iniciar, pero se requiere concentrar los recursos materiales y humanos para el desarrollo de esta tecnología y así poder contribuir significativamente a solventar dos de los grandes desafíos para la humanidad que son: la crisis energética y el acceso al agua potable.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Establecer un ambiente de estricta anaerobiosis en la cámara anódica para que la actividad bacteriana provoque únicamente la oxidación del combustible., para lo cual es necesario utilizar un gas inerte que pueda desplazar el oxígeno, los más utilizados para este fin son el dióxido de carbono y el gas nitrógeno.
2. Mantener una agitación constante en la cámara anódica para evitar la formación de un gradiente de concentración que haga más lento el proceso de oxidación del combustible por las bacterias.
3. Utilizar agentes oxidantes fuertes como aceptores de electrones en la cámara catódica; los más recomendados (por la literatura) son el permanganato de potasio en solución y el oxígeno; este último se puede implementar mediante la aeración activa a través de una bomba.
4. Realizar las mediciones con un multímetro de alta impedancia que tenga mayor precisión al momento de realizar las lecturas y con una memoria interna que ayude a mejorar el sistema de recolección de datos.
5. Modificar el diseño del sistema para incorporar la entrada de un gas inerte (como dióxido de carbono o gas nitrógeno) en la cámara anódica; además reducir los volúmenes de trabajo tanto en la cámara anódica como en la catódica, con el fin de utilizar un biorreactor más pequeño que facilite el establecimiento de la anaerobiosis y que pueda contribuir a mantener un mejor control y manipulación del sistema.

6. Utilizar una cámara de flujo laminar para armar la cámara anódica y preparar el puente salino para garantizar mayor libertad de movimiento y comodidad al momento de realizar estos procedimientos sin comprometer la esterilidad del sistema hasta que se adicione el inóculo.

7. Incluir mediciones concentración de glucosa a través del tiempo como parámetro para monitorear el sistema ya que puede proporcionar información acerca del comportamiento del microorganismo en la cámara anódica.

8. Continuar los estudios con *Pseudomonas aeruginosa* por su mejor capacidad de formar biopelícula ya que esto supone una ventaja para la construcción del bioelectrodo

BIBLIOGRAFÍA

1. Alzate Gaviria, L., Fuentes, C., Álvarez, A., & Sebastián, P. J. (2008). Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. *Interciencia*, 33 (7), 503-509.
2. APHA, A., W. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21 Ed. Washington, E.U.A
3. An, J., & Lee, H.-S. (2014). Occurrence and Implications of Voltage Reversal in Stacked Microbial Fuel Cells. *ChemSusChem*, 7(6), 1689-1695.
4. Bryant, M. P., Krieg, N. R., Lapage, S. P., Lautrop, H., Liston, J., Murray, R. G. E. & Staley, J. T. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. RE Buchanan, NE Gibbons, The Williams & Wilkins Corp. Baltimore, USA.
5. Buitrón, G., & Pérez, J. (2011). Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: efecto de la distancia entre electrodos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 5-11.
6. Cuervo Lozada, J. P. (2010). Aislamiento y caracterización de *bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
7. Falcon, A., Lozano, J. E., & Juárez, K. (2009). Bioelectricidad. *BioTecnología*, 13(3), 62-78.

8. Farmacopea de los EE. UU. USP. 30 & NF 25. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD,
9. Gómez, J., Gómez-Lus, M. L., Bas, P., Ramos, C., Cafini, F., Maestre, J. R., & Prieto, J. (2013). ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos? *Esp Quimioter*, 26(2), 97-102.
10. Harris, D. (2006). *Análisis Químico Cuantitativo (Segunda ed.)*. Barcelona, España: Reverte.
11. He, Z., Huang, Y., Manohar, A., & Mansfeld, F. (s.f.). (2008). Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode Microbial Fuel Cell.
12. Ibáñez, R., & Hernández, C. (2010). Tratamiento de aguas residuales y generación simultánea de energía eléctrica mediante celdas de combustible microbianas.
13. Jawetz, E., Adelberg, E. A., & Meln, J. L. (2010). *Microbiología Médica*. The McGraw-Hill Companies, Inc.
14. Keith, S., & Hao Yu, E. (2016). *Microbial electrochemical and fuel cells*. Cambridge, Waltham, Kidlington: ELSEVIER.
15. Loera Muro, A., Ramírez Castillo, F. Y., Avelar González, F. J., & Guerrero Barrera, A. L. (2012). *Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir*. Investigación y Ciencia, de la Universidad Autónoma De Aguascalientes.
16. MacFaddin, J.F., (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Montevideo, Uruguay: Editorial Medica Panamericana.

17. Marquina Díaz, D., & Santos de la Sen, A. (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 3(5), 39-55.
18. Marsili, E., Rollefson, J. B., Hozalski, R. M., & Bond, D. R. (2008). Microbial biofilm voltammetry: direct electrochemical characterization. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 9.
19. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2017). Resumen ejecutivo informe de la calidad del agua de los ríos de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
20. Montealegre, A., & Barreto, A. C. (2013). Quorum Sensing: Sistemas de comunicación bacteriana. *Ciencia Actual*, 2.
21. Ochoa, S. A., López Montiel, F., Escalona, G., Cruz Córdova, A., Dávila, L. B., López Martínez, B., & Xicohtencatl Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138-150.
22. Oh, S., & Logan, B. (2007). Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation. *Journal of Power Sources*, 167(1), 11-17.
23. Phillips, P., Wolcott, R., Fletcher, J., & Schultz, G. (2010). Biofilms made easy. *Wounds International*, 1(3), 1-6.
24. Pineda Marín, Ana Del Pilar & Rosas Tafur, Martha Lizeth. (2016). Estado del Arte de Celdas de Combustible Microbianas (CCM) Para Producción de Bioenergía. Universidad Distrital Francisco José De Caldas. Bogota D.C., Colombia

25. Revelo, D. M., Hurtado, N. H., & Ruiz, J. O. (2013). Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Información Tecnológica*, 24(6), 17-28.
26. Saavedra Salas, I. M. (Marzo de 2012). Diseño de una Celda de Combustible Microbiológica con Uso de Bacterias Oxidantes de Azufre y Hierro. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
27. Smart CHEMISTRY, S. F. (2017). *Química para un futuro sostenible*. Madrid. España.
28. Vlamakis, H., Chai, Y., Beauger, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157-168.
29. Winn (h.), Allen , Janada, Procop, & Schreckenberger. (2006). *Diagnóstico microbiológico, texto y atlas a color (sexta edición)*. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Procedimiento para la identificación de *Pseudomona aeruginosa*.

