



Adaptación de un inóculo fijador de nitrógeno electrogénico en una celda de combustible microbiana

Claudia Lorena Rodriguez Gonzalez

Agosto
2018

Adaptación de un inóculo fijador de nitrógeno electrogénico en una celda de combustible microbiana

Trabajo de grado
de Maestría en Ingeniería con
énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental
de la Universidad del Valle
Cali, Colombia

Escrito por
Claudia Lorena Rodriguez Gonzalez

Director
Dr. Janeth Sanabria

Codirector
Dr. William H Lizcano Valbuena

Agosto 2018

Informacion de contacto:

Autor: Claudia Lorena Rodriguez Gonzalez
correo: claudia.rodriguez.gonzalez@correounivalle.edu.co

Director: Prof. Janeth Sanabria
Escuela de Recursos naturales y del ambiente
EIDENAR
correo: janeth.sanabria@correounivalle.edu.co

Co-Director: Prof. William H Lizcano Valbuena
Departamento de Química
correo: william.lizcano@correounivalle.edu.co

Resumen

Las fuentes primarias de energía utilizadas para la sostenibilidad humana incluyen: combustibles fósiles (78.3 %), nuclear (2.5 %) y renovables (19.2 %). Las dos primeras son agotables y es bien establecido su asociación a impactos ambientales negativos. Se ha estimado que para el año 2020-2025 la población demandará el doble de petróleo, 75 % más de gas y 40 % más de carbón. En la última década se ha acentuado el interés por formas no convencionales, es decir, producción de energía a partir de fuentes renovables sin emisiones de CO₂. Estas formas de producción son entre otras: hidráulica, eólica, solar, bioenergía y geotérmica. Las celdas de combustible microbianas (CCM), *Microbial Fuel Cell*, (*MFC*) han sido implementadas como fuente alternativa de energía y biorremediación. Sin embargo, los inóculos utilizados hasta el momento han sido provenientes de sistemas de tratamiento y sedimentos y han presentado limitaciones en la generación de electricidad. No se han encontrado estudios que evalúen la capacidad de producción de electricidad de consorcios fijadores de nitrógeno. La hipótesis de que la fijación biológica de nitrógeno es un proceso que será más eficiente en densidad de potencia en una CCM radica en la importante transferencia de protones y electrones en el proceso. Con el presente trabajo, esperamos que consorcios fijadores de nitrógeno enriquecidos en biorreactores puedan llegar a ser más eficientes que los inóculos utilizados hasta el momento.

Palabras claves

Bioenergía, Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), Celdas de Combustible Microbianas (CCM).

Índice general

Resumen	I
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. ANTECEDENTES	3
3. MARCO TEORICO	5
3.1. Celdas de combustibles microbianas, CCM	5
3.2. Factores involucrados en la producción de electricidad	6
3.2.1. Electroodos	6
3.2.2. Combustible	6
3.2.3. Membrana selectiva de protones	6
3.2.4. Microorganismos	7
3.3. Parámetros que se evalúan en CCM	7
3.4. Aplicaciones de las CCM	8
3.4.1. Sensores ambientales	8
3.4.2. Obtención de hidrógeno	8
3.4.3. Generación de energía	9
3.4.4. Tratamiento de agua residual	9
3.5. Ciclo global del nitrógeno	9
3.5.1. Fijación de nitrógeno	9
3.5.2. Fijación Biológica de nitrógeno	10
3.6. Bioprospección	10
4. OBJETIVOS	12
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos específicos	12
4.3. Hipótesis	12
5. METODOLOGÍA	13
5.1. Selección de inóculo	13
5.2. Montaje y operación de reactores	13
5.2.1. Seguimiento del reactor	14
5.3. Generación de electricidad en Celdas de Combustible Microbianas	15
5.3.1. Montaje de la unidad experimental (CCM)	15
5.3.2. Seguimiento de la unidad experimental	16
5.3.3. Análisis de la información	16
5.4. Análisis microbiológico	16
5.4.1. Pruebas de Cultivabilidad	17
5.4.2. Extracción de ADN, PCR y Secuenciación	17

5.4.3. Análisis resultados de secuenciación	18
6. RESULTADOS	19
6.1. Obtención de inóculo fijador de nitrógeno para las Bioceldas	19
6.2. Diseño experimental y montaje de las CCM	20
6.3. Análisis Microbiológicos de los ánodos	21
6.3.1. Recuentos microbiológicos	21
6.3.2. Diversidad de BFN	22
6.3.3. Diversidad de Bacterias Generales	22
7. DISCUSIÓN	25
7.1. Obtención de biomasa para las CCM	25
7.2. Generación de electricidad en CCM	25
7.3. Recuentos microbiológicos	26
7.4. Diversidad de BFN	27
7.5. Análisis de los resultados de secuenciación	27
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
8.1. Conclusiones	30
8.2. Recomendaciones	30
8.2.1. Agradecimientos	30
References	32
A. ANEXOS	37
A.1. Anexo 1	37
A.2. Anexo 2. Glosario	39
A.3. Anexo 3. Abreviaciones	41

Índice de figuras

3.1. Celda de Combustible microbiana [1]	5
3.2. Ciclo global del nitrógeno [2]. Flujos naturales en verde, flujos “intencionales” humanos en azul y flujos “no intencionales” humanos en naranja. Unidades en Tg N.año ⁻¹ . Procesos que se llevan a cabo en la biosfera, están encerrados por la línea punteada.	10
5.1. Esquema general de la unidad experimenta (CCM).	15
6.1. Variación de las concentraciones de Biomasa (g.L ⁻¹) y Amonio (mg.L ⁻¹) de los reactores durante el último ciclo de operación de 48 horas. (a) Reactor Fijador de Nitrógeno (RFN) y (b) Reactor No Fijador de nitrógeno (RNoF).	19
6.2. Voltaje de la biocelda durante el tiempo de operación. Exp_1 y Exp_2: Replica 1 y 2 respectivamente. Bioceldas tratadas con OH ⁻ : Etilenglicol, NH ₂ ⁻ : Etilendiamina, COO ⁻ : Ácido Oxálico. F: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador.	20
6.3. Recuentos de UFC en los medios selectivos usados, para las bioceldas que registraron valor positivo de voltaje. Bioceldas tratadas con OH ⁻ : Etilenglicol, NH ₂ ⁻ : Etilendiamina, COO ⁻ : Ácido Oxálico. FN: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador. Medios de cultivo: AC: Agar Cetrimide, AEC: Agar Enterococcosel, ASM: Agar Salado Manitol.	21
6.4. Imagen de la separación por electroforesis de las Bacterias fijadoras de nitrógeno en el biofilm de las bioceldas. 1) RFN Tiempo inicial 2) RNoF Tiempo inicial 3) NH ₂ /FN 4) NH ₂ /NoF 5) COO ⁻ /NoF 6) OH ⁻ /NoF. Bioceldas tratadas con OH ⁻ : Etilenglicol, NH ₂ ⁻ : Etilendiamina, COO ⁻ : Ácido Oxálico. FN: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador. Los números debajo de la imagen corresponden a la cantidad de OTU's encontrados en cada muestra, según el análisis de imagen.	22
6.5. Abundancia relativa de las clases predominantes en la biopelícula del ánodo de las CCM.	23
6.6. Curvas de rarefacción de los OTU's encontrados en los anodos de las bioceldas	23
6.7. Géneros más representativos encontrados en el ánodo de las bioceldas	24

Índice de cuadros

3.1. Microorganismos ampliamente utilizados en CCM [3]	7
5.1. Composición del medio nutriente que se utilizó en el Reactor Fijador de Nitrógeno (RFN) y No Fijador de Nitrógeno (RNoF).	14
5.2. Condiciones de operación de los reactores para obtención de fijadores de nitrógeno.	14
5.3. Parámetros de operación y construcción de las bioceldas (valores por biocelda).	15
6.1. Potencia y Densidad máxima de Corriente de las bioceldas	21

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las fuentes primarias de energía utilizadas para la sostenibilidad humana son: combustibles fósiles (78.4 %), nuclear (2.3 %) y renovables (19.3 %) [4]. Las dos primeras tienen en común que provienen de fuentes no renovables y la extracción de estas materias primas está asociada a impactos ambientales negativos. La relación entre el cambio climático, efecto invernadero, degradación de las fuentes hídricas, amenaza a los ecosistemas y el uso de fuentes no renovables para la producción de energía está bien establecida [5]. Estas fuentes son agotables y se ha estimado que para el año 2020-2025 la población demandará el doble de petróleo, 75 % más de gas y 40 % más de carbón, lo cual agotará las reservas de combustible fósil [6]. Solo la quema de combustible fósil para la producción industrial de compuestos nitrogenados consume alrededor del 1-2 % de la energía global producida y emite aproximadamente 300 Mton.m³ CO₂ [7, 8]. Por tanto, se deben incentivar el desarrollo y uso de otras fuentes de energía.

Teniendo en cuenta esta crisis energética, se han propuesto mejorar los sistemas considerados alternativos en los últimos 12 años nuevas formas de producción de electricidad a partir de fuentes renovables sin emisiones de CO₂ [9]. Estas formas de producción pueden ser: hidráulica, eólica, solar, bioenergía y geotermia. Se calcula que el consumo global de electricidad proveniente de estas fuentes hasta el 2017 fue de 16.6 %, 4.0 %, 1.5 %, 2.0 % y 0.4 % respectivamente [4]. Como parte de los desarrollos del uso de la biomasa, se han desarrollado las **Celdas de Combustible Microbianas, CCM** (*microbial fuel cell*, MFC). Las CCM se fundamentan en la actividad metabólica microbiana de óxido reducción, en el cual los electrones transferidos en el ánodo, se aprovechan para la generación de electricidad [10]. En el ánodo los electrones fluyen por un circuito externo hasta llegar al cátodo donde son utilizados por el aceptor final, que en este caso es el oxígeno molecular [11].

Se han desarrollado de las CCM diferentes configuraciones para aumentar la producción de electricidad y demostrar que es una alternativa de producción de energía que está emergiendo [12, 11, 13]. Su aplicación ha sido amplia, como en i) la producción de hidrógeno [14], ii) tratamiento de agua residual [15, 16], iii) biosensores [10] y iv) producción de energía lumínica para encender bombillas LED en lugares con difícil acceso a la energía eléctrica convencional [17]. La ventaja de la aplicación de CCM es que además de la producción de electricidad, estos sistemas disminuyen la emisión de materia orgánica en vertimientos. Sin embargo, los inóculos que hasta ahora han sido utilizados son microorganismos que se encuentran en forma natural y abundante, tales como lodos anaeróbicos provenientes de agua residual, material de desecho de rellenos sanitarios, sedimentos de ríos y sedimentos marinos [18]. Hasta la fecha, no se han encontrado altas producciones de energía para uso razonable [19, 3, 10]. Estudios de hace 40 años, sugirieron que las MFC podrían ser utilizadas para aplicaciones como: a) Generadores eléctricos individuales para residencias, b) fuente de energía para dispositivos electrónicos, c) Barcos y d) Robots autosostenibles. Sin embargo, no se ha encontrado de que ahora se esté aplicando. Por tanto es necesario buscar otros inóculos electro-génicos que potencialmente

puedan aumentar la producción de electricidad.

Por otra parte el proceso de Fijación de Nitrógeno consiste en la transformación del nitrógeno molecular a formas asimilables como NO_3^{-2} , NH_4^{+} , urea, entre otros. Los únicos organismos vivos que son capaces de fijar nitrógeno son los procariontes [2]. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso anaerobio y demanda altas cantidades de energía (16 ATP/molécula de N_2) [20] y esta energía se obtiene de la oxidación de la materia orgánica. A escala de laboratorio se han logrado enriquecer cultivos mixtos de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (BFN) en biorreactores para obtener compuestos nitrogenados [21, 22]. La particularidad de que la fijación de nitrógeno se dé en condiciones anaerobias y necesite la liberación de grandes cantidades de energía (electrones) lo hace potencialmente idóneo para ser utilizado en celdas de combustibles microbianas [23].

No se han encontrado estudios que evalúen la capacidad de producción de electricidad de consorcios fijadores de nitrógeno. Estos inóculos pueden llegar a ser más eficientes en la producción de electricidad que los inóculos utilizados convencionalmente. Adicionalmente uno de los subproductos de la fijación biológica de nitrógeno en biorreactores es el amonio, y este subproducto es 100 % aprovechable como biofertilizante [22]. Finalmente, este trabajo busca involucrar el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno en Celdas de Combustibles Microbianas. La capacidad metabólica de las BFN podría ser la clave para aumentar los procesos de generación de electricidad. Esta es una propuesta de sostenibilidad hacia la generación de fuentes alternativas de electricidad y el aprovechamiento de los subproductos de la fijación biológica de nitrógeno.

De la producción mundial de electricidad el 76.3 % vienen de fuentes no renovables y el 23.7 % de fuentes renovables de energía. De esta producción de electricidad por fuentes renovables el 16.6 % es hidráulica, 3.7 % eólica, 1.2 % solar, 0.4 % geotérmica y el 2.0 % es de la Biomasa. La producción de electricidad a partir de la Biomasa fue de aproximadamente 464 TWh para el año 2017. Los países pioneros en generación de electricidad a partir de la Biomasa son: Estados Unidos (69 TWh), Alemania (50 TWh), China (48 TWh), Brasil (40 TWh) y Japón (36 TWh) seguido de Inglaterra e India [4].

