



CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN  
ELECTROQUÍMICA, S.C.

---

Estudio del microbioma presente en celdas de  
combustible microbianas

# Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

Maestro en Ciencia y Tecnología  
en la Especialidad de Ingeniería Ambiental

PRESENTA

IBQ. Alan Jacob Cornejo Martell



Santiago de Querétaro, Qro., México, Noviembre de 2017.



**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección de:**

**Dra. María Yolanda Reyes Vidal**

# **AGRADECIMIENTOS**

**Al proyecto 258159 del Fondo SEP-CONACYT-Ciencia  
Básica.**

A mi Directora de Tesis, la Dra. Yolanda Reyes, por soportarme estos años.

A mi comité tutorial y jurado por apoyarme y ayudarme.

A mis compañeros y amigos del CIDETEQ, los cuales me compartieron material y reactivos (en especial al grupo de Procesos Electroquímicos y Tratamiento de Superficies).

A mi familia y amigos de Aguascalientes que me brindaban todo su apoyo moral en las buenas y en las malas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan por los cuatro meses que convivimos.

Por último, pero no menos importante a CONACYT, por la beca de Maestría No. 664877.



## Resumen

Los sistemas bioelectroquímicos son una tecnología de amplio interés, ya que cumple con dos funciones de importancia ambiental, la producción de energía renovable y el tratamiento de efluentes. Estos dispositivos son celdas electroquímicas donde se establece una biopelícula sobre el ánodo. Los microorganismos presentes en dicha biopelícula forman parte de un microbioma de alto interés por que son los responsables de llevar a cabo los procesos de transferencia electrónica, indispensable para que se cumplan las funciones del sistema bioelectroquímico obtenido. Una estrategia para mejorar el funcionamiento de una de las configuraciones de este sistema, como son las celdas de combustible microbianas, es conocer a los microorganismos presentes en dicho microbioma, ya que no todos los especímenes que se establecen en estas comunidades tienen la capacidad de transferir electrones de la cadena respiratoria al electrodo, pero pueden contribuir al mantenimiento de la comunidad microbiana en general. Así, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar microorganismos presentes en biopelículas de celdas de combustible microbianas y analizar electroquímicamente a aquellos que tuvieran la capacidad de reducción del ion férrico, relacionada con capacidad para la transferencia extracelular de electrones.

El aislamiento se realizó usando bioanodos de celdas de combustible microbianas, creando una suspensión celular desde la que se hicieron diluciones seriadas y cultivo en placa con diferentes medios de cultivo, como medio Luria Bertani y medio sintético suplementado con citrato férrico amoniacal. Se obtuvieron 21 aislados, a los que se extrajo ADN<sub>g</sub> y se amplificó el 16S ADN<sub>r</sub>, usando el par de cebadores universales 27F y 1492R. Se ligaron y clonaron los productos obtenidos para secuenciación. Los datos adquiridos fueron usados para análisis filogenéticos, obteniendo tres géneros predominantes: *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Pseudomonas*. Se estandarizó una metodología para determinar la capacidad de reducción del ion Fe (III) en todos los aislados obtenidos, lo que permitió seleccionar aquellos que presentaron mejor actividad. Esta actividad fue relacionada con su capacidad de respiración extracelular. El aislado con mejor capacidad de reducción de Fe (III) fue el aislado 1N, correspondiente con *Pseudomonas aeruginosa*. Esta cepa fue caracterizada electroquímicamente en celdas de tres electrodos mediante cronoamperometría a 0.2 V vs AgCl/Cl por 72 h, para conocer su capacidad de producción de densidad de corriente. También se analizaron los procesos de oxidación-

reducción en la interfase biopelícula-electrodo de un bioánodo formado con *Pseudomonas aeruginosa*, mediante voltametría cíclica.