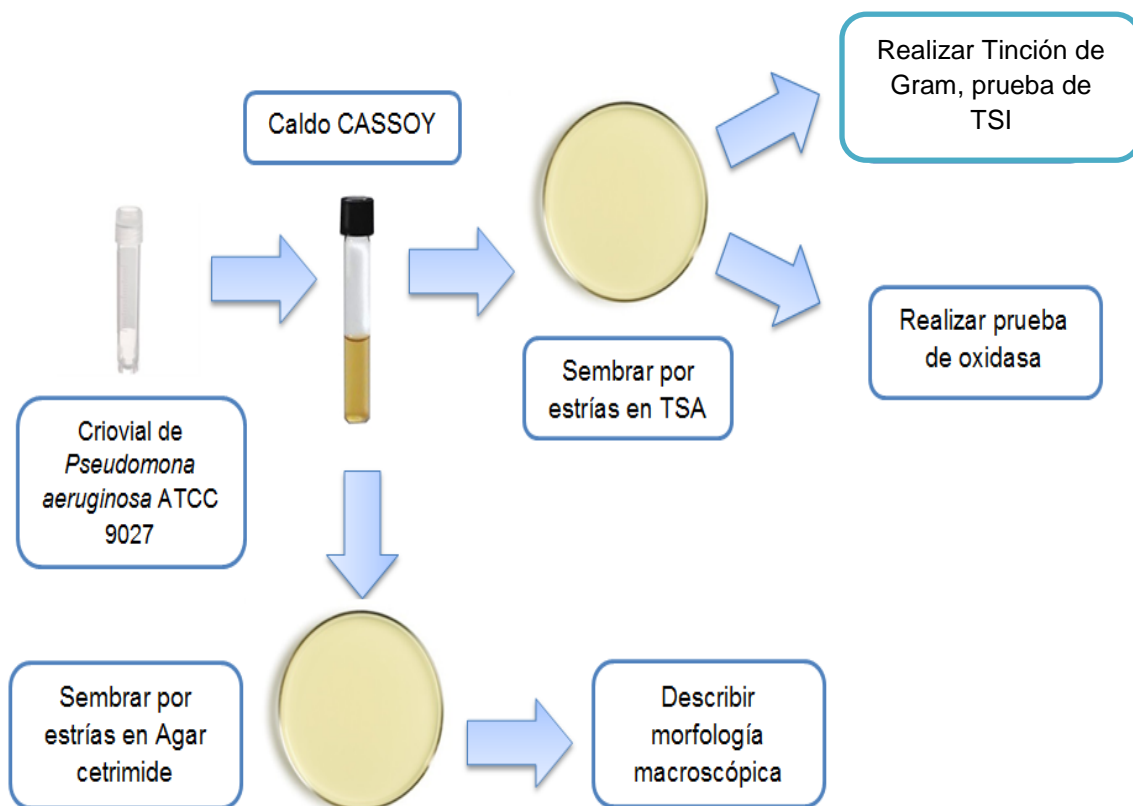


Figura N°17: Procedimiento para la identificación de *Pseudomona aeruginosa*

ANEXO N° 2

Procedimiento para la identificación de *Bacillus subtilis*

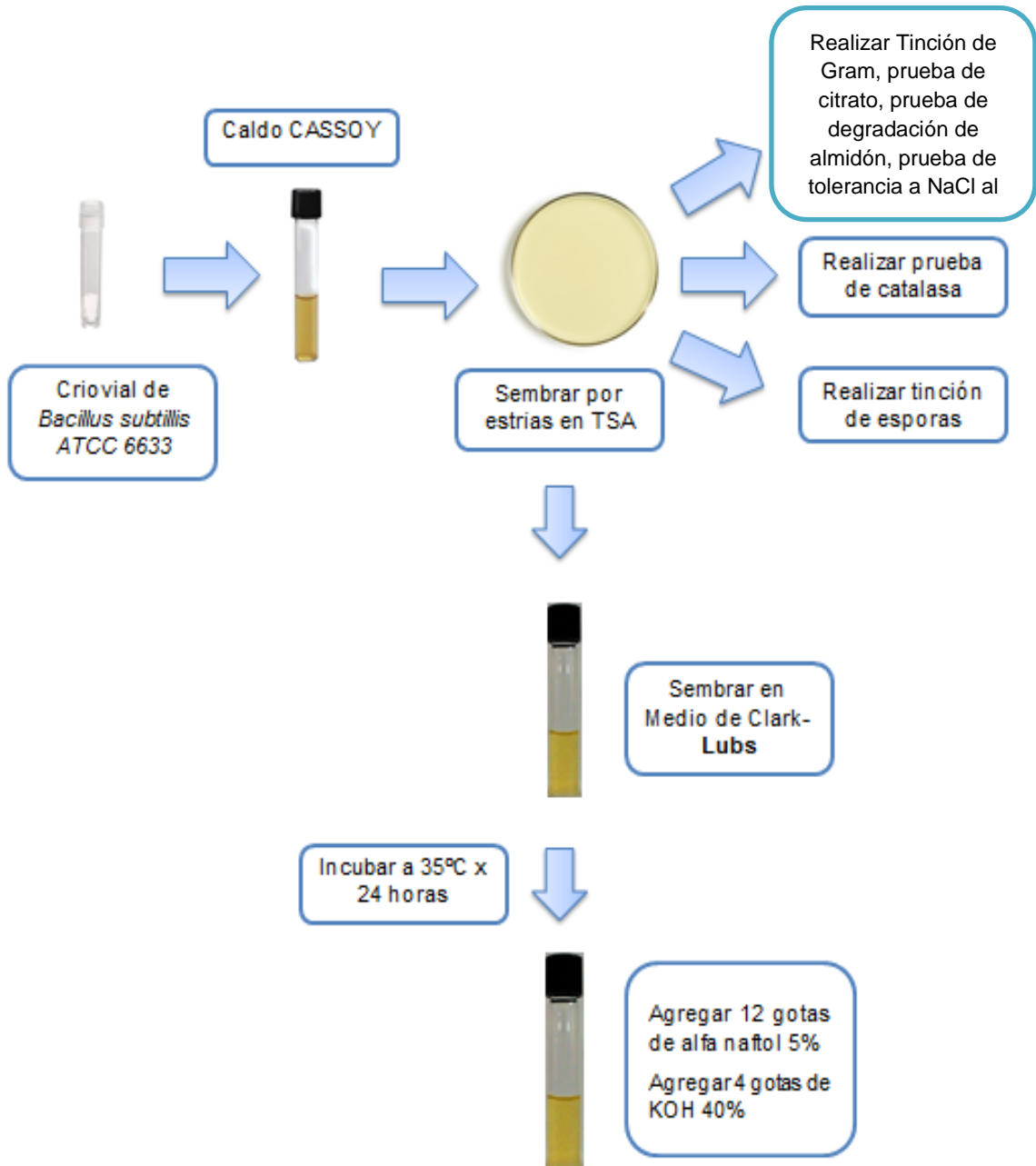