De la cantidad de electricidad producida a partir de la Biomasa el 71 % es generada por Biomasa Sólida, 20 % por Biogás, 8 % por Residuos Sólidos Municipales y 1 % por Biocombustibles (etanol o biodiesel). El uso de la Biomasa para la generación de electricidad ha aumentado en un promedio anual de 8 % aproximadamente con un crecimiento acelerado, particularmente en países como China, Japón, Alemania y Reino Unido. Alrededor de 1.2 mil millones de personas (17 % de la población mundial) viven sin electricidad, la gran mayoría se encuentra ubicada en la región de Asia-Pacífico y en el África subsahariana. Los sistemas de energía renovable continúan desempeñando un papel cada vez más importante en la prestación de servicios de energía para estas poblaciones [24]. Por ello, el desarrollo de tecnologías que generen electricidad a partir de fuentes renovables sin emisiones de CO₂ han sido más deseadas. En Colombia, el Gobierno Nacional en los últimos años ha invertido en el desarrollo y aplicación de tecnologías no convencionales de producción de energía que funcionen con recursos renovables, para solucionar el problema de la crisis energética mundial y contribuir a un medio ambiente más limpio [25].

Las **Celdas de Combustibles Microbianas** (CCM) es un ejemplo de tecnología de generación de electricidad a partir de la biomasa, que ha sido desarrollada y estudiada no solo por su capacidad de generación eléctrica sino también para el tratamiento de agua residual [26, 11]. El concepto de CCM fue demostrado por Potter en 1910 [27], donde produjo electricidad a partir de cultivos de *Escherichia Coli* y *Saccharomyces* sp usando electrodos de titanio. Este hallazgo no generó ningún interés, sólo hasta 1980 cuando se descubrió que la densidad y potencia de la corriente podría aumentarse significativamente por la adición de mediadores de electrones [10], estos son compuestos orgánicos que facilitan y promueven el transporte de electrones desde el interior de la bacteria hacia la superficie del ánodo.

Los estudios de generación de electricidad en CCM han crecido exponencialmente en los últimos 10 años según las bases de datos de indexación (Scopus, 2018). El objetivo ha sido encontrar las condiciones óptimas para la máxima generación de electricidad. Se ha estudiado factores como el diseño, configuraciones, rendimientos, materiales y biodiversidad [28, 11]. Algunos autores describen que ciertas combinaciones específicas de factores inciden en el desempeño eléctrico de una CCM y analizan el comportamiento de una o dos variables, sin embargo, es complejo establecer una condición óptima que logre los mejores resultados [19]. Diferentes

estudios han sido enfocados en identificar metabolismos microbianos que favorezcan la producción de electricidad [29, 30]. Sedimentos marinos, suelo, agua residual, lodos activados han sido utilizados como fuente de microorganismos o inóculos que son capaces de generar electricidad a partir de la degradación de la materia orgánica. Ha sido objeto de estudio, entender cómo la comunidad microbiana transfiere los electrones a los electrodos [31]. Géneros como *Geobacter*, *Shewanella*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas*, *Clostridium* han sido reportados como buenos inóculos para transferencia de electrones y con ello la generación de electricidad [32].

Se han evaluado las ventajas y desventajas comparadas con otros sistemas que utilizan la Biomasa para la generación de electricidad, como por ejemplo, la digestión anaerobia [33]. El número de publicaciones en América Latina (<17 estudios) relacionadas con este tipo de dispositivo es escaso, siendo México, Brasil y Colombia los que han reportado avances en el campo (SciELO, 2018). Estos estudios han buscado la evaluación de inóculos nativos y su identificación. En términos generales la producción de electricidad en una CCM a escala de laboratorio es muy baja, no obstante, en algunos reportes se describen aplicaciones asociadas a sistemas electrónicos de bajo consumo [30, 3]. Ha habido un crecimiento en el interés de experimentar con otras arquitecturas y escenarios que involucren mayores volúmenes, del orden de 100-1000 L de agua residual con contenido variable de materia orgánica [18], con lo que se esperaría mayores niveles de densidad de potencia.

Por otra parte se han desarrollado aplicaciones de CCM en otros campos. a) Se ha descrito el uso de CCM en un robot Eco Bot II que permite la realización de funciones de movimiento, sensado, computación y comunicación. Este dispositivo tiene incorporado una CCM para obtener un sistema eléctricamente autónomo [3]. b) Biosensores para medir la Demanda Biológica de Oxígeno [30]. c) El tratamiento de agua residual a pequeña escala para la eliminación de proteínas y otro tipo de compuestos químicos presentes en agua [34]. En conclusión, a pesar de que las producciones de electricidad han mostrado densidades de potencia entre 1 mW.m^{-2} - 20 W.m^{-2} para algún uso razonable, las CCM han ganado rápidamente atención en una variedad de aplicaciones. Por ello una cantidad de opciones existe por explorar, como el uso de inóculos nativos que no se han evaluado antes y que generen productos de valor agregado para posteriores aplicaciones. Las celdas de combustible microbiano está emergiendo como una tecnología de producción de electricidad sustentable con otras aplicaciones en el campo de la bioprospección.

3.1. Celdas de combustibles microbianas, CCM

La CCM consiste básicamente en dos compartimentos, anódico y catódico, que están separados por un electrolito, en ocasiones por una membrana permeable de intercambio de protones. El compartimento anódico se debe conservar en condiciones anaeróbicas donde una biopelícula oxida la materia orgánica y genera dióxido de carbono, protones y electrones. Los electrones viajan a través de una resistencia que conecta el ánodo con el cátodo, originando una pequeña corriente que puede ser medida y utilizada para realizar trabajo. Los protones son transferidos por medio de la membrana permeable al compartimento catódico que se encuentra normalmente en condiciones aeróbicas, en esta cámara se combinan los protones, los electrones y el oxígeno generando agua [35]. Una CCM convierte un sustrato biodegradable directamente a electricidad. La Figura 3.1 muestra el esquema general de una CCM.

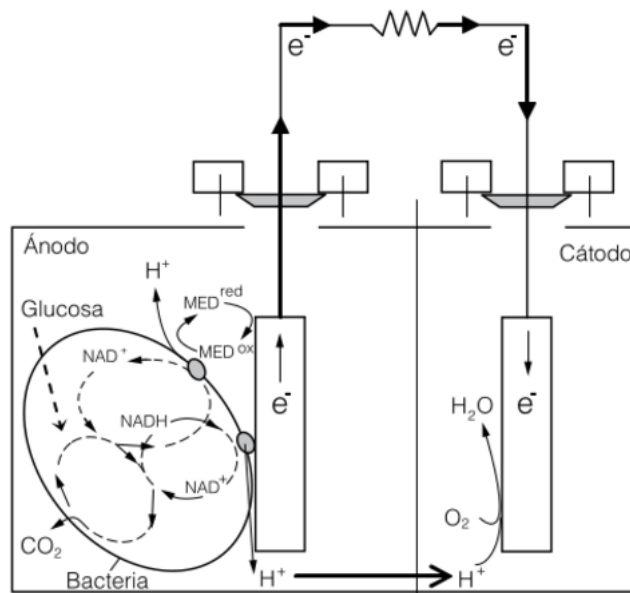
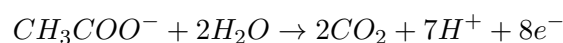


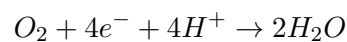
Figura 3.1: Celda de Combustible microbiana [1]

Las reacciones químicas globales que se llevan a cabo en una CCM que utiliza acetato como fuente de carbono (combustible) son [3]:

Reacción Ánodo:



Reacción Cátodo:



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

- La conversión directa de sustrato a electricidad permite altas eficiencias de conversión.
- Operan eficientemente a temperatura ambiente, incluidas bajas temperaturas, mientras se le provea de alimento y las bacterias.
- No requieren del tratamiento del biogás generado en la celda.
- No requieren de energía extra para airear el cátodo, pues éste puede ser 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

3.2. Factores involucrados en la producción de electricidad

3.2.1. Electrodos

Los electrodos son los dispositivos donde ocurre la transferencia de carga. En este caso los microorganismos hacen parte de ellos ya que es su interior ocurre la principal transferencia de carga. El colector anódico es el que captura los electrones producidos por la oxidación de la materia orgánica y el catódico es el que recibe los electrones y ocurre el proceso de reducción con el oxígeno atmosférico. Se han utilizado diferentes tipos de materiales para los electrodos, Hierro, Platino, Grafito. Los electrodos de Platino y Grafito son los más comúnmente utilizados, siendo los de titanio mejores conductores de electrones pero son los más costosos. CCM con electrodos de platino tienen mayores producciones de electricidad que los de grafito. Algunas personas tienden a pensar que amplias superficies de electrodos podría facilitar las reacciones en el electrodo, sin embargo se ha reportado que la superficie del cátodo tiene poco efecto en la producción de electricidad [3].

3.2.2. Combustible

El combustible es la fuente de electrones en la CCM. Los electrones son generados por la oxidación de la materia orgánica mediante el metabolismo microbiano. La generación de corriente varía ampliamente con el tipo y concentración del combustible utilizado en un CCM. Usualmente altas concentraciones de combustible generan mayores cantidades de electricidad. Ácido acético, glucosa, ácido butírico, ácido propiónico, glicerol, agua residual doméstica, efluentes lignocelulósicos, agua residual de industria de alimentos han sido utilizados como combustible en un CCM (Ver Tabla 3.1) [14].

3.2.3. Membrana selectiva de protones

La membrana selectiva de protones es la membrana que separa el compartimiento anódico del catódico y es la que permite el paso de protones de la cámara anódica a la catódica para la generación de agua. Se han utilizado nafion, ultrex, polietileno, poly-estireno/divinilbenceno), puente de sal, tabique de porcelana. El Nafion es el más utilizado como membrana selectiva

por su alta permeabilidad selectiva a los protones, pero investigadores están buscando opciones menos costosas y sustentables [3].

3.2.4. Microorganismos

Existen muchos microorganismos que tienen la habilidad de transferir los electrones generados por la oxidación de la materia orgánica al ánodo. En la Tabla 3.1 se muestran los microorganismos que han sido usados en CCM. Sedimentos marinos y fuentes de hídricas, suelo, agua residual, son ricos en estos microorganismos [3]. Un número reciente de publicaciones discuten la identificación de los microorganismos y la construcción su metagenoma con el propósito de entender como es el mecanismos de transferencia de electrones en una CCM. Cuando un CCM es inoculada con sedimentos marinos, lodos anaerobios o cultivos mixtos usualmente presentan más rendimiento en la producción de electricidad que las CCM con cultivos puros.

Cuadro 3.1: Microorganismos ampliamente utilizados en CCM [3]

Microorganismos	Sustrato
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Glucosa
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Acetato
<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Clostridium beijerinckii</i>	Almidón, glucosa
<i>Geobacter metallireducens</i>	Acetato
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glucosa
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Glucosa, xilosa, sacarosa y maltosa

3.3. Parámetros que se evalúan en CCM

Algunos de los parámetros que se usan para la evaluación del rendimiento en una CCM son: eficiencia energética, resistencia interna, voltaje, densidad de corriente y potencia.

- La eficiencia energética en una CCM se expresa como el producto de la eficiencia coulombica (CE) y la eficiencia de potencial (PE).

$$EE = CE \cdot PE = \left(\frac{C_p}{C_t} \cdot 100 \right) \cdot \left(\frac{V_p}{V_t} \cdot 100 \right)$$

Donde C_p es el total de Coulombs calculados por la integración de la gráfica resultante de Corriente contra el Tiempo. C_t es la cantidad teórica de Coulombs que pueden ser producidos por la completa oxidación de la materia orgánica. V_p es el potencial medido entre el ánodo y cátodo. V_t es el potencial teórico. La mayoría de los estudios solo reportan la eficiencia coulombica [10].

- La resistencia interna puede ser calculada por el uso de la pérdida total de energía. La pérdida total de energía en una CCM se describe en términos de voltaje máximo disponible:

$$E = OCV - IR_{ini} = OCV - I(Ra + Rm + Rc + Re)$$

Rini es la resistencia interna y Ra, Rm, Rc y Re son la resistencia anódica, membrana catódica y la del electrolito respectivamente. Re puede ser expresada como:

$$Re = \frac{l}{AK}$$

Donde l es la distancia de los electrodos (cm) y A es el área de la sección transversal (cm²). K es la conductividad específica (ohm⁻¹.cm⁻¹) del electrolito.

- La densidad de potencia (DP) en (W.cm⁻²) se expresa como la potencia en Watts por unidad de área (cm²) del electrodo anódico. También se puede expresar como la potencia en Watts por unidad de volumen del sustrato. La DP se calcula de la siguiente manera:

$$P = \left(\frac{I \cdot V}{A} \right) \quad \text{ó} \quad P = \left(\frac{I \cdot V}{U} \right)$$

Donde I es la corriente (A), V es el potencial (volts), A es el área de la superficie del electrodo anódico (m²) y U es el Volumen del sustrato de la cámara anódica [36].

3.4. Aplicaciones de las CCM

3.4.1. Sensores ambientales

El contenido de materia orgánica en una solución suele evaluarse en términos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Los métodos clásicos para la determinación de la DBO toman 5 (DBO₅) a 7 (DBO₇) días de incubación. DBO₅ y DBO₇ son buenos métodos para la evaluación de la calidad del agua, son baratos y aplicable a una amplia gama de muestras, sin embargo, requiere mucho tiempo para obtener resultados reproducibles. La CCM se puede aplicar como un biosensor para la determinación rápida de DBO. Los microorganismos son los sensores y la corriente eléctrica o de potencial son los indicadores. Esto es posible gracias a la relación lineal que existe entre la cantidad de materia orgánica y la corriente generada [30].