## Abstract

Bioelectrochemical systems are a technology very interesting because it carry out two functions of environmental importance, such renewable energy production and wastewaters treatment. The microorganisms in biofilm are part of a microbiome of high interest because they are responsible for carrying out the electronic transfer processes, activity essential for bioelectrochemical systems functions to be fulfilled. A strategy to improve operation of microbial fuel cells, a configuration of these systems, is to investigate the microorganisms present in microbiome, since not all specimens that are established in these communities have the ability to transfer electrons from the respiratory chain to the electrode, but can contribute to maintenance of the microbial community. Thus, the objective of this work was to isolate and identify microorganisms present in biofilms of microbial fuel cells and to analyze electrochemically those that have the capacity to reduce the ferric ion, related to extracellular transfer of electrons capacity.

Isolation was performed using bioanodes developed in microbial fuel cells, for obtain a cell suspension from which serial dilutions were made and plating in different culture media, such as Luria Bertani medium and synthetic medium supplemented with ammoniacal ferric citrate. 21 isolates were attained, to which gDNA was extracted and 16S rDNA amplified, using a pair of universal primers, 27F and 1492R. The products obtained were ligated and cloned for sequencing. The acquired data were used for phylogenetic analysis, obtaining three predominant genera: *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Pseudomonas*. A methodology was standardized to determine Fe (III) ion reduction capacity in all isolates obtained, which allowed selecting those that presented the best activity. This activity was related to their ability to extracellular respiration. *Pseudomonas aeruginosa* was the isolated named 1N and had the best Fe (III) reduction capacity, too. This strain was electrochemically characterized in a three electrode cell using a chronoamperometry methodology at 0.2 V vs AgCl / Cl for 72 h, to determinate its current density production capacity. The oxidation-reduction processes in the biofilm-electrode interface were analyzed by cyclic voltammetry.

## Índice

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1.1   | Bioelectroquímica.....  | 4  |
| 1.1.1 | Bacterias con reducción desasimilatoria de metales.....   | 4  |
| 1.2   | Electromicrobiología .....  | 9  |
| 1.2.1 | Técnicas electroquímicas usadas en CCM .....  | 10 |
| 1.2.2 | Celdas usadas en sistemas bioelectroquímicos.....   | 11 |
| 1.2.3 | Transferencia extracelular de electrones .....  | 14 |
| 1.2.4 | Transferencia directa .....   | 17 |
| 1.2.5 | Transferencia indirecta .....   | 18 |
| 1.3   | Aislamiento e identificación de microorganismos provenientes de celdas de combustible microbianas ..... | 20 |
| 1.3.1 | Aislamiento de microorganismos provenientes de una CCM .....  | 20 |
| 1.3.2 | Identificación molecular de microorganismos .....   | 24 |
| 2     | JUSTIFICACIÓN.....  | 29 |
| 3     | HIPÓTESIS .....   | 30 |
| 4     | OBJETIVO GENERAL .....  | 30 |
| 4.1   | Objetivos específicos .....   | 30 |
| 5     | METODOLOGÍA.....  | 31 |
| 5.1   | Obtención de biopelículas .....   | 31 |
| 5.2   | Aislamiento de microorganismos provenientes de las CCM .....  | 32 |
| 5.3   | Identificación molecular de los microorganismos.....  | 34 |
| 5.4   | Identificación de los microorganismos reductores de Fe (III).....                                       | 37 |
| 5.4.1 | Cinética de crecimiento microbiano contra degradación de Fe (III).....                                  | 39 |
| 5.5   | Caracterización de la actividad bioelectroquímica.....  | 39 |
| 6     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 41 |
| 6.1   | Obtención de biopelículas .....   | 41 |
| 6.2   | Aislamiento de microorganismos provenientes de CCM.....   | 43 |
| 6.3   | Identificación molecular de los microorganismos.....  | 45 |
| 6.4   | Identificación de los microorganismos reductores de Fe (III).....                                       | 55 |
| 6.4.1 | Cinética de crecimiento microbiano y degradación de Fe (III).....                                       | 58 |
| 6.5   | Caracterización de la actividad bioelectroquímica. ....   | 60 |
| 7     | CONCLUSIONES.....   | 70 |
| 8     | PERSPECTIVAS .....  | 71 |
| 9     | ANEXOS.....   | 72 |
| 10    | REFERENCIAS .....   | 83 |



## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Características de los microorganismos con respiración extracelular (Modificado de Esther et al., 2014).                                | 6  |
| Tabla 2. Características de las CCM usadas en el análisis electroquímico de microorganismos.   | 13 |
| Tabla 3. Microorganismos electroquímicamente activos con transferencia extracelular de electrones. Modificado de Kumar et al., 2015.             | 15 |
| Tabla 4. Microorganismos aislados de CCM y los medios usados para su aislamiento.  | 22 |
| Tabla 5. Iniciadores usados en la identificación de microorganismos presentes en sistemas bioelectroquímicos                                     | 25 |
| Tabla 6. Características de la configuración de las CCM instaladas.  | 32 |
| Tabla 7. Parámetros usados en la PCR con la polimerasa Phusion High-Fidelity.  | 35 |
| Tabla 8. Parámetros usados en la PCR con GoTaq® Green Master mix.  | 35 |
| Tabla 9. Densidades de potencia y densidades de corriente obtenidas en las CCM instaladas.   | 41 |
| Tabla 10. Morfología colonial de los aislados obtenidos de las CCM instaladas.   | 45 |
| Tabla 11. Datos obtenidos del análisis BLAST.  | 48 |
| Tabla 12. Eficiencia en la reducción de Fe (III) presentada por las cepas aisladas.  | 56 |
| Tabla 13. Análisis de varianza para los valores de porcentaje de reducción de Fe (III) de los aislados de interés.                               | 56 |
| Tabla 14. Valores de eficiencia de reducción de Fe (III) para las cepas seleccionadas.   | 57 |
| Tabla 15. Características de las CCM usadas en el análisis electroquímico de diferentes microorganismos y las densidades de corriente obtenidas. | 62 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Diseño típico de una celda de combustible microbiana (Logan et al., 2006). .....   | 2  |
| Figura 2. Artículos publicados sobre: a) celdas de combustible microbianas, palabras claves: microbial fuel cell b) aislamiento de microorganismos en celdas de combustible microbianas, palabras clave “microbial fuel cell” y “isolation” (Web of Science, Julio 2017). .....  | 3  |
| Figura 3. Bosquejo de los modelos de transferencia de electrones entre microorganismos y óxidos metálicos. (a) Transferencia directa, donde los citocromos y/o pilis reducen el óxido metálico; (b) Transferencia indirecta, donde los mediadores redox o ligandos ayudan a la reducción del óxido metálico (Modificado de Esther et al., 2015)..... | 8  |
| Figura 4. Diseños de celdas electroquímicas, A) celda dividida, B) celda sin dividir. ....   | 12 |
| Figura 5. Representación de los métodos de transferencia de electrones de los microorganismos hacia los electrodos, (a) Transferencia directa, en el cual los citocromos y/o pilis transfieren los electrones al electrodo; (b) Transferencia indirecta, donde los mediadores redox ayudan en la transferencia de electrones al electrodo.....       | 17 |
| Figura 6. Diagrama de flujo para la identificación molecular de microorganismos. ....  | 27 |
| Figura 7. Configuración de las celdas de combustible microbianas utilizadas en el experimento. Las flechas indican las diferentes partes de las celdas: (a) Celda sin división; (b) Celda con división. ....   | 31 |
| Figura 8. Esquema de la metodología para el aislamiento de microorganismos desde biopelículas de ánodos de CCM. ....   | 34 |
| Figura 9. Esquema de la metodología usada en la identificación molecular de los microorganismos. ....  | 37 |
| Figura 10. Esquema de la metodología para determinar reducción de Fe (III) en cultivos microbianos. ....   | 38 |
| Figura 11. Valores de densidad de corriente en las diferentes configuraciones de CCM instaladas. ....  | 42 |