Figura N°18: Procedimiento para la identificación de *Bacillus subtilis*

ANEXO N° 3

Procedimiento para la estandarización de los microorganismos

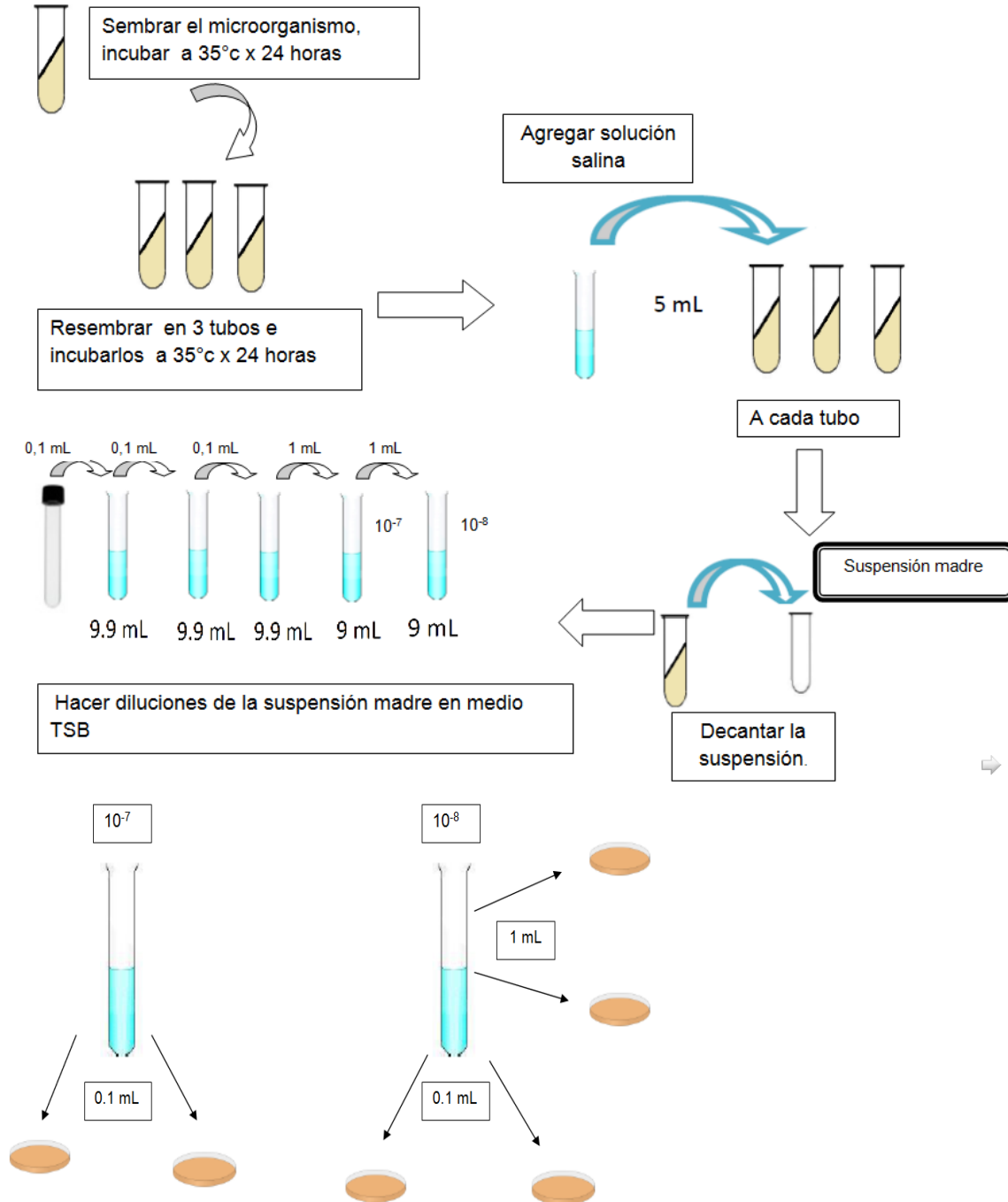


Figura N°19: procedimiento de estandarización de microorganismo.