3.4.2. Obtención de hidrógeno

Se han utilizado CCM para el tratamiento de los residuos agroindustriales provenientes de las industrias alimenticias para obtener bio-hidrógeno como combustible. El tratamiento de las aguas residuales para la producción de hidrógeno en CCM se ha ensayado usando bacterias fermentativas en varios tipos de procesos. Sin embargo, estos procesos no han sido ampliamente utilizados debido a la poca recuperación de hidrógeno a partir de la materia orgánica (1.4 -2.5 mol de hidrógeno por mol de hexosa) y los altos costos de operación. A medida que los efluentes se conviertan en fuentes potenciales de energía, la recuperación o tratamiento de estos residuos en subproductos útiles pueden reducir el costo del tratamiento y, en algunos casos, también reducen la dependencia de los combustibles fósiles [37].

3.4.3. Generación de energía

La producción de energía en forma de electricidad es la aplicación más evidente y directa de las CCM. Los microorganismos funcionan como fuente de energía auto sostenibles durante largos períodos de tiempo en áreas remotas, proporcionando energía eléctrica in situ de pequeños aparatos eléctricos, tales como sensores de línea y transmisores de datos. Estos aparatos electrónicos son útiles en alta mar. Para solucionar el problema de la corriente eléctrica de baja tensión, condensadores y transformadores pueden ser utilizados. Este principio se demostró recientemente con un S-CCM (CCM tipo sedimentario), que consiguió hacer funcionar un sensor meteorológico y transmisor de datos, consumiendo aproximadamente 18 mW. Esto fue posible gracias a la aplicación de un estabilizador de voltaje y un condensador [37].

3.4.4. Tratamiento de agua residual

Las CCM forman una tecnología prometedora para el tratamiento de aguas residuales, como un método de recuperación de energía en forma de hidrógeno o electricidad. Estudios han demostrado que las bacterias en una CCM se pueden usar como sistema de tratamiento de agua residual industrial. Sin embargo, la cantidad de energía producida hasta ahora es baja y no se ha establecido claramente que el uso de CCM puede reducir significativamente el nivel de materia orgánica en el agua. Recientemente, se ha demostrado que una CCM alimentada con agua residual doméstica puede tratar niveles prácticos paralelos a la generación de electricidad. La cantidad de energía generada puede ser considerada alta en comparación con estudios anteriores [37, 11].

3.5. Ciclo global del nitrógeno

La atmósfera contiene alrededor de 10^5 toneladas de N_2 . El ciclo del nitrógeno involucra las transformaciones de unas 3×10^9 toneladas de N_2 por año. El ciclo del nitrógeno es la serie continua de procesos naturales en los cuales el nitrógeno se transforma a distintos estados de oxidación y reducción, de nitrógeno molecular N_2 a amoníaco (NH_3), luego a compuestos orgánicos carbono nitrogenados, óxidos de nitrógeno y finalmente N_2 cerrando el ciclo [2]. Particularmente, las bacterias pueden realizar en su totalidad cada uno de los pasos en las transformaciones requeridas para completar y balancear el ciclo del nitrógeno, ganando por su parte energía y biomasa gracias a la amplia diversidad en sus metabolismos [38]. Fowler y colaboradores (2015) presentan gráficamente (ver Figura 3.2) los procesos y flujos que se realizan a nivel de la biosfera del nitrógeno.

3.5.1. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno (N) accesible en la biosfera [39], el mayor reservorio de esta molécula se encuentra en la atmósfera en una proporción aproximadamente del 78 %, y debe ser fijado a una forma reactiva para su aprovechamiento en la biosfera. La fijación de nitrógeno es la transformación mediante la reducción del N molecular a formas asimilables por las plantas y microorganismos, principalmente nitritos (NO_2^{-2}), nitratos (NO_3^{-2}) y amonio (NH_4^{+}). Entre las transformaciones a gran escala que atrapan el N_2 presente en la atmósfera se destacan: la fijación biológica por procesos de óxido reducción, lumínica y la industrial mediante la combustión de hidrocarburos fósiles [38].

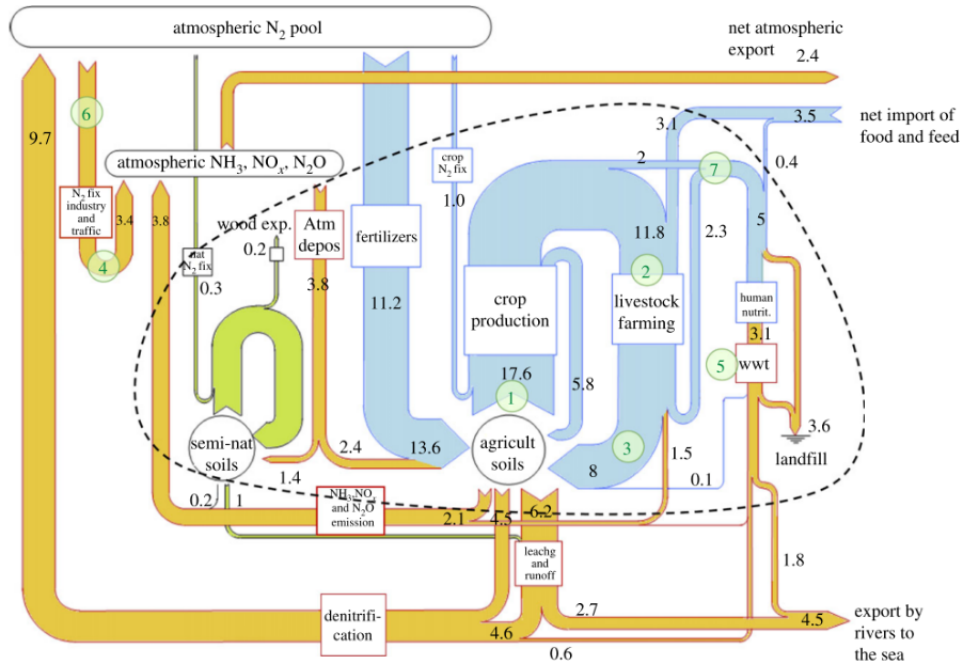


Figura 3.2: Ciclo global del nitrógeno [2]. Flujos naturales en verde, flujos “intencionales” humanos en azul y flujos “no intencionales” humanos en naranja. Unidades en Tg N.año⁻¹. Procesos que se llevan a cabo en la biosfera, están encerrados por la línea punteada.

3.5.2. Fijación Biológica de nitrógeno

El nitrógeno molecular para ser asimilado, debe ser reducido. Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las Eubacteria y Archea, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno [38]. La fijación biológica de nitrógeno es la utilización del N₂ como fuente de nitrógeno para la síntesis celular. Aproximadamente 203 toneladas de N anuales son fijadas por estos microorganismos en la tierra y el océano [2], su operación consiste en el rompimiento de la unión triple entre ambos átomos de N, requiere grandes cantidades de energía, se da a temperatura ambiente y presión parcial de N₂ de 0.78 Atm; esto gracias a la acción combinada del complejo enzimático de la nitrogenasa [23].



3.6. Bioprospección

La bioprospección o prospección de la biodiversidad, se define como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que poseen un valor económico actual o potencial, y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica [40]. La bioprospección se perfila como un proceso que involucra tres etapas: investigar, transformar en producto y comercializar. Para avanzar en dicho proceso en el país se requiere preferiblemente del trabajo conjunto de los sectores

académico, empresarial nacional o internacional, comunitario y gubernamental [40]. La bioprospección es una práctica que, si bien puede considerarse antigua, durante los últimos veinte años ha adquirido un margen de actualidad extraordinario, debido a los avances tecnológicos que se han dado en farmacéutica, biotecnología y agricultura. Lo anterior ha permitido descifrar gran parte de la fisiología de los seres vivos, con el objetivo de explorar la potencialidad de las llamadas sustancias bioactivas y la opción de encontrar en ellas la solución a importantes problemas de salud [40].

En Colombia los estudios de bioprospección en microbiología han estado principalmente orientados hacia la producción de bioinsumos agrícolas, biorremediación, diagnóstico y aplicaciones en salud animal, vegetal y humana, algunos estudios en ecología microbiana y aplicaciones a nivel industrial, entre otros [41]. La gran mayoría de investigaciones obtienen financiación a través de proyectos cuyo desarrollo se da principalmente en universidades e institutos de investigación, observando que se hace énfasis en investigación básica; las etapas de desarrollo tecnológico y de producción están dadas primordialmente en empresas privadas, o como resultado de la alianza entre grupos de investigación básica y socios inversionistas [40].

4.1. Objetivo general

- Adaptación de un inóculo proveniente de reactor biológico fijador de nitrógeno para la generación de electricidad en celdas de combustibles microbianas.

4.2. Objetivos específicos

- Enriquecer y Obtener un inóculo adaptado para la fijación de nitrógeno, en un reactor biológico.
- Determinar las condiciones de máxima producción de potencia de un inóculo fijador de nitrógeno en una celda de combustible microbiana.
- Caracterizar microbiológicamente la biopelícula desarrollada en el ánodo de las celdas de combustibles microbianas.

4.3. Hipótesis

- Consorcios especializados en la fijación de nitrógeno producirán mayor potencia en una celda de combustible microbiana que un inóculo de lodos residuales indiferenciado.

5.1. Selección de inóculo

(**Inóculo RFN**). Se tomaron 250 mL de un inóculo proveniente de un reactor biológico en operación en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología del grupo GAOX. Este reactor llevaba en operación 1 año y las condiciones de operación fueron las mismas utilizadas para el presente estudio (ver Tabla 5.2). Los microorganismos presentes en ese inóculo ya estaban seleccionados y preadaptados para la fijación de nitrógeno.

(**Inóculo RNoF**). Por otra parte, se tomó 1 L de muestra de lodo proveniente de una laguna anaerobia de un sistema de tratamiento de agua residual industrial, que recibe como afluentes residuos líquidos de una industria productora de alimentos derivados del azúcar. La toma del inóculo fue en mezcla completa y fue llevado conforme a lo recomendado por el Standard Methods [42] al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad del Valle para su uso.

5.2. Montaje y operación de reactores

Estos dos inóculos fueron utilizados para montar dos reactores: **1)** Reactor Fijador de Nitrógeno (RFN) y **2)** Reactor No Fijador de Nitrógeno (RNoF). La operación de los reactores fue de tipo SBR (Sequencing Batch Reactor) [43] y su operación consistió en ciclos repetitivos de las siguientes fases:

- **Alimentación:** Se alimentó el reactor con medio fresco de composición detallada en la Tabla 5.1
- **Reacción. Fase Aerobia:** Por un periodo de 48 h el reactor estuvo en mezcla completa y aireación.
- **Reacción. Fase Anaerobia:** Durante 15 min se burbujeó el reactor con una mezcla de CO_2/N_2 para desplazar el O_2 y se dejó por 24 h el reactor sin aireación. Esta etapa del ciclo de operación se utilizó como medida para el control de la presencia de protozoos dentro de los reactores.
- **Sedimentación:** Se retiró el sobrenadante del reactor y se llenó nuevamente con medio fresco y así se repite ciclo. El sobrenadante fue utilizado para las mediciones fisicoquímicas de control de estabilidad del reactor.

Los reactores consistieron en recipientes de vidrio de 1 L. Las condiciones de operación de los reactores se detallan en la Tabla 5.2.

Cuadro 5.1: Composición del medio nutriente que se utilizó en el Reactor Fijador de Nitrógeno (RFN) y No Fijador de Nitrógeno (RNoF).

Compuesto	RFN Cantidad	RNoF Cantidad
Solución A*		
KH ₂ PO ₄	0,100 g	0,100 g
K ₂ HPO ₄	0,900 g	0,900 g
NaCl	0,100 g	0,100 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,100 g	0,100 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,100 g	0,100 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005 g	0,005 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,005 g	0,005 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,010 g	0,010 g
Solución B	50,000 mL	50,000 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,000	0,725 g
Solución B**		
Sacarosa	2,000 g	2,000 g
Piruvato de Sodio	1,000 g	1,000 g
Manitol	2,000 g	2,000 g
Glucosa	2,000 g	2,000 g

*Cantidad para preparar 1,0 L de medio

**Cantidad para preparar 50 mL de solución

Cuadro 5.2: Condiciones de operación de los reactores para obtención de fijadores de nitrógeno.

Parametro	Valor	Unidad
Volumen inóculo	250	mL
Volumen de Medio Nutriente	500	mL
Volumen útil	750	mL
Tiempo Mezcla Aerobia	48	h
Tiempo Mezcla Anaerobia	24	h
Sedimentación	2	h
Aireación	10	L.min aire

5.2.1. Seguimiento del reactor

Durante el tiempo de operación de los reactores se realizó el seguimiento de parámetros como pH, amonio, y biomasa al final de cada ciclo. Se tomó muestra al final de la etapa de enriquecimiento de los reactores para caracterización microbiológica del inóculo mediante técnicas de biología molecular (extracción de ADN, DGGE y secuenciación). Una vez que había exceso de biomasa (<250 mL) se retiraba del reactor y se almacena a temperatura ambiente. Esta biomasa fue utilizada como el inóculo para las CCM.

5.3. Generación de electricidad en Celdas de Combustible Microbianas

Para seleccionar las mejores condiciones de producción de electricidad se realizó un diseño experimental factorial 2x3 con dos repeticiones. La unidad experimental fue una CCM de 300 mL y la variable de respuesta fueron densidad de corriente ($\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$), voltaje de la biocelda (mV) y potencia ($\text{mW}.\text{cm}^{-2}$). Los factores y niveles del diseño experimental fueron:

- **Factor 1:** Tipo de superficie de adherencia en el ánodo: (1) Etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), (2) Etilendiamina ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$) y (3) Ácido Oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$)
- **Factor 2:** Tipo de inóculo: (1) Biomasa provenientes del Reactor fijador de nitrógeno (RFN) y (2) Biomasa proveniente del reactor no fijador de nitrógeno (RNoF).