| Figura 12. Crecimiento bacteriano en cultivos líquidos inoculados con los diferentes aislados obtenidos. Tiempo de cultivo: 48 h. ....   | 44 |
| Figura 13. Gel de electroforesis con ADNg. De izquierda a derecha (a) marcador de peso molecular, (b) y (c) extracción de ADNg de los aislados 1N y 2N, respectivamente. ....  | 46 |
| Figura 14. Gel de electroforesis con productos de PCR; la flecha indica el peso alrededor de 1500 pb; de izquierda a derecha: (a) marcador de peso molecular, (+) control positivo, (-) control negativo, (b) y (c) productos de PCR de los aislados 1N y 2N, respectivamente. ....  | 46 |
| Figura 15. Gel de electroforesis con productos de PCR de las clonas. Las flechas indican el peso de las moléculas en pares de bases; de izquierda a derecha se tiene (a) marcador de peso molecular, (b) plásmido sin reacción de PCR, (-) control negativo, (c) y (d) clonas de los de los aislados 1N y 2N, respectivamente.....                   | 47 |
| Figura 16. Árbol filogenético de los aislados provenientes de CCM y especies estrechamente relacionadas basadas en secuencias de 16S ARNr. El árbol fue construido utilizando el método de Neighbor-Joining. Las cepas resaltadas en azul corresponden a los aislados obtenidos en este trabajo. ....  | 50 |
| Figura 17. Diferentes coloraciones en los caldos de cultivos (enriquecidos con citrato férrico) e inoculados con los aislados obtenidos. Tiempo de incubación: 24 h. ....  | 57 |
| Figura 18. Medios de cultivo inoculados con <i>P. aeruginosa</i> ; (a) Cultivos después de 24 h de crecimiento; (b) Cultivos después de 72 h de crecimiento. ....  | 58 |
| Figura 19. Cinética de degradación de Fe (III) por la cepa 1N a diferentes volúmenes de inóculo. Línea roja: 0.1 ml; línea azul: 1 ml. Las barras de error indican la desviación estándar. ....  | 59 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20. Cinética de crecimiento microbiano de la cepa 1N a diferentes volúmenes de inóculo. Línea roja: 0.1 ml. Línea azul: 1 ml. Las barras de error indican la desviación estándar. ....  | 60 |
| Figura 21. Cronoamperometrías de las CCM inoculadas con la cepa 1N, correspondiente con <i>P. aeruginosa</i> (seis réplicas). Condiciones de la técnica: 0.2 V vs Ag/AgCl saturado, por 72 horas. ....   | 61 |
| Figura 22. Comparación de las voltametrías cíclicas a una velocidad de barrido de 20 mV/s, obtenidas en una CCM inoculada con la cepa 1N. El análisis electroquímico se realizó en tres tiempos del experimento (inicio de la cronoamperometría, máxima densidad de corriente y final de la cronoamperometría). .... | 64 |
| Figura 23. Comparación de las voltametrías cíclicas a una velocidad de barrido de 20 mV/s de la CCM inoculada con la cepa 1N en tres estados: biopelícula en un medio limpio, sobrenadante con un electrodo sin biopelícula y al final del experimento. ....   | 65 |
| Figura 24. (a) Análisis de voltametría cíclica al final de la cronoamperometría de la cepa 1N, a diferentes velocidades de barrido; (b) Función de la corriente de pico contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para voltametrías cíclicas de la cepa 1N. ....  | 66 |
| Figura 25. Análisis espectrofotométrico del sobrenadante de un cultivo microbiano de la cepa 1N usando medio con óxido férrico. Barrido de absorbancias entre longitudes de onda de 300 a 800 nm. ....   | 68 |
| Figura 26. Comparación de las voltametrías cíclicas a una velocidad de barrido de 20 mV/s, obtenidas en CCM inoculadas con la cepa 7N, en dos diferentes tiempos: al inicio del experimento y al final de la cronoamperometría. ....   | 69 |