ANEXO N° 4

Procedimiento para la cuantificación de biopelícula

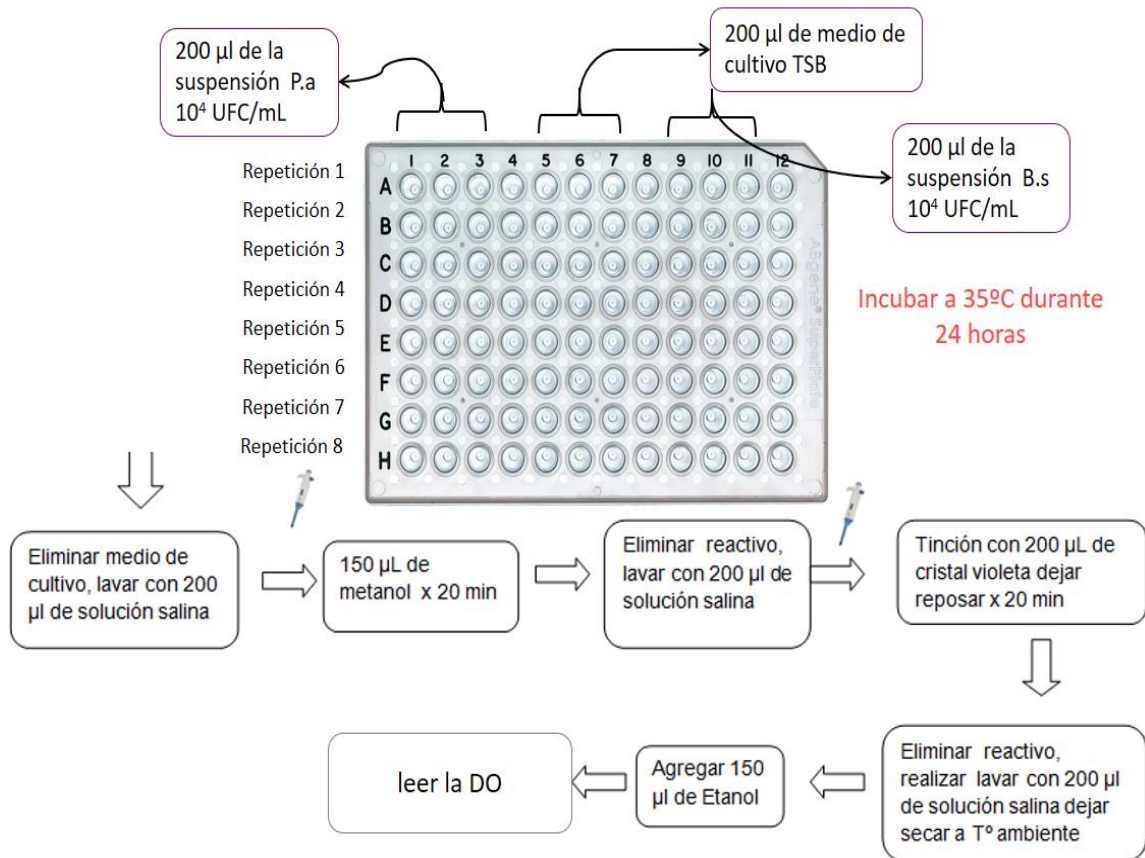


Figura N°20: procedimiento de cuantificación de biofilm

ANEXO N° 5

Procedimiento para la construcción de los electrodos.