5.3.1. Montaje de la unidad experimental (CCM)

Se utilizó CCM de 300 mL como unidad experimental. La CCM tuvo electrodos de grafito comercial (Soldarco) cubiertos superficialmente con platino ($0,11 \text{ mg Pt}.\text{cm}^{-2}$). La membrana selectiva de protones fué Nafion®. La Figura 5.1 muestra el esquema general de la CCM que fue utilizada en el diseño experimental. La Tabla 5.3.1 muestra los parámetros de operación y construcción de las biocelda.

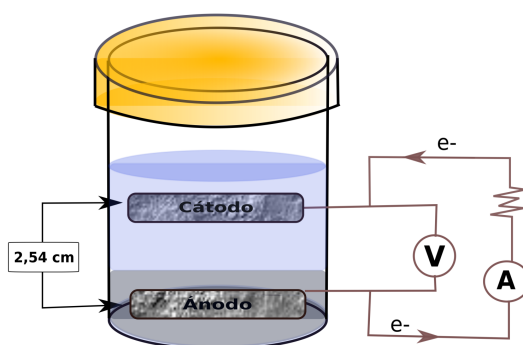


Figura 5.1: Esquema general de la unidad experimental (CCM).

Cuadro 5.3: Parámetros de operación y construcción de las bioceldas (valores por biocelda).

Parámetro	Valor	Unidad
Área anódica	62,05	cm^2
Área catódica	59,83	cm^2
Diámetro ánodo	0,95	cm
Diámetro cátodo	0,79	cm
Cantidad catalizador	0,11	$\text{mg Pt}.\text{cm}^{-2}$

Tratamiento ánodos. Con el propósito de observar la adherencia de los microorganismos a la superficie del ánodo se realizaron modificaciones químicas a las mismas que consistieron

en grupos funcionales alcohol (Etilenglicol, $C_2H_6O_2$), amino (Etilendiamina, $C_2H_8N_2$), y ácido (Ácido Oxálico, $C_2H_2O_4$). Los ánodos de las bioceldas fueron sometidos a dos tipos de tratamiento térmico y químico:

1. El tratamiento térmico consistió en exponer los ánodos a 450 °C por 1 h.
2. El tratamiento químico consistió en exponer los ánodos en soluciones de Etilenglicol ($C_2H_6O_2$), Ácido Oxálico ($C_2H_2O_4$) y Etilendiamina ($C_2H_8N_2$) 0,1 M durante 6 horas.

Llenado de las bioceldas: Las bioceldas fueron llenadas con 100 mL de inóculo almacenado. Después de que se asentara la biomasa se completó el volumen de la biocelda con 200 mL de medio líquido con cuidado de no resuspender la biomasa. El medio líquido utilizado fue el mismo utilizado para la alimentación de los reactores. Una vez llenadas las bioceldas con el inóculo y el medio líquido se cubrió con aluminio para evitar cualquier perturbación o contaminación.

5.3.2. Seguimiento de la unidad experimental

Las variables de respuesta fueron densidad de corriente ($\mu A.m^{-2}$), voltaje de la biocelda (mV) y potencia ($mW.m^{-2}$). Se tomó registro del voltaje (mV) cada 24 horas. Una vez que las bioceldas registraron valores positivos de voltaje, se realizaron las curvas de polarización para observar la eficiencia eléctrica global de cada celda en aquellos días donde se registró el mayor voltaje.

Para tomar los datos eléctricos (mV y μA) sin perturbar el sistema, se elaboró una placa electrónica que estuvo conectada a la biocelda. En la placa se anclaron los conectores para medir corriente y voltaje. Se agregaron a la placa resistencias de 1 Ω , 100 Ω , 500 Ω 1 k Ω y 5 k Ω . Esto permitió la medición de las variables eléctricas y la elaboración de las curvas de polarización.

5.3.3. Análisis de la información

Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) para encontrar si existen diferencias significativas en las variables experimentales. Se realizaron pruebas pos-ANOVA para encontrar la combinación Tratamiento-Inóculo que generó la mayor electricidad.

h_0 = No hay variaciones significativas en las variables experimentales

$$u_1 = u_2; b_1 = b_2$$

h_1 = Si hay variaciones significativas en las variables experimentales

$$u_1 \neq u_2; b_1 \neq b_2$$

5.4. Análisis microbiológico

Se realizaron pruebas de cultivabilidad y análisis de diversidad del gen 16S de ADNr y *nifH* de la biopelícula desarrollada en los ánodos en las bioceldas.

5.4.1. Pruebas de Cultivabilidad

Se realizaron conteos estimados de microorganismos por medio de cultivabilidad de la biopelícula del ánodo de las bioceldas. Para ello se realizó un raspado de la biopelícula y se realizaron diluciones en solución salina (0,85 % de NaCl). Se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en los medios de cultivo selectivos EMB (por sus siglas en inglés, *Eosin methyl Blue*), Cetrimide, Enterococcosel y Salado manitol. Estos medios de cultivo permiten el recuento de Enterobacterias, Pseudomonas, Enterococos, Estafilococos Respectivamente.

5.4.2. Extracción de ADN, PCR y Secuenciación

Extracción de ADN. Se realizó un raspado de la biopelícula del ánodo de las bioceldas y se diluyó en etanol para una concentración final de 70 %. Se adicionó 500 uL de muestra en un tubo eppendorf que contenía 1000 uL de buffer de lisis (Tris 100 mM, EDTA 200 mM, NaCl 1,5 M, CTAB 1 % y SDS 2 %). Las células fueron mecánicamente destruidas utilizando Vortex por 1 min e incubación por 30 min a 70 °C en oscuridad. La muestra fue centrifugada a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf que contenía 1000 uL de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1). La muestra lisada fue mezclada por 30 s y centrifugada a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo que contenía 1000 uL de Cloroformo:Isoamílico (24:1) que se mezcló por 30 s y se centrifugó a 13000 por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 100 uL de Acetato de Sodio (3 M) y 600 uL de Isopropanol, se incubó a -20 °C por 30 min. Esta mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 uL de etanol (70 % y 4 °C). Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min, se retiró el sobrenadante y se incubó la muestra a 65 °C por 30 min. El ADN se resuspendió en 100 uL de buffer TE. La cuantificación del ADN se realizó en un Nanodrop Thermo scientific 2000.

PCR. Se amplificó la región V1-V4 del gen **16S Ribosomal**. Se utilizaron los primers 27F/519R (primers universales para bacterias generales). Se utilizaron los reactivos HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) para la reacción de PCR. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 30 ciclos de 94 °C por 3 min, 94 °C por 30 s, 53 °C por 40 s, 72 °C por 1 min y con una elongación final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados utilizando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) siguiendo las condiciones del fabricante. La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo en gel de 2 % de agarosa con bromuro de etidio.

También, se realizó la amplificación del gen *nifH*. Este gen se ha reportado como el marcador por excelencia para detectar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno [44]. La amplificación del gen *nifH* se realizó mediante PCR convencional. Para ello, se usó una combinación de primers PolF y PolR [44]. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Precalentamiento 95 °C 5 min, Denaturación 94 °C 30 s, Hibridación 54 °C 30 s, Extensión 72 °C 30 s, Extensión final 72 °C 10 min. La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo en gel de agarosa 0,8 % con bromuro de etidio.

DGGE. Se llevó a cabo la técnica Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) para evaluar la diversidad bacterias fijadoras de nitrógeno en las bioceldas. Se realizó una PCR anidada a partir de los productos de PCR convencional con el propósito

de añadir la cadena de nucleótidos GC. Se implementó la combinación de primers PolF-GC y PolR. Las condiciones de reacción fueron las mismas utilizadas para la PCR convencional del gen *nifH*. Se llevó a cabo la electroforesis vertical en geles de acrilamida de 8% con un gradiente de desnaturalización de 40 a 70% utilizando Buffer TAE 1X. La corrida tuvo una duración de 16 h a 100 V y 60 °C. La revelación del gel se realizó por medio de exposición en una solución fijadora por 20 min, solución de nitrato de plata de 0.016% por 30 min y finalmente en una solución reveladora agitando suave y constantemente por 15 min hasta la aparición de las bandas. El gel se visualizó en un transiluminador de luz blanca.

Secuenciación ADN. Se utilizaron los productos de PCR de 16S ADNr para preparar la librería de ADN siguiendo el protocolo de Illumina MiSeq. La secuenciación fue realizada por el Laboratorio MRDNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) con la plataforma Illumina MiSeq siguiendo las indicaciones

5.4.3. Análisis resultados de secuenciación

Los resultados de la secuenciación fueron procesados utilizando el software libre QIIME 1.9.0 (<http://qiime.org/>). Se tomó en cuenta las lecturas de secuencias con un valor de *q* mayor a 25. Posteriormente se removió la plantilla (barcode), el primer y se descartaron las quimeras. Las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) fueron definidas por agrupamiento de 97% de similaridad (3% divergencia) y cada OTU fue comparado con la base de datos para la asignación taxonómica. La base de datos de comparación utilizada fue (<https://www.arb-silva.de/>), actualizada 2018. Se realizaron análisis de alpha y beta diversidad. Se realizó la asociación de las funciones microbianas mediante la comparación entre las bacterias encontradas y las bases de datos de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>).

6.1. Obtención de inóculo fijador de nitrógeno para las Bioceldas

Se utilizó un inóculo proveniente de una laguna anaerobia que trata efluentes líquidos de una industria productora de alimentos derivados de azúcar para el montaje de un reactor tipo SBR [43]. Cada ciclo de operación duró 72 horas. Se realizó seguimiento de pH durante el tiempo de operación de los reactores el cual fue de 104 días. El pH al final de cada ciclo de los RFN y RNoF osciló entre 7.60 ± 2.44 UND y 6.10 ± 1.67 UND respectivamente. A continuación (Figura 6.1) se muestra la concentración de Biomasa y NH_4^+ durante 48 h de operación de un ciclo de los reactores. Estos datos fueron tomados al final del la fase de operación de los reactores, es decir, el último ciclo de operación.

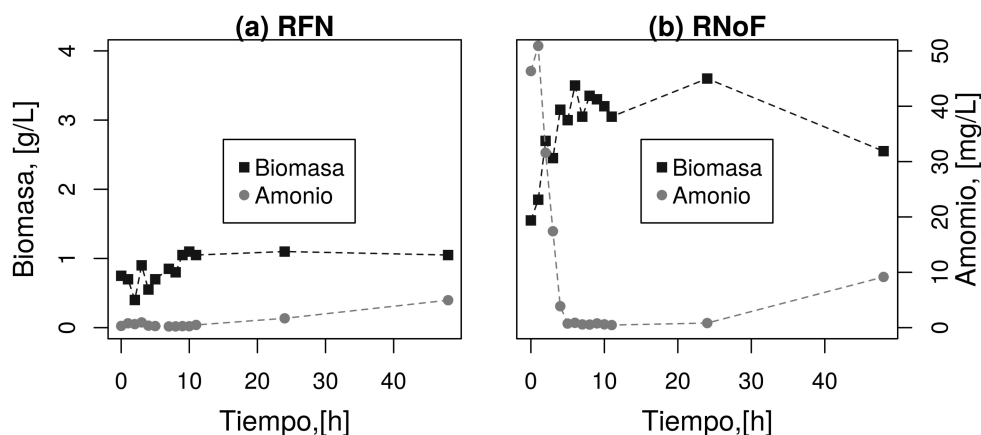


Figura 6.1: Variación de las concentraciones de Biomasa (g.L^{-1}) y Amonio (mg.L^{-1}) de los reactores durante el último ciclo de operación de 48 horas. (a) Reactor Fijador de Nitrógeno (RFN) y (b) Reactor No Fijador de nitrógeno (RNoF).

Según los resultados anteriores, los reactores alcanzan una fase estacionaria aproximadamente a las 10 horas de operación. Se utilizó el pH como medida de control de estabilidad de los reactores. Una vez que había exceso de biomasa (<250 mL), este exceso era retirado del reactor y almacenado a temperatura ambiente. Esta biomasa fue utilizada como el inóculo para las CCM. El inóculo utilizado para montar el reactor RFN (Fijador de Nitrógeno) proviene de un reactor biológico alimentado y operado bajo las mismas condiciones del presente estudio, siendo que este reactor estuvo en operación durante 1 año. Los microorganismos presentes en ese inóculo estaban seleccionados y preadaptados para la fijación de nitrógeno.

6.2. Diseño experimental y montaje de las CCM

Terminado el tiempo de operación de los RFN y RNoF, se procedió a la construcción, inoculación y puesta en marcha de las CCM. Los ánodos de las bioceldas fueron sometidos a 3 diferentes tratamientos químicos, para observar la adherencia de los microorganismos a la superficie de los ánodos. Los tratamientos fueron Alcohol OH^- (Etilenglicol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), Amino NH_2^- (Etilendiamina, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$) y Ácido COOH^- (Ácido Oxálico, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$). La operación de las bioceldas duró 95 días, registrando valores de voltaje positivos en algunas bioceldas después de 30 días. En la Figura 6.2 se muestra los valores de voltaje en inglés Close Circuit Potential, (CCP) de las bioceldas que registraron valores positivos de CCP. Los valores negativos de CCP no fueron tenidos en cuenta para en análisis.