# 1 Introducción

En la actualidad, el uso y consumo de combustibles fósiles tiene un incremento dramático debido a la industrialización en los países en desarrollo, el aumento poblacional y la modificación de los estilos de vida. Esta demanda de combustibles fósiles genera una crisis energética, marcando el interés en la promoción de alternativas para satisfacer las necesidades de energía mundial.

Una de estas alternativas son las energías renovables, considerando que pueden contribuir hasta con el 14% de la demanda total de energía. Las energías renovables son aquellas energías que provienen de recursos naturales que no se agotan rápido, a los que se puede recurrir de manera permanente, y su impacto ambiental es nulo o mínimo en la emisión de gases de efecto invernadero (ej. CO<sub>2</sub>). Algunas que se encuentran en esta categoría son la energía solar, marina, eólica, geotérmica y bioenergía (Panwar et al., 2011).

Dentro de la tecnologías usadas para generar bioenergía se encuentran las celdas de combustible microbianas (CCM), que son una tecnología capaz de producir electricidad con base en fenómenos bioelectroquímicos, utilizando microorganismos vivos para catalizar reacciones de óxido-reducción (Sharma et al., 2014). Dicha tecnología ofrece una solución prometedora para satisfacer las crecientes necesidades de energía y el tratamiento de aguas residuales. En las CCM, los microorganismos degradan (oxidan) materia orgánica, extrayendo electrones que se transportan a través de una serie de enzimas y se usan para obtener energía para la célula en forma de ATP. Los electrones se liberan a un aceptor terminal extracelular; así pues, una CCM se puede definir como un sistema en el que los microorganismos funcionan como catalizadores para convertir energía química a energía eléctrica (Logan, 2007).

El primero en observar este fenómeno por acción de microorganismos fue Potter, en el año de 1910, cuando observó que cepas de *Escherichia coli* podían completar su ciclo metabólico con un electrodo. Años posteriores, Cohen (1931) y posteriormente Davis y Yarborough (1962), construyeron verdaderamente una CCM. Durante la década de 1960, los fenómenos de la respiración microbiana con un electrodo como receptor de electrones fueron estudiados con más detalle en el contexto de corrosión biológica. Desde entonces, la atención

en la respiración extracelular en sistemas de reactores perdió interés. A mediados de los años 1990, los sistemas bioelectroquímicos recibieron de nuevo atención. En la actualidad la generación de energía a partir de aguas residuales se considera uno de los planes a futuro más prometedores en la producción de energía sostenible y tratamiento de aguas residuales (Arends et al., 2012; Li et al., 2013).

Un diseño común de las CCM es aquel con dos cámaras, una anaerobia y otra aerobia, en medio de las cuales hay una membrana semipermeable (Figura 1). En cada una de las cámaras se coloca un electrodo; el ánodo en la cámara anaerobia y el cátodo en la cámara aerobia. La cámara anaerobia contiene sustratos orgánicos que, al oxidarse por acción de los microorganismos, liberan electrones, protones y se produce  $\text{CO}_2$ ; los electrones son captados por el ánodo y posteriormente transferidos hacia el cátodo mediante un circuito externo. Simultáneamente, los protones migran hacia la cámara catódica a través del separador, donde se combinan con el oxígeno del aire para reducirse a agua con los electrones que captan directamente del cátodo. Debido a que esta última reacción no está catalizada por microorganismos, el cátodo se refiere como abiótico (Revelo et al., 2013).

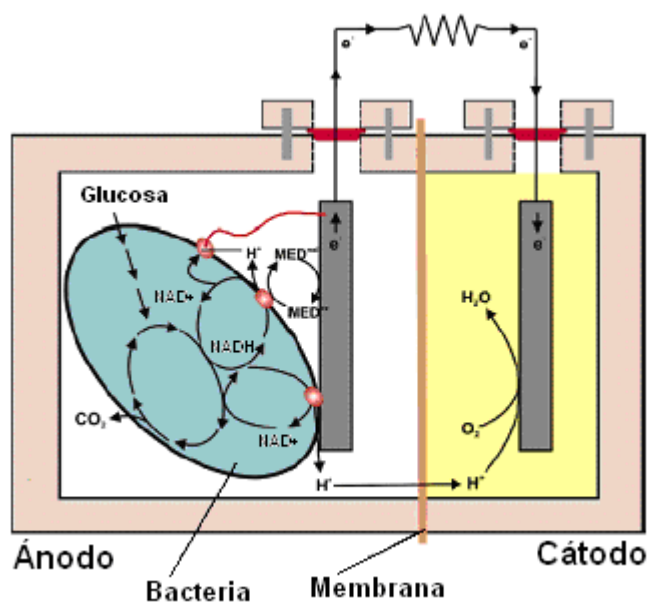


Figura 1. Diseño típico de una celda de combustible microbiana (Logan et al., 2006).