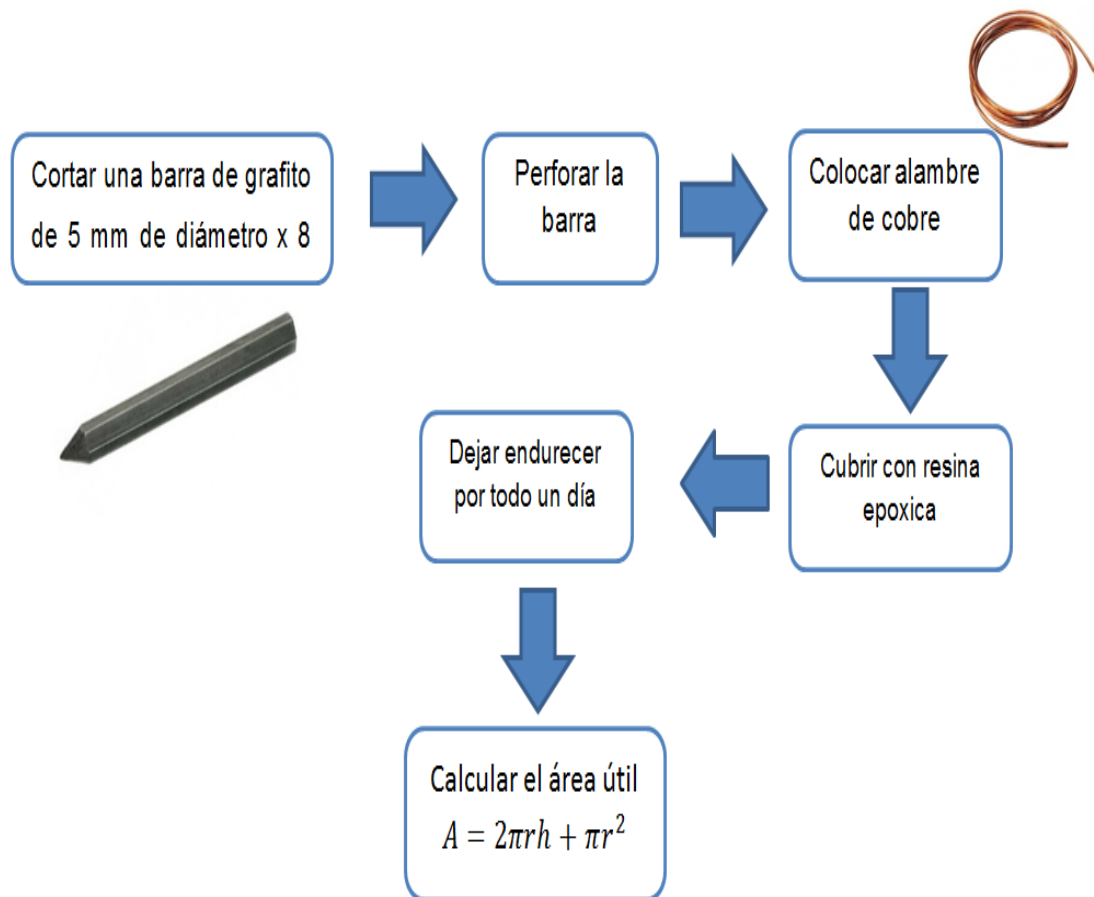


Figura N°21: Procedimiento para la construcción de los electrodos.

ANEXO N° 6

Procedimiento para la inoculación de los microorganismos sobre el electrodo y medición voltamétrica de los mismos

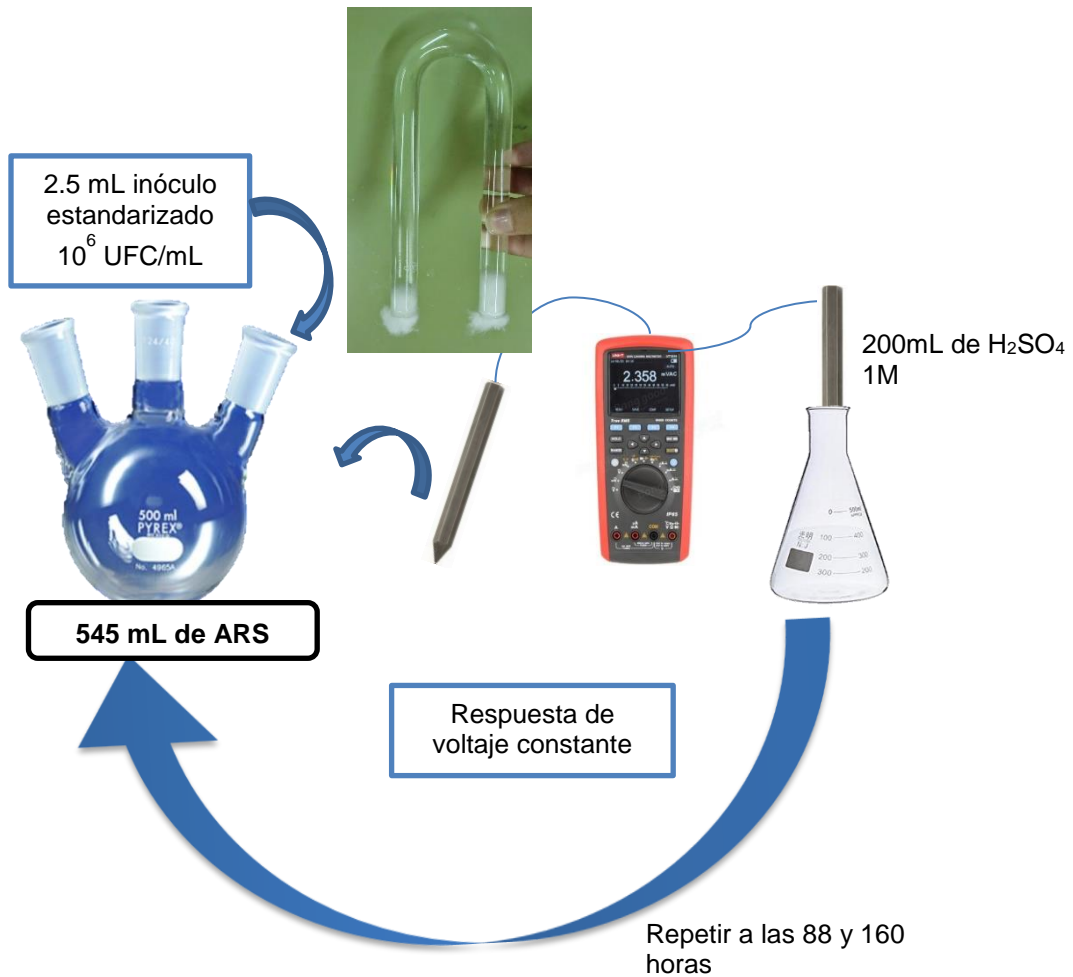


Figura N° 22: Inoculación de los microorganismos sobre el electrodo y medición voltamétrica de los mismos

ANEXO N° 7
Preparación de reactivos (10), (16).

A. Solución de alfa naftol 5%

a-naftol..... 5.0 g
Alcohol etílico (95%)..... csp 100 mL

Preparación: - Disolver el alfa naftol en una pequeña cantidad de alcohol.
Transferir a un balón volumétrico de 100 mL y aforar con alcohol.

B. KOH 40%

Hidróxido de potasio químicamente puro..... 40 g
Creatina..... 0.3 g
Agua destilada..... csp 100 mL

Preparación: - Disolver el el KOH y la creatinina en una pequeña cantidad de agua destilada. Trasferir a un balón volumétrico de 100 mL y aforar con agua destilada.

C. Reactivo para oxidasa.

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina..... 0.1 g
Agua destilada..... csp 1000 mL

Preparación: - Disolver el reactivo con una pequeña cantidad de agua destilada.
Trasferir a un balón volumétrico de 1000 mL y aforar con agua destilada.

D. Reactivos para la tinción de Gram

Cristal violeta

Solución A:

Cristal violeta (pureza del colorante de por lo menos, el 90%).....	2 g
Etanol (95%).....	20 mL
Solución B: Oxalato de amonio.....	0.8 g
Agua destilada.....	80 mL

Preparación: Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar.