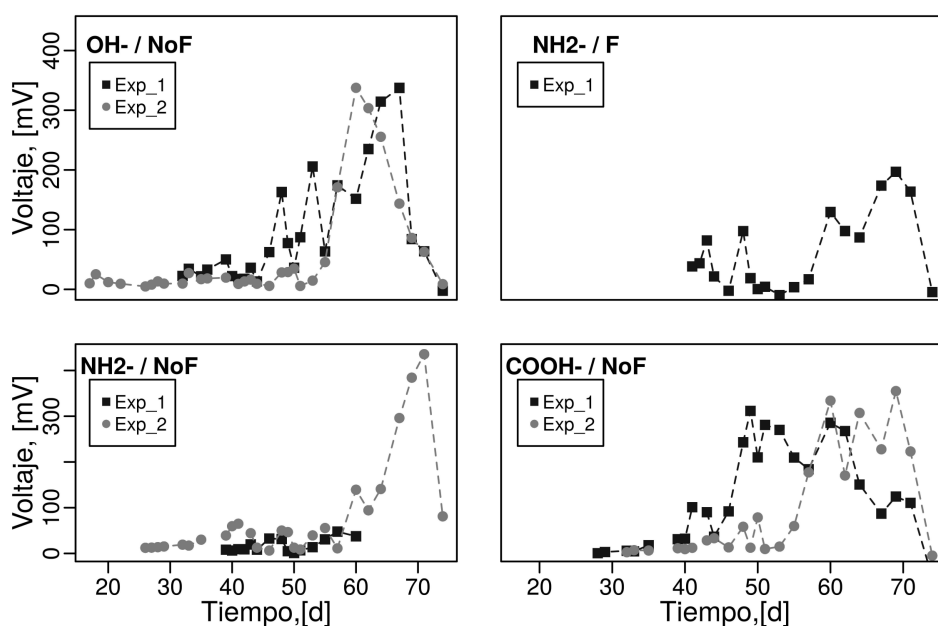


Figura 6.2: Voltaje de la biocelda durante el tiempo de operación. Exp_1 y Exp_2: Replica 1 y 2 respectivamente. Bioceldas tratadas con OH^- : Etilenglicol, NH_2^- : Etilendiamina, COO^- : Ácido Oxálico. F: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador.

Las gráficas anteriores muestran que este tipo de microorganismos requieren 26-41 días para formar la biopelícula en el ánodo y generar valores positivos de voltaje, asociado a la ausencia de oxígeno molecular en el ánodo. De acuerdo a los valores de corriente y voltaje registrados de cada biocelda, la Tabla 6.2 muestra la Potencia y Densidad de corriente máximas alcanzadas por las bioceldas.

Los resultados de densidad de corriente y potencia en las bioceldas indican que no hay diferencias significativas entre el tratamiento de los ánodos. Sin embargo, si existen diferencias significativas entre el inóculo utilizado. Sin embargo, los resultados anteriores muestran que la repetibilidad es baja entre las réplicas de los experimentos, al usar cultivos mixtos (agua

Cuadro 6.1: Potencia y Densidad máxima de Corriente de las bioceldas

Biocelda	Día	Potencia (mW.m ⁻²)	Densidad corriente (mA.m ⁻²)	Resistencia externa (ohm)
NH ₂ ⁻ /F	69	0,6308	0,0045	5000
OH ⁻ /NoF (1)	67	2,0007	0,0081	5000
OH ⁻ /NoF (2)	64	3,0070	0,0188	1000
NH ₂ ⁻ /NoF (1)	70	0,1130	0,0044	500
NH ₂ ⁻ / NoF (2)	61	4,9998	0,0243	1000
COOH ⁻ / NoF (1)	60	1,8558	0,0148	1000
COOH ⁻ / NoF (2)	69	1,7704	0,0146	5000

residual o reactores biológicos) se debe admitir que existe una intrínseca falta de repetibilidad en los experimentos derivados de la gran variabilidad en las comunidades microbianas [45, 46].

6.3. Análisis Microbiológicos de los ánodos

Se realizó un raspado de la biopelícula formada en el ánodo y se realizó pruebas microbiológicas dependientes de cultivo y secuenciación masiva. Para establecer si existe una correlación entre la generación de corriente y la presencia y/o ausencia de ciertos grupos microbianos.

6.3.1. Recuentos microbiológicos

Se realizó recuento en medios de cultivo selectivos. Los medios utilizados fueron EMB, Cetrimide (AC), Enterococcosel (AEC) y Salado Manitol (ASM). La Figura 6.3 muestra los recuentos estimados después de 48 h de incubación a 37 °C. Los medios de cultivo utilizados son específicos para el crecimiento de grupos de Firmicutes (p.e Pseudomonas) y Enterobacterias. Estos grupos bacterianos son los más representativos que han sido reportados como grupos exoelectrogénicos [47]

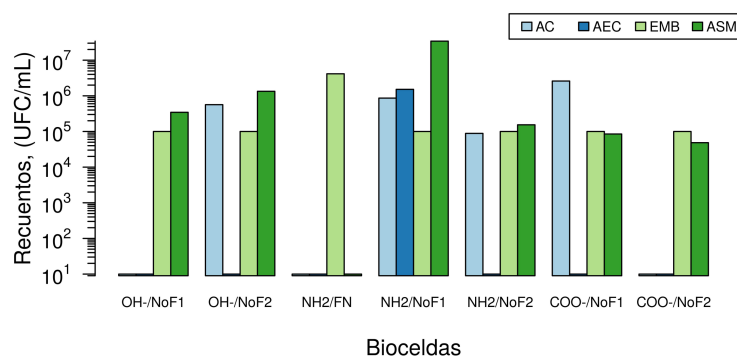


Figura 6.3: Recuentos de UFC en los medios selectivos usados, para las bioceldas que registraron valor positivo de voltaje. Bioceldas tratadas con OH⁻: Etilenglicol, NH₂⁻: Etilendiamina, COO⁻: Ácido Oxálico. FN: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador. Medios de cultivo: AC: Agar Cetrimide, AEC: Agar Enterococcosel, ASM: Agar Salado Manitol.

6.3.2. Diversidad de BFN

Se extrajo el ADN del biofilm de los ánodos de las bioceldas para evidenciar la presencia y diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante DGGE, y reconocer si existen patrones o diferencias en las comunidades de fijadoras de nitrógeno y la producción de electricidad. El control (+) utilizado fue una muestra de ADN que ha amplificado anteriormente el gen *nifH* (datos no mostrados). La Figura 6.4 muestra la revelación del DGGE de la amplificación del gen *nifH* y la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno en las bioceldas.

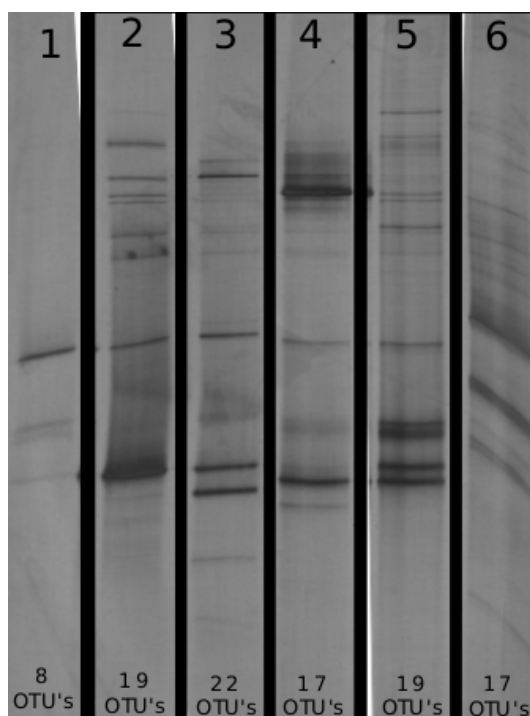


Figura 6.4: Imagen de la separación por electroforesis de las Bacterias fijadoras de nitrógeno en el biofilm de las bioceldas. 1) RFN Tiempo inicial 2) RNoF Tiempo inicial 3) NH_2/FN 4) NH_2/NoF 5) COO^-/NoF 6) OH^-/NoF . Bioceldas tratadas con OH^- : Etilenglicol, NH_2^- : Etilendiamina, COO^- : Ácido Oxálico. FN: inóculo del Reactor Fijador, NoF: inóculo del reactor No Fijador. Los números debajo de la imagen corresponden a la cantidad de OTU's encontrados en cada muestra, según el análisis de imagen.

6.3.3. Diversidad de Bacterias Generales

Se realizó secuenciación de la región V1-V3 (27F-519R) del gen 16S ARNr. Más de 55.000 lecturas válidas fueron obtenidas por cada biocelda mediante el proceso de limpieza y filtro de calidad. El promedio de longitud de secuencia fue de 516.7 pb. Un total de 77,510 unidades taxonómicas operacionales (OTU's) fueron obtenidas, representadas en 20 filos y 478 géneros usando 97 % de identidad como límite de agrupamiento. Los filos más predominantes fueron *Proteobacteria* (50,02 %), *Bacteroidetes* (19,64 %), *Firmicutes* (18,44 %) y *Verrucomicrobia* (2,79 %). Estos grupos microbianos representan el 91,05 % de toda la comunidad. Las clases más dominantes (Figura 6.5) fueron *Alphaproteobacteria* (27,97 %), *Clostridia* (18,18 %),

Betaproteobacteria (14.36 %), *Bacteroida* (11.98 %), *Gammaproteobacteria* (6.70 %) y *Flavobacteriia* (3.47 %).

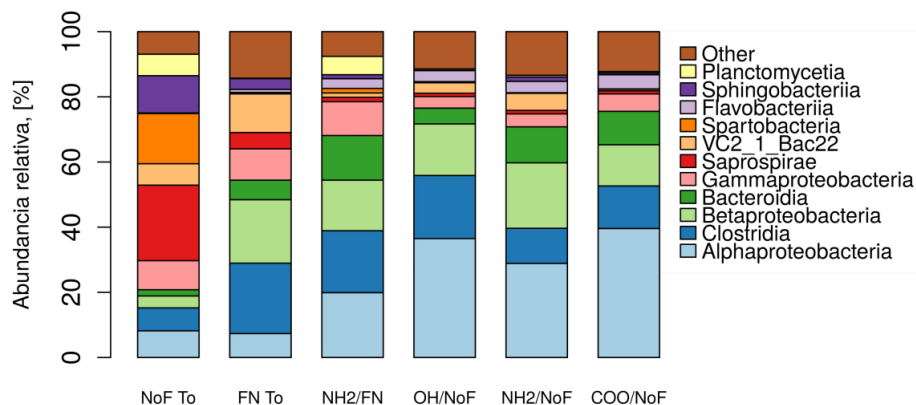


Figura 6.5: Abundancia relativa de las clases predominantes en la biopelícula del ánodo de las CCM.

Se construyeron curvas de rarefacción usando un indicador de diversidad (chao1). Las curvas de rarefacción de las secuencias bacterianas (Figura 6.6) muestran que los OTU's encontrados fueron suficientes para capturar la diversidad de la comunidad en todas las bioceldas analizadas.

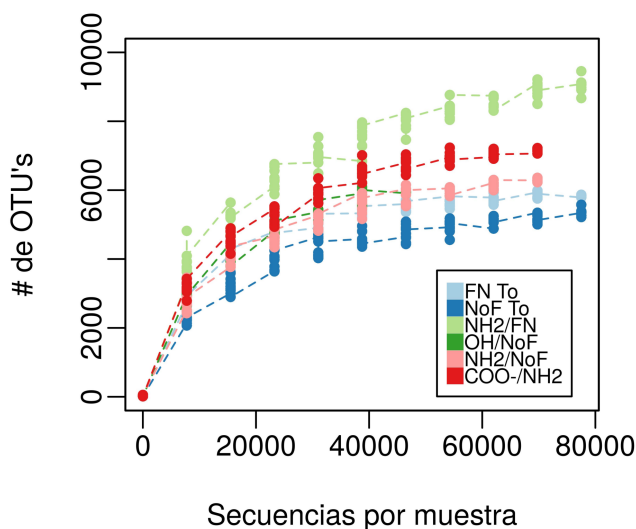


Figura 6.6: Curvas de rarefacción de los OTU's encontrados en los anodos de las bioceldas

Los géneros más predominantes en las bioceldas fueron en promedio *Bacteroides* (7.90 %), *Ruminococcus* (6.63 %), *Azospirillum* (6.36 %), *Brevundimonas* (6.07 %), *Azospira* (5.15 %) y *Clostridium* (4.87 %). Ver Figura 6.7. En el Anexo 1 se recopila la abundancia relativa de los

géneros encontrados en el biofilm de las bioceldas.

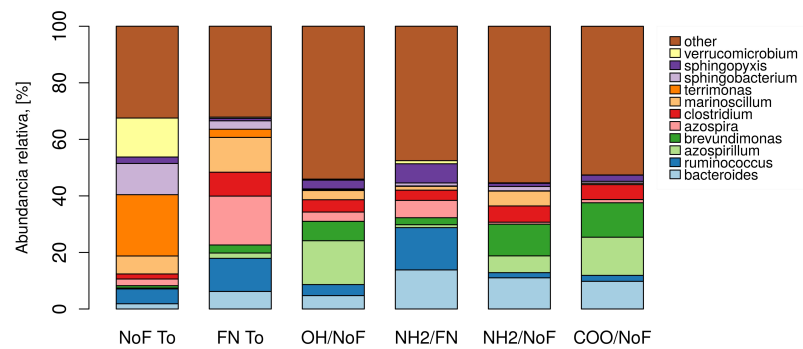


Figura 6.7: Géneros más representativos encontrados en el ánodo de las bioceldas

7.1. Obtención de biomasa para las CCM

Se emplearon reactores biológicos alimentados selectivamente para la obtención de biomasa activa que posteriormente fue utilizada en las CCM. El sustrato utilizado realizó una presión selectiva de las comunidades microbianas presentes en los reactores. Así, el RfN gracias a la ausencia de fuentes de nitrógeno en el sustrato favoreció la presencia y función de las bacterias fijadoras de nitrógeno y el RNoF por su exceso de nitrógeno favorece otras comunidades no fijadoras de nitrógeno. La Figura 6.1 muestra cómo en ambos reactores alcanzan una fase estacionaria aproximadamente a partir de las 10 horas de reacción. La poca cantidad de amonio en el medio del RfN indica que todo el nitrógeno producido vía la ruta anabólica de la fijación de nitrógeno es consumido directamente y distribuido en la cadena trófica. Por otra parte, el cambio de amonio en el medio del RNoF es resultado del consumo en la fase exponencial de crecimiento. Las diferencias en la cantidad de biomasa en los reactores son gracias a la limitación y/o exceso de la fuente de nitrógeno de cada reactor. Así, se obtienen dos tipos de biomasa que alimentados selectivamente favorecen la presencia de ciertos grupos tróficos. Esta biomasa fue el inóculo para posteriormente las CCM.