Hay diferentes factores que influyen sobre el desempeño de una CCM, como la configuración del reactor, el tipo de materiales de electrodos, la distancia entre electrodos, el

tipo de inóculo y la temperatura, entre otros (Vázquez-Larios et al., 2010). Un componente muy importante, que le da nombre a la tecnología, es el tipo y la concentración de microorganismos, ya que afectan significativamente la densidad de corriente en las CCM ( $J = \text{Voltaje}/\text{Resistencia externa}/\text{Área del electrodo}$ ) y potencia ( $P = \text{Voltaje}^2/\text{Resistencia externa}/\text{Área del electrodo}$ ) (Sharma et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la importancia del tema y aunque en la última década se incrementaron las publicaciones sobre CCM (Figura 2a), el conocimiento de los mecanismos de transporte y de los microorganismos con transferencia extracelular de electrones está apenas iniciando. Así, hasta el año 2015, la cantidad de artículos publicados sobre el aislamiento e identificación de microorganismos en CCM aún es baja, representando un porcentaje mínimo en el total de publicaciones sobre CCM en general (Figura 2b).

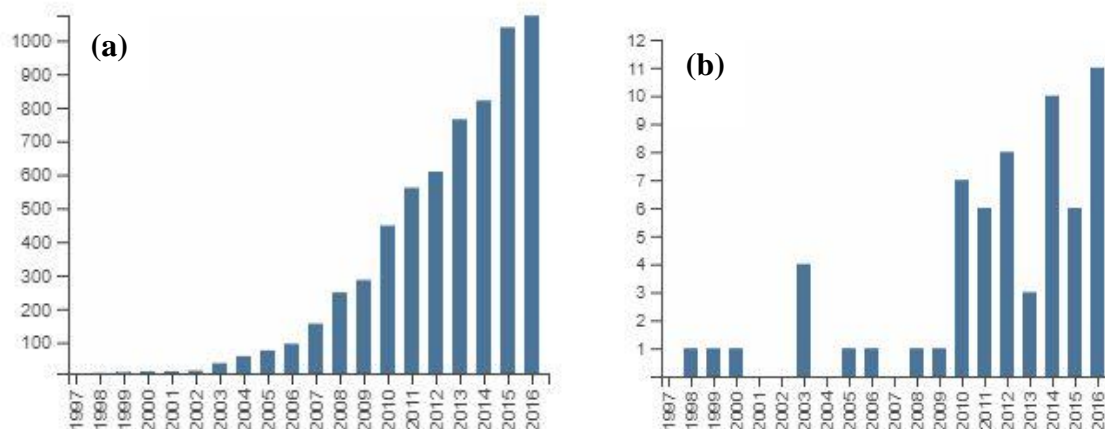


Figura 2. Artículos publicados sobre: a) celdas de combustible microbianas, palabras claves: microbial fuel cell b) aislamiento de microorganismos en celdas de combustible microbianas, palabras clave “microbial fuel cell” y “isolation” (Web of Science, Julio 2017).

El conocimiento acerca de cómo algunos microorganismos tienen la capacidad de transportar sus electrones a través de la pared celular y así tener una interacción electrónica con su medio ambiente se conoce desde hace un siglo. Esta característica se puede usar para desarrollar bioprocesos avanzados y mejorados electroquímicamente para los llamados sistemas bioelectroquímicos. Las posibilidades de aplicación para las interacciones electrodo-bacterias incluyen la producción de electricidad, tratamiento de residuos y aguas residuales, biorremediación y la producción de productos valiosos, abriendo así un amplio campo de investigación. Pero muchas aplicaciones de los sistemas bioelectroquímicos están restringidas a proyectos de investigación a escala de laboratorio, ya que la generación de corriente eléctrica es

demasiado baja para diseñar un proceso viable. Para optimizar y avanzar en las técnicas bioelectroquímicas es necesario una comprensión más completa de los posibles mecanismos de intercambio de electrones extracelulares (Kracke et al., 2015).