E. Solución de yodo yodurado. (Lugol)

Yodo (químicamente puro)	1 g
Yoduro de potasio.....	2 g
Agua destilada.....	300 mL

Preparación: Combinar el yodo y el yoduro de potasio con la ayuda de un mortero. Lavar el contenido de éste con pequeñas alícuotas de agua destilada. Agregar agua suficiente para obtener un total de 300 mL. - Agitar fuertemente. Almacenar la solución en una botella oscura y con tapón de vidrio.

F. Alcohol acetona.

Alcohol etílico (95%).....	500 mL
Acetona.....	300 mL

Preparación: Mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

G. Safranina.

Safranina (pureza del colorante, 90%)..... 0.25 g
Alcohol etílico (95%)..... 10 mL
Agua destilada..... 1000 mL

Preparación: -Disolver el colorante en el alcohol. Agregar el agua destilada.
Filtrar y almacenar en frasco con tapón de vidrio.

H. Verde de malaquita 5%

Verde de malaquita..... 5 g
Agua destilada..... 100 mL

Preparación:
Disolver el colorante en el agua y dejar en reposo durante una hora y media,
filtrar y guardar en frasco oscuro.

I. Solución salina. (Isotónica)

Cloruro de Sodio..... 8.5 g
Agua destilada..... 1000 mL

Preparación: Disolver el reactivo en el agua destilada.

J. Disolución patrón de Ftalato ácido de potasio, 850 mg/L.

Ftalato ácido de potasio..... 0.085g

Preparación: disolver en agua destilada y diluir a 100 mL en balón volumétrico

K. Dicromato potásico

Dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) 0.3 g

Preparación: disolver en agua destilada y llevar a volumen en un balón volumétrico de 25 mL

L. Agua residual sintética

Glucosa..... 4.00 g

NH_4Cl 0.31 g

KCl 0.13 g

NaH_2PO_4 4.97 g

$Na_2HPO_4 \cdot 4H_2O$ 2.75 g

Preparación: Disolver los componentes en agua y después aforar a 1000 mL en un balón volumétrico.

ANEXO N° 8

Preparación de medios de cultivos ⁽¹⁶⁾.

A. TSA (Agar tripticasa-soya)

Peptona de Soja..... 5 g
Peptona de Caseína..... 15 g
Sodio Cloruro.....5 g
Agar.....15 g

Suspender 40 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto o hasta disolución completa. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

B. TSB (Caldo tripticasa-soya)

Peptona de caseína..... 17.0 g
Peptona de soya..... 3.0 g
D(+)-Glucosa monohidratada..... 2.5 g
Cloruro de sodio5.0 g
Difosfato de potasio hidrogenado..... 2.5 g
pH: 7.3 ± 0,2

Suspender 30 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto o hasta disolución completa. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

C. Medio de Clark-Lubs

Peptona..... 7 g
Fosfato Dipotásico..... 5 g
Glucosa..... 5 g

pH final: 6.9 ± 0.2 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación:

Disolver en 1 litro de agua destilada o desmineralizada. Distribuir en tubos, en volúmenes de 10 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

D. Agar cetrimide

Peptona pancreática de gelatina	20.0 g
Cetrimida	0.3 g
Cloruro magnésico	1.4 g
Sulfato Di-potásico.....	10.0 g
Agar-agar.....	13.6 g

pH final: $7,2 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver 44,5 g de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Añadir 10 ml de glicerol. Calentar hasta ebullición, agitando para su disolución. Autoclavar a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. No sobrecalentar. El medio final es blanquecino, aunque puede adquirir tonalidades rosadas tras autoclavarlo, que desaparecen tras oxigenarlo al plaquearlo.

E. Agar citrato de Simmons

Fosfato de amonio dihidrogenado	1.0g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Citrato sódico	2.0 g
Sulfato magnésico	0.2 g

Agar	15.0 g
Azul de bromotimol	0.08 g

Disolver 24.2 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 o 2 minutos para disolución total. Distribuir en tubos y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar y dejar solidificaren posición inclinada (pico de flauta).

F. Agar Triple azúcar Hierro (TSI)

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Digerido péptico de tejido animal	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Lactosa	0,0 g
sacarosa	10,0 g
Dextrosa	1,0 g
Sulfato ferroso de amonio	0,2 g
Tiosulfato sódico	0,2 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	13,0

Disolver 62.5 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 o 2 minutos para disolución total. Distribuir en tubos y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar y dejar solidificaren posición inclinada (pico de flauta).

G. Agar Müller Hinton + almidón 2% (para prueba de degradación del almidón)

La fórmula es del medio base deshidratado

Extracto de carne bovina2.0 g

Hidrolizado ácido de caseína17.5 g

Almidón1.5 g

Agar17.0 g

Disolver 37.0 g de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Incorporar 20 g de almidón. Calentar hasta ebullición, agitando para su disolución. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

ANEXO N° 9

**Método de tabulación de datos de absorbancia en la cuantificación
de biopelícula**

1. El dato de absorbancia para la microplaca se divide en Microorganismos ensayados: *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtiles*, grupos control y blancos.
2. Se calculó el promedio de los blancos por cada replica
3. A los datos de absorbancia de los microorganismos se les resto el blanco de su respectiva replica
4. Una vez obtenido los datos corregidos se procedió a calcular los promedios de absorbancia de cada microorganismo según su respectiva replica.
5. Se realizaron los cálculos descritos en la tesis