Dentro de la fase de operación de los reactores fue indispensable implementar una etapa anaerobia en cada ciclo ya que de acuerdo a la procedencia del inóculo hay presencia de protozoos y estos macro-organismos se alimentan de las bacterias presentes en los reactores. Por ello, implementar tiempos de anaerobiosis periódicamente inhibe la proliferación de estos organismos. Esto es importante a considerar ya que es fundamental para la obtención de biomasa en los reactores.

7.2. Generación de electricidad en CCM

Durante los 95 días de operación las bioceldas con el ánodo sometidas al tratamiento con etilenglicol (OH^-) y ácido oxálico (COOH^-) en presencia de inóculo fijador de nitrógeno (RfN) registraron valores negativos de CCP (datos no mostrados) y después de 50 días de operación se desmontaron. Las bioceldas con el ánodo tratadas con Etilenglicol (OH^-) y Ácido oxálico (COOH^-) con el inóculo RNoF, mostraron una potencia máxima generada de 3.01 mW.m^{-2} y 1.86 mW.m^{-2} respectivamente. Cabe resaltar que las bioceldas tratadas con (NH_2^-) e inóculo RfN fueron las únicas que registraron valores positivos de CCP con una potencia máxima de 0.63 mW.m^{-2} . Estudios recientes han reportado que hacer uso de tratamientos químicos y/o térmicos en la superficie de los ánodos aumenta un 39.5% la generación de corriente [11, 14]. Estos tratamientos se basan en el incremento de la superficie del ánodo facilitando la formación de la biopelícula de las bacterias electrogénicas, la transferencia del electrón y por consiguiente el aumento de la generación de corriente. Sin embargo los mecanismos que afectan directamente el rendimiento todavía no son muy establecidos [48]. La potencia má-

xima generada 5.0 mW.m^{-2} fue de la biocelda tratada con (NH_2^-) y con el inóculo RNoF. En Latinoamérica (Scielo.org), no se han reportado niveles significativamente más altos de generación de Potencia para este tipo de sistemas [49, 50].

Se ha reportado que tratamientos químicos con ácidos (COOH^-) o alcoholes (OH^-) incorporan grupos funcionales derivados del oxígeno como carboxílicos, carbonilos, hidroxilos que contribuyen a la transferencia de electrones [48]. Los grupos funcionales que contienen grupos carboxilos (COO^-) favorecen la formación de puentes de hidrógeno con cadenas peptídicas en los citocromos o cadenas transportadoras de electrones de las bacterias, favoreciendo así la transferencia del electrón de la bacteria al ánodo [11]. Los análisis de varianza ANOVA indicaron que no hay diferencias significativas ($pvalue=0.7115$) entre los tratamientos realizados a los ánodos de las bioceldas. Los grupos funcionales derivados de nitrógeno u oxígeno pueden contribuir a la transferencia de electrones y la unión bacteriana se da en función de su carga al pH del medio. El efecto del tratamiento químico sobre la superficie de los electrodos es sinérgico, las cargas positivas atraen las bacterias cargadas negativamente [51], es decir atraen los electrones generados por la oxidación de las diferentes fuentes de carbono.

Por otra parte, se encontró existen diferencias significativas ($pvalue=0.0178$) entre el tipo de inóculo. La combinación de Inóculo-Tratamiento de los ánodos no genera un efecto significativo en la generación de corriente ($pvalue=0.7115$). Las diferencias de la generación de potencia y densidad de corriente entre las bioceldas son gracias a los microorganismos adheridos a los ánodos y por consiguiente de la procedencia del inóculo. Los microorganismos presentes en el inóculo preadaptado para la fijación de nitrógeno, han sido previamente seleccionados para un metabolismo específico y probablemente se han perdido otros tipos de microorganismos exoelectrogénicos más eficientes. Adicionalmente estas comunidades sugieren que no desarrollaron mecanismos de adherencia al ánodo [52] y con ello menor cantidad de corriente. Sin embargo, ya que el inóculo no seleccionado para la fijación de nitrógeno (RNoF) permitió la presencia de microorganismos fijadores y no fijadores de nitrógeno, es probable que la presencia de otros grupos permitiera una mayor abundancia de organismos exoelectrogénicos.

7.3. Recuentos microbiológicos

Según los análisis de varianza, no hay diferencias significativas en los conteos realizados para cada medio selectivo utilizado y las bioceldas. Sin embargo se pueden observar algunas diferencias entre los conteos realizados de cada medio de cultivo (Figura 6.3). No se observó conteo del género *Enterococcus* (Agar Enterococcusel) en la mayoría de las bioceldas, solo se encontró recuento (2×10^6) en la biocelda NH_2/NoF (Etilendiamina/Inóculo del reactor No Fijador). Unos de los grupos microbianos que han sido reportados como exoelectrogénicos son del filo *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Siendo *Proteobacteria* el filo más importante de bacterias exoelectrogénicas [53]. Los recuentos reflejan una mayor presencia de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* (Agar EMB) en todas las bioceldas. Por otra parte, aunque el género *Pseudomonas* se ha reportado como exoelectrogénico, no es de los más importantes en estos sistemas. Los recuentos encontrados en la biocelda NH_2/FN (Etilendiamina / Inóculo del reactor fijador) sugieren que la presencia de *Pseudomonas* y *Enterococcus* podrían estar asociados a la baja cantidad de corriente generada, reflejando que los grupos de Enterobacterias son los más importantes dentro del sistema.

Sin embargo, el género *Estafilococos* (Agar Salado Manitol) perteneciente al filo de *Firmicutes* aparece en casi todas las bioceldas y se mantiene relativamente constante. Indicando que las diferencias encontradas en la generación de electricidad entre las bioceldas no son asociadas directamente a la presencia de *Estafilococos*. La mayor representatividad de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) está en los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* [54]. Los recuentos indican una mayor presencia de *Proteobacteria* y *Firmicutes* y sugieren que las BFN presentes en los inóculos están directamente involucradas en la generación de corriente. La biocelda que generó la mayor cantidad de corriente (NH_2/NoF , $5.0 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) fue la que se encontró recuento de todos los medios utilizados. Esto sugiere que la presencia de diferentes grupos microbianos propicia una interacción sinérgica, siendo *Proteobacteria* y *Firmicutes* los filos más involucrados en la generación de electricidad y en los que tiene mayor presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno.

7.4. Diversidad de BFN

La estructura de la comunidad microbiana en el ánodo de las CCM sometidas a diferentes tratamientos fue determinada usando análisis de DGGE al final de la operación de las bioceldas. La Figura 6.4 muestra los perfiles de los microorganismos de los inóculos originales y la biopelícula adherida al ánodo en las 4 bioceldas que presentaron la mayor generación de corriente. El análisis de los fragmentos de ADN (bandas) de DGGE fue realizado usando el software libre GelQuest (<https://www.sequentix.de/gelquest/>). Cada banda del DGGE representa una especie o especies relacionadas en la comunidad microbiana (OTU's) y la intensidad de la banda representa la “abundancia relativa” de cada especie.

La diversidad de BFN presentes en los inóculos (tiempo inicial, T_0) y biopelícula adherida al ánodo (tiempo final, T_f) muestran una alta diversidad. El inóculo proveniente del reactor fijador de nitrógeno aunque la diversidad es menor seleccionó solo 8 OTU's, mientras que en el inóculo proveniente del reactor no fijador permitió la presencia de más grupos de BFN (19 OTU's). No existen diferencias significativas en la diversidad total de BFN. Sin embargo, se pueden observar diferencias en las bioceldas. La biocelda NH_2^-/NoF favoreció la presencia de más BFN (22 OTU's) comparado con el inóculo del reactor FN (8 OTU's). Aunque las bioceldas donde se generó la mayor cantidad de corriente provienen del inóculo del reactor que no está adaptado para la fijación biológica de nitrógeno (NoF), no desplazó las poblaciones ya existentes de BFN y por el contrario permitió la presencia de más grupos. En las bioceldas se vieron enriquecidas por las condiciones ambientales del sistema (altas concentraciones de fuente de carbono y ausencia de oxígeno atmosférico). Los resultados anteriores muestran la alta diversidad de BFN adheridos al ánodo de las bioceldas que están asociadas a la generación de electricidad.

7.5. Análisis de los resultados de secuenciación

Los filos más predominantes fueron *Proteobacteria* (50,02%), *Bacteroidetes* (19,64%), *Firmicutes* (18,44%) y *Verrucomicrobia* (2,79%). Siendo *Proteobacteria* y *Firmicutes* los filos más importantes que se han reportado como exoelectrogénicos. Los filos *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia* no se han asociado con la capacidad de generación de electricidad. Sin embargo, los

filos más predominantes presentes en las bioceldas representan el 68.46 % de microorganismos exoelectrogénicos y el 88.43 % se han reportado como BFN. De acuerdo a los resultados de análisis de diversidad microbiana presentes en las bioceldas (Figura 6.5) las clases más predominantes fueron *Alphaproteobacteria* (27.97 %), *Clostridia* (18.18 %), *Betaproteobacteria* (14.36 %), *Bacteroida* (11.98 %), *Gammaproteobacteria* (6.70 %) y *Flavobacteriia* (3.47 %). Representando el 82.66 % de la comunidad. Las clases Alpha, Beta y Gamma-proteobacteria son conocidas por su gran papel en la producción de electricidad. Adicionalmente la clase Clostridia es un gran referente por la presencia de BFN, lo que sugiere que las bacterias fijadoras y exoelectrogénicas pudieron establecerse y desarrollar una biopelícula que estuviera involucrada en la producción de electricidad.

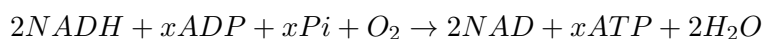
Las curvas de rarefacción bacteriana de cada biocelda muestran que los OTU's encontrados fueron suficientes para capturar la diversidad de la comunidad. El inóculo inicial (provenientes de los reactores) muestra la menor diversidad microbiana. Sin embargo, las bioceldas favorecieron la presencia de nuevos OTU's, siendo las bioceldas tratadas con COO^- y NH_2 las que presentaron una mayor diversidad microbiana. La biocelda que generó la mayor densidad de potencia (NH_2/NoF , $5 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) no fue de las que presentó la mayor cantidad de OTU's. En el ánodo se seleccionaron bacterias que estuvieran involucradas en la generación de electricidad, mientras que en la biocelda NH_2/FN ($0.63 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) aunque presentó la mayor diversidad microbiana, las bacterias establecidas en el ánodo no necesariamente son exoelectrogénicas, y dentro de la red trófica los electrones que son generados por el metabolismo probablemente se depositados sobre aceptores finales alternativos (sulfato, nitrato, entre otros) y el aceptor final es diferente del oxígeno molecular, generando así una disminución significativa de la producción de electricidad [55]. Dentro de la comunidad microbiana establecida en el ánodo, existen bacterias electroquímicamente activas que transfieren los electrones directamente al ánodo a través de proteínas de membrana como los citocromos tipo c, o de conductos proteicos denominados pili que sirven como nanoconductores. Otras bacterias que no pueden hacerlo debido a la naturaleza no conductiva de su membrana celular, requieren de mediadores de electrones exógenos o endógenos [3].

Los géneros más representativos encontrados en las bioceldas fueron Bacteroides (9.84 %), Azospirillum (8.99 %), Brevundimonas (8.18 %), Ruminococcus (5.70 %), Clostridium (4.75 %), Acidovorax (3.63 %) y Alcaligenes (3.38 %). Estos géneros adicionalmente han sido reportados como fijadores de nitrógeno. Del total de las especies encontradas en las bioceldas (757 OTU's) el 27.08 % corresponden a bacterias fijadoras de nitrógeno según las bases de datos consultadas (Uniprot, 2018). De estos géneros, en promedio representan el 57.09 % de la comunidad microbiana. Es decir, más de la mitad de toda diversidad encontrada en las bioceldas son poblaciones de BFN. Los géneros más abundantes presentes en las bioceldas que corresponden a BFN son Bacteroides, Azospirillum, Brevundimonas, Ruminococcus y Clostridium.

Los resultados anteriores dan una señal de que la presencia de BFN en la biopelícula del ánodo de las bioceldas están fuertemente asociadas a la generación de electricidad y gracias a la presencia de estas comunidades microbianas se obtuvieron hasta $5 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ de densidad de potencia. De los grupos microbianos más representativos en la biocelda que se generó mayor densidad de potencia (NH_2/NoF , $5 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) el 43.32 % son BFN, mientras que en la biocelda con la menor generación de corriente (NH_2/FN , $0.63 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$) el 22.30 % son BFN.