## 1.1 Bioelectroquímica

La electroquímica convencional distingue sus procesos, materiales y aplicaciones en la interface de la biología y electroquímica utilizando el prefijo *bio* para indicar la participación del componente biológico. Dicho componente pueden ser células, enzimas u orgánulos. Así, entre los ejemplos de estas aplicaciones se tienen a las celdas biocombustibles, biosensores, bioelectrocatalizadores y, por supuesto, la bioelectroquímica (Schröder et al., 2015). Para definir a la bioelectroquímica se toma en cuenta su etimología con los prefijos: *bio* y *electro*, indicando que es una rama de investigación científica para el estudio de los procesos biológicos mediante técnicas electroquímicas. En otra definición puede considerarse como la rama de la investigación científica que estudia los fenómenos eléctricos resultantes de procesos que implican partículas cargadas eléctricamente pertenecientes a sistemas biológicos. Por lo tanto, tiene aplicación en áreas de electroquímica enzimática, electroquímica proteica y electroquímica microbiana (Milazzo et al., 1983; Schröder et al., 2015). La electroquímica microbiana es el estudio y la aplicación de la interacción entre microorganismos y conductores de electrones, representados por electrodos físicos (por ejemplo, aquellos hechos de grafito o de metales) y materiales conductores de origen natural tales como óxidos metálicos (Schröder et al., 2015).

### 1.1.1 Bacterias con reducción desasimilatoria de metales

Los microorganismos obtienen su energía en las cadenas de transporte de electrones, donde los electrones se transfieren de un donador de electrones de bajo potencial a un aceptor con potencial redox más positivo, lo que puede resultar en un gradiente de protones para conducir la síntesis de ATP. En estas reacciones, la ganancia de energía alcanzable (energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ ) de cada cadena de transporte de electrones depende de la diferencia de potencial redox ( $\Delta E$ ) entre el donador de electrones y el aceptor (Kracke et al., 2015). En diversos ambientes se encuentran bacterias que poseen la habilidad de transferir extracelularmente los electrones desde sus procesos metabólicos de respiración, ya que con el

fin de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales han desarrollado una enorme variedad de cadenas de transporte de electrones. Estas bacterias juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos, biocorrosión, biorremediación y están siendo altamente consideradas para los procesos bioelectroquímicos (Kracke et al., 2015; Yuan et al., 2013).

Algunas bacterias tienen la capacidad de interactuar con minerales sólidos, por ejemplo, Fe (III) o Mn (IV), y pueden obtener energía usando esos minerales como aceptores de electrones para su proceso de respiración. Debido a este fenómeno, a las bacterias que realizan tal mecanismo se les conoce como bacterias con reducción desasimilatoria de metales (BRDM), considerándolas como bacterias que reducen compuestos metálicos para generar energía útil en su metabolismo, crecimiento y reproducción. Las BRDM obtienen la energía por la oxidación de los ácidos orgánicos/H<sub>2</sub> junto a la reducción de una fase sólida como aceptor terminal de electrones (Esther et al., 2015; Kracke et al., 2015).

Aún no se ha aclarado a detalle como integran a su metabolismo los metales insolubles y extraen energía. Sobre todo, en comparación con otros procesos de respiración, donde el aceptor final puede ser un gas difusible o si las sustancias son solubles, lo que les permite entrar fácilmente a la célula. El problema principal para las BRDM es que los minerales extracelulares no pueden pasar la membrana celular, y por ende no tienen acceso al periplasma ni al citoplasma. Las BRDM necesitan moléculas redox activas en su membrana externa o tienen que secretar moléculas que sirvan como mediadores para transferir electrones entre el interior celular y los metales extracelulares (Kracke et al., 2015). Gran parte de los trabajos hacia la comprensión de dicho fenómeno giran en torno a los géneros *Geobacter* y *Shewanella*, considerados como microorganismos modelos, pero entre las BRDM se encuentran especies de diferentes filos como proteobacteria, firmicutes (endobacterias), acidobacteria (Esther et al., 2015). En la Tabla 1 se muestran algunos microorganismos reductores de metales.