	Pseudomonas			Blanco	Controles			Blanco	Bacillus			Blanco	Promedio de Blancos	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
4	A	2.191	1.249	0.863	0.056	0.07	0.076	0.077	0.054	0.103	0.104	0.112	0.055	0.055
5	B	1.557	1.009	1.33	0.054	0.054	0.057	0.06	0.054	0.109	0.127	0.104	0.079	0.062
6	C	0.474	1.357	1.962	0.054	0.071	0.065	0.069	0.056	0.163	0.147	0.169	0.057	0.056
7	D	1.587	2.003	0.902	0.053	0.08	0.079	0.079	0.052	0.093	0.108	0.18	0.055	0.053
8	E	0.685	0.731	0.889	0.052	0.069	0.063	0.071	0.054	0.115	0.113	0.108	0.055	0.054
9	F	1.297	0.782	0.968	0.055	0.092	0.071	0.081	0.054	0.243	0.201	0.222	0.057	0.055
10	G	1.84	0.773	1.502	0.056	0.07	0.087	0.086	0.056	0.104	0.104	0.109	0.061	0.058
11	H	1.865	0.999	1.273	0.052	0.071	0.075	0.096	0.058	0.093	0.124	0.195	0.057	0.056
12														
13														
14		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
15	A	2.1360	1.1940	0.8080		0.0150	0.0210	0.0220		0.0480	0.0490	0.0570		
16	B	1.4947	0.9467	1.2677		-0.0083	-0.0053	-0.0023		0.0467	0.0647	0.0417		
17	C	0.4183	1.3013	1.9063		0.0153	0.0093	0.0133		0.1073	0.0913	0.1133		
18	D	1.5337	1.9497	0.8487		0.0267	0.0257	0.0257		0.0397	0.0547	0.1267		
19	E	0.6313	0.6773	0.8353		0.0153	0.0093	0.0173		0.0613	0.0593	0.0543		
20	F	1.2417	0.7267	0.9127		0.0367	0.0157	0.0257		0.1877	0.1457	0.1667		
21	G	1.7823	0.7153	1.4443		0.0123	0.0293	0.0283		0.0463	0.0463	0.0513		
22	H	1.8093	0.9433	1.2173		0.0153	0.0193	0.0403		0.0373	0.0683	0.1393		
23														

Datos corregidos
 Ejemplo: replica A, Pseudomonas 1
 $2.191 - 0.055 = 2.1360$

Figura N°23: Ejemplo de tabulación de datos de absorbancia

	A	B	C	D	E	F	G	H
24								
25	Replica	DO media	DO media Cx	SD Cx	DOc			
26	1	1.3793	0.0193	0.0038	0.0307			
27	2	1.2363	-0.0053	0.0030	0.0037			
28	3	1.2087	0.0127	0.0031	0.0218			
29	4	1.4440	0.0260	0.0006	0.0277			
30	5	0.7147	0.0140	0.0042	0.0265			
31	6	0.9603	0.0260	0.0105	0.0575			
32	7	1.3140	0.0233	0.0095	0.0520			
33	8	1.3233	0.0250	0.0134	0.0653			
34								
35								
36	Pseudomonas aeruginosa							
37	Replica	DOc	DO media	2DOc	DO media	4DOc	DO med	Clasificacion
38	1	0.0307		0.0614		0.1228	1.3793	Fuerte
39	2	0.0037		0.0073		0.0147	1.2363	Fuerte
40	3	0.0218		0.0437		0.0873	1.2087	Fuerte
41	4	0.0277		0.0555		0.1109	1.4440	Fuerte
42	5	0.0265		0.0530		0.1060	0.7147	Fuerte
43	6	0.0575		0.1150		0.2300	0.9603	Fuerte
44	7	0.0520		0.1039		0.2078	1.3140	Fuerte
45	8	0.0653		0.1306		0.2611	1.3233	Fuerte
46								

	I	J	K	L	M	N	O
	Replica	DO media	DO media Cx	SD Cx	DOc		
	1	0.0513	0.0193	0.0038	0.0307		
	2	0.0510	-0.0053	0.0030	0.0037		
	3	0.1040	0.0127	0.0031	0.0218		
	4	0.0737	0.0260	0.0006	0.0277		
	5	0.0583	0.0140	0.0042	0.0265		
	6	0.1667	0.0260	0.0105	0.0575		
	7	0.0480	0.0233	0.0095	0.0520		
	8	0.0817	0.0250	0.0134	0.0653		
	Bacillus subtilis						
	DOc	DO media	2DOc	DO media	4DOc	DO media	Clasificacion
	0.0307	0.0513	0.0614		0.1228		debil
	0.0037		0.0073		0.0147	0.0510	fuerte
	0.0218		0.0437		0.0873	0.1040	fuerte
	0.0277		0.0555	0.0737	0.1109		moderada
	0.0265		0.0530	0.0583	0.1060		moderada
	0.0575		0.1150	0.1667	0.2300		moderada
	0.0520		0.1039		0.2078		no formadora
	0.0653	0.0817	0.1306		0.2611		debil

Figura N°24: Tabulación de los datos de absorbancia y clasificación según la capacidad de formación de biopelícula.