Es de anotar que a pesar de la representatividad de los grupos fijadores de Nitrógeno suponemos que el metabolismo energético es el que representó la diferencia más importante. Ambos inóculos el adaptado para la fijación tanto como el que no lo fué, se alimentaron con medio el mismo medio, el primero libre de Nitrógeno (C/N=>50) y el otro enriquecido con Carbono y Nitrógeno (C/N=16). En estas condiciones esperaríamos que el metabolismo asociado al Nitrógeno predominante en el carente de Nitrógeno sea el anabólico. La reducción del nitrógeno atmosférico es un proceso complejo que requiere un gran aporte de energía para que se dé. La molécula de nitrógeno está compuesta de dos átomos de nitrógeno unidos por un enlace triple covalente, lo que hace a la molécula altamente inerte y no reactiva. La Nitrogenasa cataliza la ruptura de este enlace y la adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno [23].

Estos organismos obtienen esta energía (electrones) mediante la oxidación de moléculas orgánicas, muchas de ellas presentes en las células. Los microorganismos que fijan el nitrógeno requieren 16 moles de trifosfato de adenosina (ATP) para reducir cada mol de nitrógeno [23]. Estos mecanismos metabólicos, dejarían de esta forma pocos electrones y protones libres que se se transporten hacia el exterior de la célula, disponibles para generar electricidad. Por el contrario cuando se adiciona Nitrógeno se favorecen otros tipos de metabolismos como lo es la nitrificación y desnitrificación [56]. Tanto la Nitrificación como la desnitrificación son procesos complejos que le permiten a células obtener energía en forma de ATP. Estos procesos se dan generalmente usando el mecanismo de transporte de electrones a través de la membrana y propiciando un flujo de protones hacia el periplasma. Para el caso de las bioceldas la reducción del final del proceso es reemplazada por el transporte de los electrones desde el ánodo. La ecuación completa de este metabolismo es:



Sin embargo en términos generales en una CCM la producción de energía, a escala de laboratorio es muy baja, no obstante, en algunos trabajos se describen aplicaciones asociadas a sistemas electrónicos de bajo consumo [3]. En este orden de ideas, la perspectiva es experimentar con otras arquitecturas de celda y otros escenarios que involucren grandes volúmenes de materia orgánica [18], con lo que se esperaría mayores niveles de densidad de potencia. Esta aseveración aplica para muchos estudios realizados en otros sustratos y generalmente es aceptado entre los grupos investigadores, que el incremento en la concentración del sustrato aumenta la producción de energía en la CCM [1]. No obstante, también se ha reportado en diversos estudios, que la concentración del sustrato al igual que la diversidad del sustrato disponible en solución, podría generar en comunidades microbianas mixtas, la competencia entre bacterias electrogénicas y no electrogénicas, en detrimento de la producción de energía. Las bacterias reductoras de metales, como aquellas pertenecientes a las familias *Shewanella*, *Rhodoferraz* y *Geobacter* son bastante comunes en experimentos en CCM's, ya que estas pueden emplear el ánodo como el aceptor final de electrones [3], sin embargo no fueron las más representativas en el presente estudio.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

En el presente estudio se realizó la operación y puesta en marcha de celdas de combustible microbianas con el objetivo de mostrar la adaptación de bacterias fijadoras de nitrógeno presente en inóculos favorecen la generación de corriente. Los tratamientos realizados a los ánodos de las bioceldas no influyeron de manera significativa en el desarrollo de la biopelícula y por consiguiente en la generación de corriente. Sin embargo, la fuente de inóculo utilizado en las bioceldas sí generó una diferencia en la densidad de potencia generada. Las Bacterias Fijadoras de Nitrógeno presentes en los inóculos se enriquecieron y fueron capaces de formar una biopelícula en el ánodo y establecer una comunidad microbiana de microorganismos exoelectrogénicos. Se alcanzó a generar 5 mW.m^{-2} en la biocelda tratada con Etilendiamina e inóculo proveniente del reactor No fijador de nitrógeno. En esta biocelda la proporción de bacterias Fijadoras de Nitrógeno en el ánodo fue de 42.32 % lo que sugiere que la producción de electricidad se vio favorecida por la presencia de estos microorganismos.

8.2. Recomendaciones

En futuras perspectivas, es bien establecido el papel que juegan los microorganismos en la generación de corriente y como esta se ve afectado con las interacciones microbianas presentes en el ánodo. Por ello es importante enfocar la atención en un mecanismo de acción y realizar un seguimiento conforme se desarrolla la biopelícula, cuales organismos están directamente involucrados en el generación de corriente y observar si la fuente de microorganismos es un potencial inóculo para la generación de corriente. Es fundamental la presencia de microorganismos reductores de metales, como aquellas pertenecientes a los géneros *Shewanella*, *Rhodoferrax* y *Geobacter*. Estos microorganismos son ampliamente conocidos por su gran capacidad de generar corriente y se podrían potenciar las generaciones con la presencia de estos grupos microbianos.

Cabe resaltar que el presente trabajo es una aproximación al uso de microorganismos enriquecidos en reactores biológicos que han sido alimentados para seleccionar un tipo de comunidad microbiana de interés como alternativa de bioprospección en la generación de electricidad. Aunque no se evaluó la producción de la producción de un subproducto de valor agregado.

8.2.1. Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del grupo de investigación GAOX y LEAS de la Universidad del Valle. Gracias al grupo LEAS por el apoyo en la gestión de reactivos, materiales e insumos de la construcción de bioceldas y acompañamiento en el seguimiento de las mismas. Un agradecimiento especial a los profesores Janeth Sanabria y William Lizcano por el acompañamiento y guía en el proceso de formación. Gracias a Lina Maria Olaya por el

acompañamiento en la construcción y operación de las bioceldas. Gracias al grupo GAOX por todo el apoyo en el desarrollo del presente trabajo. Un especial agradecimiento al laboratorio de Redes y Sistemas Distribuidos (Lascilab) por su apoyo en herramientas computacionales para los análisis bioinformáticos.

References

- [1] Liliana Alzate-Gaviria, Carmen Fuentes-Albarrán, Alberto Álvarez-Gallegos, and P Sebastian. Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo pem. *Interciencia*, 33(7), 2008.
- [2] David Fowler, Mhairi Coyle, Ute Skiba, Mark Sutton, Neil Cape, Stefan Reis, Lucy Sheppard, Alan Jenkins, Bruna Grizzetti, James Galloway, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368(1621):1 – 13, 2013.
- [3] Zhuwei Du, Haoran Li, and Tingyue Gu. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology advances*, 25(5):464–482, 2007.
- [4] Janet Sawin, Freyr Sverrisson, Kristin Seyboth, Rana Adib, Hannah Murdock, Christine Lins, Isobel Edwards, Martin Hullin, Linh Nguyen, Satrio Prillianto, et al. Renewables 2017 global status report. 2013.
- [5] Karina Machado, Robson Seleme, Marcell Maceno, and Izabel Zattar. Carbon footprint in the ethanol feedstocks cultivation–agricultural co2 emission assessment. *Agricultural Systems*, 157:140–145, 2017.
- [6] Paul Roberts. *El fin del petróleo*. Ediciones B Barcelona, 2004.
- [7] Yusuf Bicer, Ibrahim Dincer, Greg Vezina, and Frank Raso. Impact assessment and environmental evaluation of various ammonia production processes. *Environmental management*, 59(5):842–855, 2017.
- [8] N Cherkasov, AO Ibhaden, and P Fitzpatrick. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 90:24–33, 2015.
- [9] Saroj Paramjeet, P Manasa, and Narasimhulu Korrapati. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018.
- [10] Seokheun Choi. Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosensors and Bioelectronics*, 69:8–25, 2015.
- [11] FJ Hernández-Fernández, A De Los Ríos, MJ Salar-García, VM Ortiz-Martínez, LJ Lozano-Blanco, C Godínez, F Tomás-Alonso, and J Quesada-Medina. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. *Fuel Processing Technology*, 138:284–297, 2015.
- [12] Rachnarin Nitisoravut and Roshan Regmi. Plant microbial fuel cells: A promising biosystems engineering. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76:81–89, 2017.

- [13] Bin Hou, Yongyou Hu, and Jian Sun. Performance and microbial diversity of microbial fuel cells coupled with different cathode types during simultaneous azo dye decolorization and electricity generation. *Bioresource technology*, 111:105–110, 2012.
- [14] Abudukeremu Kadier, Yibadatihan Simayi, Mohd Kalil, Peyman Abdessharian, and Aidil Hamid. A review of the substrates used in microbial electrolysis cells (mecs) for producing sustainable and clean hydrogen gas. *Renewable Energy*, 71:466–472, 2014.
- [15] Wen-Wei Li, Han-Qing Yu, and Zhen He. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy & Environmental Science*, 7(3):911–924, 2014.
- [16] Yangyang Yu, Jianqiang Zhao, Sha Wang, Huimin Zhao, Xiaoqian Ding, and Kun Gao. Nitrogen removal and electricity production at a double-chamber microbial fuel cell with cathode nitrite denitrification. *Environmental technology*, 38(24):3093–3101, 2017.
- [17] Hadi Yazdi, Liliana Alzate-Gaviria, and Zhiyong Ren. Pluggable microbial fuel cell stacks for septic wastewater treatment and electricity production. *Bioresource technology*, 180:258–263, 2015.
- [18] Carmen Fuentes-Albarrán, Alexa Del Razo, Katty Juarez, and Alberto Alvarez-Gallegos. Influence of nacl, na₂so₄ and o₂ on power generation from microbial fuel cells with non-catalyzed carbon electrodes and natural inocula. *Solar Energy*, 86(4):1099–1107, 2012.
- [19] Dolly Revelo, Nelson Hurtado, and Jaime Ruiz. 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, 2013.
- [20] Munees Ahemad and Mulugeta Kibret. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1):1–20, 2014.
- [21] C Rodriguez-Gonzalez. Enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. Master’s thesis, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, 2014.
- [22] M Rodriguez-Arias. Biofertilización de nitrógeno en suelos salinos a partir de consorcios microbianos obtenidos de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. Master’s thesis, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, 2014.
- [23] Pan Yu Wong, Ka Yu Cheng, Anna H Kaksonen, David C Sutton, and Maneesha P Ginige. Enrichment of anodophilic nitrogen fixing bacteria in a bioelectrochemical system. *Water research*, 64:73–81, 2014.
- [24] Rana Adib, HE Murdock, F Appavou, A Brown, B Epp, A Leidreiter, C Lins, HE Murdock, E Musolino, K Petrichenko, et al. Renewables 2016 global status report. *Global Status Report RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY (REN21)*, 2016.
- [25] MEN. Colombia una potencia en energías alternativas. <http://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/article-117028.html>, 2017. (Accessed on 07/17/2017).

- [26] Peter Bakonyi, László Koók, Enikő Keller, Katalin Belafi-Bako, Tamas Rozsenberszki, Ganesh Dattatraya Saratale, Dinh Nguyen, J Banu, and Nándor Nemestóthy. Development of bioelectrochemical systems using various biogas fermenter effluents as inocula and municipal waste liquor as adapting substrate. *Bioresource technology*, 259:75–82, 2018.
- [27] Michael C Potter. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(571):260–276, 1911.
- [28] Germán Buitrón and Jaime Pérez. Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: efecto de la distancia entre electrodos. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 14(1):05–11, 2011.
- [29] Agathe Paitier, Alexiane Godain, Delina Lyon, Naoufel Haddour, Timothy M Vogel, and Jean-Michel Monier. Microbial fuel cell anodic microbial population dynamics during mfc start-up. *Biosensors and Bioelectronics*, 92:357–363, 2017.
- [30] Antonin PrévotEAU and Korneel Rabaey. Electroactive biofilms for sensing: reflections and perspectives. *ACS sensors*, 2(8):1072–1085, 2017.
- [31] Rachnarin Nitisoravut, Cao Thanh, and Roshan Regmi. Microbial fuel cells: Advances in electrode modifications for improvement of system performance. *International Journal of Green Energy*, 14(8):712–723, 2017.
- [32] Mohammad Khan, Nishat Khan, Saima Sultana, Rajkumar Joshi, Sirajuddin Ahmed, Eileen Yu, Keith Scott, Anees Ahmad, and Mohammad Zain Khan. Bioelectrochemical conversion of waste to energy using microbial fuel cell technology. *Process Biochemistry*, 57:141–158, 2017.
- [33] Zeou Dou, Christy Dykstra, and Spyros Pavlostathis. Bioelectrochemically assisted anaerobic digestion system for biogas upgrading and enhanced methane production. *Science of The Total Environment*, 633:1012–1021, 2018.
- [34] Yan-Rong He, Xiang Xiao, Wen-Wei Li, Pei-Jie Cai, Shi-Jie Yuan, Fang-Fang Yan, Meng-Xing He, Guo-Ping Sheng, Zhong-Hua Tong, and Han-Qing Yu. Electricity generation from dissolved organic matter in polluted lake water using a microbial fuel cell (mfc). *Biochemical engineering journal*, 71:57–61, 2013.
- [35] Alba Romero, Jorge Vásquez, and Armando Lugo. Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Tecnura*, 16(32), 2012.
- [36] Hamid Rismani-Yazdi, Ann Christy, Sarah Carver, Zhongtang Yu, Burk Dehority, and Olli Tuovinen. Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102(1):278–283, 2011.
- [37] Silvio Rachinski, Ademir Carubelli, Ana Mangoni, and Antonio Mangrich. Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. *Quim. Nova*, 33(8):1773–1778, 2010.
- [38] Marcel Kuypers, Hannah Marchant, and Boran Kartal. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 2018.