ANEXO N°10

Evidencias del análisis de cuantificación de biopelícula

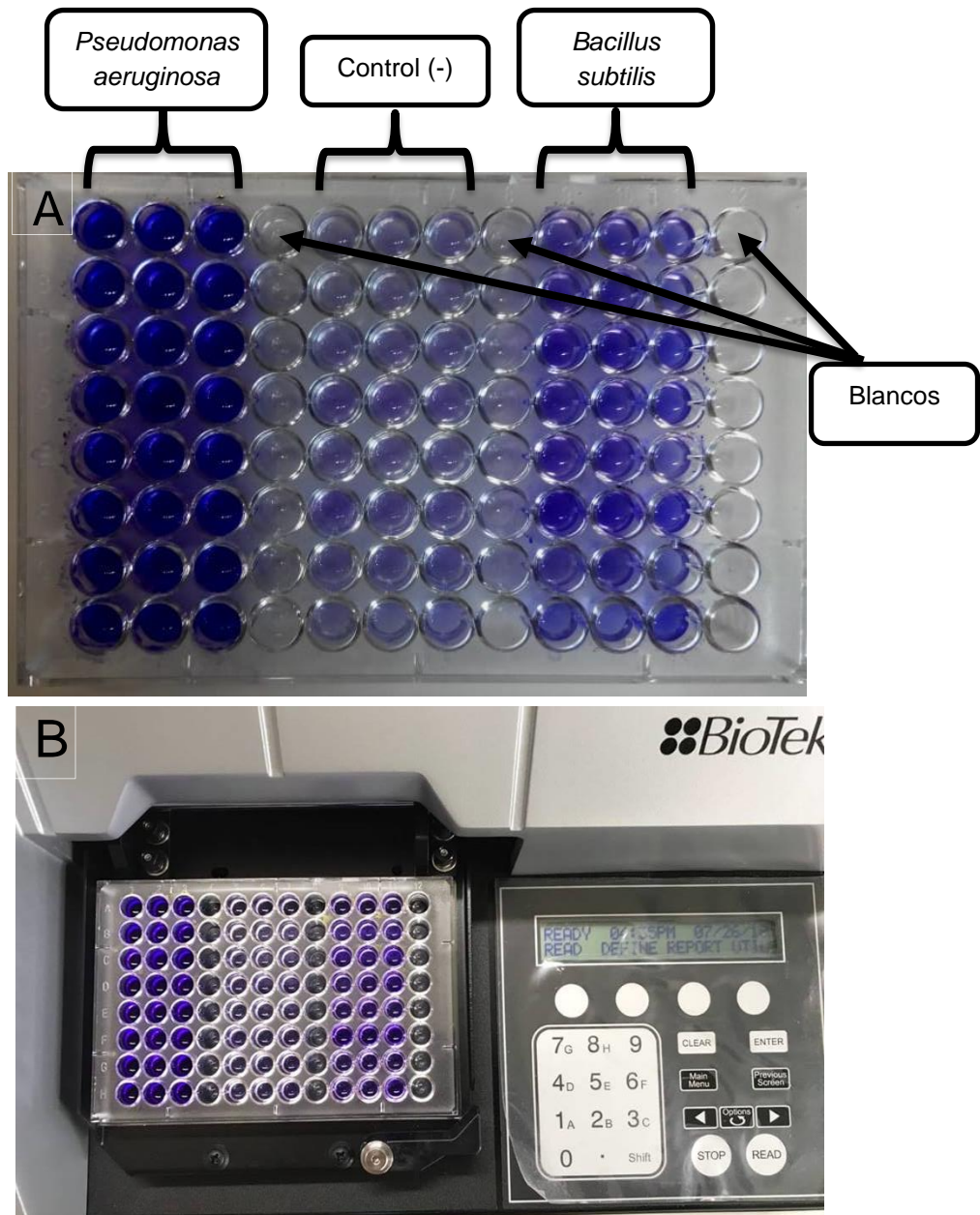


Figura N°25: Evidencias del análisis de cuantificación de biopelícula, A: ejemplo de microplaca de titulación después de adicionar los reactivos; B: equipo utilizado para la lectura de la microplaca.

ANEXO N°11
Reactivos utilizados para la determinación de DQO



Figura N°26: Reactivos utilizados para la determinación de DQO. Las cubetas contiene dicromato de potasio y ácido sulfúrico.

ANEXO N°12

Reactivos utilizados para la determinación de DQO

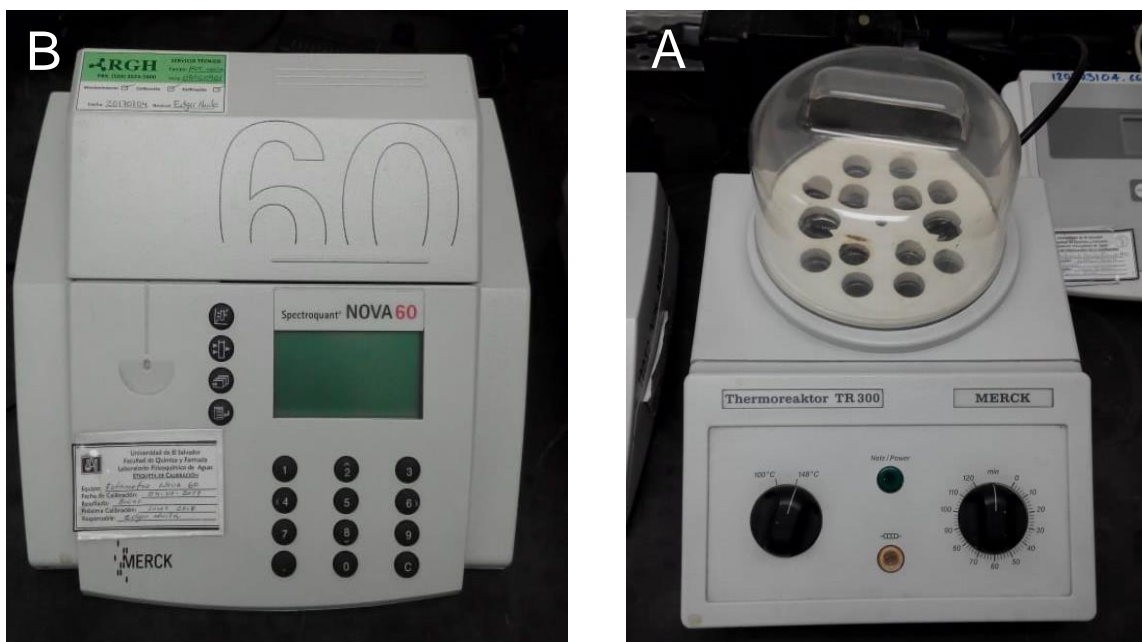


Figura N°27: Equipos utilizados para la determinación de DQO, A: Termoreactor TR 300; Fotometro ;B: Spectroquant Nova 60.