- [39] Laura Cerón Rincón and Fabio Ancízar Aristizábal. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1):285–295, 2012.
- [40] Oscar Duarte. La bioprospección en colombia. *Expediio*.
- [41] Angela Dominguez. *Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia y propuesta para la implementación del plan nacional en Bioprospección*. Maestria en gestion ambiental, Facultad de estudios ambientales y rurales. Potintificia Universidad Javeriana, Bogota D.C 2012.
- [42] APHA, AWWA, and WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater.
- [43] Guillaume Chauvon, Jean-Luc Vassel, and Alain Vande Wouwer. Dynamic simulation and optimisation of a sbr wastewater treatment system. In *System Theory, Control and Computing (ICSTCC), 2016 20th International Conference on*, pages 198–203. IEEE, 2016.
- [44] Franck Poly, Lucile Jocteur Monrozier, and René Bally. Improvement in the rflp procedure for studying the diversity of nifh genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1):95–103, 2001.
- [45] Christin Koch, Dominika Popiel, and Falk Harnisch. Functional redundancy of microbial anodes fed by domestic wastewater. *ChemElectroChem*, 1(11):1923–1931, 2014.
- [46] A Larrosa, LJ Lozano, KP Katuri, I Head, K Scott, and C Godinez. On the repeatability and reproducibility of experimental two-chambered microbial fuel cells. *Fuel*, 88(10):1852–1857, 2009.
- [47] Yoonjoo Seo, Hyemin Kang, Sumin Chang, Yun-Yeong Lee, and Kyung-Suk Cho. Effects of nitrate and sulfate on the performance and bacterial community structure of membrane-less single-chamber air-cathode microbial fuel cells. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(1):13–24, 2018.
- [48] Bibiana Cercado, Luis Cházaro-Ruiz, Vianey Ruiz, Israel de Jesús López-Prieto, Germán Buitrón, and Elías Razo-Flores. Biotic and abiotic characterization of bioanodes formed on oxidized carbon electrodes as a basis to predict their performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 50:373–381, 2013.
- [49] Alexander Mora-Collazos and Enrique Bravo-Montaño. Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente. *Acta Biológica Colombiana*, 22(1):27–36, 2017.
- [50] Natalia Sacco, Maria Bonetto, and Eduardo Cortón. Generación de electricidad en una celda de combustible microbiana mediada utilizando micro-ánodos descartables. pages 388–392, 2017.
- [51] Katsutoshi Hori and Shinya Matsumoto. Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3):424–434, 2010.
- [52] Bruce E Logan. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5):375, 2009.

- [53] Bruce E Logan and John M Regan. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *TRENDS in Microbiology*, 14(12):512–518, 2006.
- [54] Silvia Pajares and Brendan JM Bohannon. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in microbiology*, 7:1045, 2016.
- [55] Korneel Rabaey and Willy Verstraete. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6):291–298, 2005.
- [56] Andrea G Capodaglio, Daniele Molognoni, and Anna Vilajeliu Pons. A multi-perspective review of microbial fuel-cells for wastewater treatment: bio-electro-chemical, microbiologic and modeling aspects. In *AIP Conference Proceedings*, volume 1758, page 030032. AIP Publishing, 2016.

Apéndice A

ANEXOS

A.1. Anexo 1

Abundancia relativa de los Géneros encontrados en el biofilm de las bioceldas.

Género	To.RNoF	To.F	OH ⁻ /RNoF	NH ₂ ⁻ /F	NH ₂ ⁻ /RNoF	COO ⁻ /RNoF
acidovorax	0,03	0,05	3,39	0,08	9,04	2,03
acinetobacter	0,00	0,00	0,00	0,02	0,59	0,31
alcaligenes	0,02	0,05	3,59	1,27	2,09	6,56
aquimonas	0,72	0,07	1,74	3,12	0,41	0,84
arcobacter	0,01	0,01	0,02	0,02	3,62	0,45
azospira	2,36	17,29	3,29	6,13	0,70	1,14
azospirillum	0,31	1,87	15,50	1,03	5,94	13,50
azotobacter	7,04	0,34	0,09	2,51	0,06	0,07
bacillus	0,03	0,44	0,02	0,02	0,26	0,09
bacteroides	1,85	6,20	4,73	13,82	11,03	9,78
bordetella	0,02	0,32	1,94	0,06	2,71	2,28
brevundimonas	0,84	2,85	6,86	2,47	11,21	12,18
burkholderia	0,02	0,03	1,29	0,04	2,22	0,40
candidatus xiphinematobacter	1,06	0,01	0,00	0,06	0,00	0,00
caulobacter	0,34	0,09	0,02	0,72	0,05	0,04
chloroflexus	0,23	0,03	0,03	0,42	0,03	0,02
chryseobacterium	0,07	0,63	0,41	0,12	0,60	0,87
chthoniobacter	1,10	0,04	0,02	0,34	0,07	0,00
cloacibacterium	0,02	0,04	0,48	2,53	0,01	0,04
clostridium	1,78	8,45	4,35	3,62	5,74	5,28
comamonas	0,03	0,12	2,55	6,61	1,60	2,69
cyanothecce	1,71	0,68	0,07	0,07	0,36	0,15
delftia	0,00	0,00	0,14	0,08	0,45	0,67
desulfotomaculum	0,06	0,05	0,20	0,14	0,83	0,23
desulfovibrio	0,01	0,00	0,00	0,05	0,03	2,03
devosia	0,01	0,04	0,27	0,02	0,28	0,29
enterobacter	0,01	0,87	0,04	0,00	0,01	0,03
flavobacterium	0,15	0,51	3,41	0,66	3,85	3,67
gordonia	0,02	1,90	0,44	0,04	0,98	0,89
halothermothrix	0,00	0,00	0,01	0,01	1,69	0,01
hydrogenophaga	0,04	0,12	0,05	0,70	0,17	0,25
hyphomonas	2,07	0,27	0,55	4,70	0,66	1,13
isosphaera	0,01	0,06	0,34	0,11	0,51	0,39
klebsiella	0,09	7,58	0,04	0,02	0,03	0,02

Género	To.RNoF	To.F	OH ⁻ /RNoF	NH ₂ ⁻ /F	NH ₂ ⁻ /RNoF	COO ⁻ /RNoF
lachnoclostridium	0,02	1,11	0,01	0,03	0,26	0,12
leifsonia	0,19	0,02	0,02	1,45	0,02	0,02
marinoscillum	6,36	12,31	3,27	1,35	5,26	0,47
martelella	1,23	0,69	0,18	2,44	0,64	0,74
microbacterium	0,02	0,58	0,50	0,14	0,02	0,39
mycobacterium	0,01	0,09	0,09	0,28	0,33	0,14
opitutus	1,48	0,10	6,20	0,97	0,13	0,40
oscillibacter	0,01	0,67	0,02	0,01	0,08	0,07
oscillospira	0,01	0,60	0,15	0,14	0,58	0,21
Other	2,96	3,10	4,59	3,55	5,07	5,23
pedobacter	1,93	2,65	0,04	1,14	0,10	0,04
phenylobacterium	0,08	0,06	0,18	0,20	0,14	0,08
planctomyces	7,08	0,09	0,12	6,20	0,04	0,05
polyangium	0,03	0,50	0,00	0,02	0,23	0,09
propionibacterium	0,01	0,02	0,69	0,07	0,44	0,04
propionicimonas	0,03	0,16	0,01	0,32	0,06	0,23
prosthecobacter	0,24	3,00	0,02	0,03	0,01	0,06
proteiniborus	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	2,24
pseudoflavonifractor	0,00	0,16	0,39	0,05	0,29	0,24
pseudolabrys	0,21	0,02	0,34	0,10	0,01	0,08
pseudomonas	0,03	0,11	0,26	1,07	0,09	0,03
pseudoxanthobacter	0,01	0,58	1,71	0,03	0,34	0,67
pseudoxanthomonas	0,29	0,02	0,04	1,68	0,25	0,33
psychrobacillus	0,01	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00
ralstonia	0,03	0,03	1,55	0,11	1,04	0,75
reyranella	0,29	0,02	0,39	0,08	0,08	0,07
rhizobium	0,07	0,09	1,77	1,35	5,78	4,31
rhodovastum	0,00	0,00	0,19	0,02	0,54	0,40
roseomonas	0,20	0,02	1,04	0,24	0,12	0,47
ruminococcus	5,25	11,72	3,91	14,96	1,82	2,11
runella	0,38	0,75	0,01	0,02	0,00	0,01
sedimentibacter	0,06	0,20	10,22	0,11	0,18	1,52
sphingobacterium	11,05	2,99	0,31	1,06	1,54	0,62
sphingobium	0,01	0,00	0,70	0,14	0,41	0,07
sphingomonas	0,06	0,06	0,21	0,08	0,51	0,08
sphingopyxis	2,27	0,88	3,12	6,79	1,11	2,19
sporomusa	0,12	0,02	0,02	0,28	0,21	0,04
stenotrophomonas	0,01	0,11	0,21	0,44	0,13	0,28
terrimonas	21,68	2,88	0,24	0,14	0,10	0,07
vampirovibrio	0,02	0,99	0,12	0,10	1,46	3,61
verrucomicrobium	13,79	0,42	0,35	1,09	0,17	0,06
xanthomonas	0,10	0,09	0,84	0,08	2,31	2,98
zoogloea	0,33	0,30	0,06	0,03	0,24	0,03

A.2. Anexo 2. Glosario

- **ADN:** Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteína compleja que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los seres vivos.
- **Ánodo:** Electrodo positivo. Electrodo positivo de una celda electrolítica al cual se dirigen los aniones de la disolución.
- **Agua residual:** Agua que procede de viviendas, poblaciones o zonas industriales y arrastra suciedad y detritus.
- **Archaea:** Clasificación taxonómica que se le da a un grupo de microorganismos que tienen la característica de ser procariotas (carentes de núcleo) y encontrarse en ambientes extremos.
- **ATP:** Adenosintrifosfato. Enzima rico en energía, compuesto fundamental en los procesos bioquímicos de acoplamiento energético.
- **Biomasa:** Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.
- **Biopelícula:** Biofilm, tapiz bacteriano o tapete microbiano es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos adheridos a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.
- **Bioprospección:** Búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que forman parte de la biodiversidad.
- **Biosensores:** Dispositivo que utiliza materiales de origen biológico para detectar y cuantificar una sustancia.
- **Bio-reactores:** Recipiente diseñado para que en su interior se produzcan reacciones químicas o biológicas.
- **Biorremediación:** Empleo de microorganismos para la recuperación del medio ambiente o para el tratamiento de materiales.
- **Cátodo:** Electrodo negativo. Electrodo negativo de una celda electrolítica al cual se dirigen los cationes de la disolución.
- **Cultivos Mixtos:** Agrupación de varios tipos de microorganismos en un medio de cultivo.
- **Demanda bioquímica de oxígeno:** Parámetro que mide la cantidad de oxígeno consumido al degradar la materia orgánica de una muestra líquida. Se expresa en mg.L-1 de O₂
- **Efecto invernadero:** Elevación de la temperatura de la atmósfera próxima a la corteza terrestre, por la dificultad de que se disipe la radiación calorífica, debido a la presencia de una capa de gases, especialmente dióxido de carbono, procedentes de las combustiones industriales y otras actividades.

- **Eubacteria:** Clasificación taxonómica que se le da a un grupo de organismos que tienen la característica de ser procariotas (carentes de núcleo).
- **Inóculo:** Microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped. Organismos o patógenos transferidos de un ambiente a otro.
- **Lodos:** Mezcla de microorganismos, materia orgánica y agua, que puede resultar de diferentes procesos.
- **Lodos activados:** Proceso biológico empleado en el tratamiento de aguas residuales convencional, que consiste en el desarrollo de un cultivo bacteriano disperso en forma de flóculo en un depósito agitado, aireado y alimentado con el agua residual, que es capaz de metabolizar como nutrientes los contaminantes biológicos presentes en esa agua.
- **Lodos anaeróbicos:** Mezcla de microorganismos, materia orgánica y agua, donde prevalecen procesos metabólicos en ausencia de oxígeno atmosférico.
- **Metagenoma:** Estudio del material genético, el cual es obtenido directamente de muestras ambientales.
- **Secuenciación:** Acción y efecto de secuenciar. Obtener la secuencia de nucleótidos que conforman el ADN de cualquier organismo vivo.
- **Sustrato:** Lugar que sirve de asiento a un microorganismo, planta o un animal fijo.

A.3. Anexo 3. Abreviaciones

AC	=	Agar Cetrimide
ADN	=	ácido desoxirribonucleico
AEC	=	Agar Enterococcosel
ATP	=	Adenosin Tri Fosfato
ASM	=	Agar Salado Manitol
BFN	=	Bacterias fijadoras de nitrógeno
CCM	=	Celda de Combustible Microbiana
CCP	=	Closed Circuit Potential
CE	=	Conductividad Eléctrica
Cef	=	Eficiencia Coulombica
CO ₂	=	Dióxido de carbono
COO ⁻	=	Anodos sometidos a Ácido Oxálico
DBO	=	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DBO ₅	=	Demanda Bioquímica de Oxígeno al 5to día
DBO ₇	=	Demanda Bioquímica de Oxígeno al 7to día
DGGE	=	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DP	=	Densidad de Potencia
EE	=	Eficiencia energética
EMB	=	Agar Eosin Methyl Blue
MFC	=	Microbial Fuel Cell
Mton	=	Mega Toneladas
m ³	=	Metros Cúbicos
N ₂	=	Nitrógeno molecular
NO ₂ ⁻²	=	Nitrito
NH ₂	=	Anodos sometidos a Etilendiamina
NO ₃ ⁻	=	Nitrato
NH ₄ ⁺	=	Ion amonio
OD	=	Oxígeno Disuelto
OH ⁻	=	Anodos sometidos a Etilenglicol
OTU	=	Operational Taxonomic Units
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RFN	=	Reactor Fijador de Nitrógeno
RNoF	=	Reactor No Fijador de Nitrógeno
SBR	=	Sequential Batch Reactor
STARD	=	Sistema de Tratamiento de Agua Residual Doméstica
TWh	=	Tera Watts por Hora