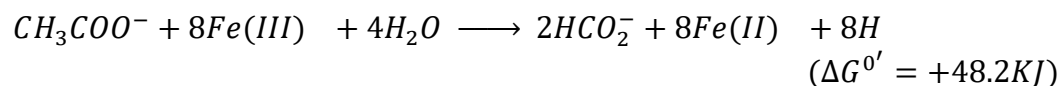
Tabla 1. Características de los microorganismos con respiración extracelular (Modificado de Esther et al., 2014).

| <b>Microorganismo</b>               | <b>Sustrato</b>   | <b>Aceptor de electrones</b>   |
|-------------------------------------|---|--|
| <i>Geoglobus acetivorans</i>        | Acetato, formiato, piruvato, fumarato, malato, propionato, butirato, succinato                                    | Oxido férrico y citrato férrico  |
| <i>Geothrix fermentans</i>          | Propionato, palminiato, lactato, fumarato y succinato   | Fe(III), Mn (IV), nitrato, y antraquinonas   |
| <i>Geoalkalibacter subterraneus</i> | Formiato, acetato, malonato, propionato, piruvato, lactato, butirato, isobutirato, succinato, fumarato y valerato | Fe (III), Mn (IV), nitrato, azufre elemental y trimetilamina                                     |
| <i>Deferribacter thermophilus</i>   | Hidrógeno, acetato, malato, citrato, piruvato, lactato, succinato y valerato                                      | Fe (III), Mn (IV) y nitrato  |
| <i>Bacillus subterraneus</i>        | Extracto de levadura, glucosa, sacarosa, fructuosa, malosa, xilosa, almidón, glicerol, etanol y lactato           | Fe (III) amorfo, Mn (IV), nitrato, nitrito y fumarato  |
| <i>Acidiphilium cryptum</i>         | Glucosa, celobiosa, hidrógeno   | Fe (III)   |
| <i>Bacillus pseudormus</i>          | Sacarosa, lactato, glucosa y glicerol   | Fe (III), AQDS y ácidos húmicos  |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>      | Lactato y piruvato  | FeO (OH), citrato férrico, As (V), U (VI) Se (IV) y Mn (IV)                                      |
| <i>Shewanella oneidensis</i>        | Lactato   | Citrato férrico  |
| <i>Geobacter metallireducens</i>    | Ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, compuestos monoaromáticos, acetato                                      | Hierro cristalino, Mn (IV), U (VI) y nitrato   |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i>     | Acetato, hidrógeno  | Fe (III), FeO (OH), citrato férrico, azufre elemental, Co <sup>3+</sup> -EDTA, fumarato y malato |

En la Tabla 1 se puede apreciar que los microorganismos utilizan diferentes tipos de sustratos para transferir sus electrones extracelularmente a una gran variedad de aceptores, esto se debe a que, en ambientes naturales, tales como, sedimentos acuáticos, suelos sumergidos, y en el subsuelo terrestre se encuentran una gran variedad de aceptores de electrones como sustancias húmicas, antraquinonas, azufre, nitratos. Entre los más importantes aceptores de electrones están los óxidos metálicos, en específico el hierro (Pierra et al., 2015).

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre comprendiendo alrededor del 3.9% de la masa en sedimentos, su reducción es una forma importante de respiración anaerobia. El potencial de reducción del par Fe (III) / Fe (II) es ligeramente electropositivo ( $E^{0'} = +0.2$  V, a pH 7) causando que la reducción de Fe (III) pueda acoplarse a la oxidación de algunos donadores de electrones orgánicos e inorgánicos. De igual forma, este proceso es energéticamente favorable comparado con la reducción de sulfatos y la metanogénesis, pero tiene menores rendimientos de energía libre comparado con la reducción de oxígeno y nitratos (Liu et al., 2016; Luu & Ramsay, 2003; Madigan et al., 2009)

En los sistemas biológicos, la mayor reducción del ion Fe (III) es llevada a cabo por la oxidación de productos finales de la fermentación como el acetato, igualmente se ve afectada por la forma en que se encuentre el ion Fe (III), ya que entre más cristalina sea entonces es menos susceptible a la reducción. Una reacción bioquímica típica que se lleva a cabo bajo estas consideraciones es la mostrada por Luu y Ramsay (2003):



La interacción entre los microorganismos y los óxidos de Fe (III) es muy similar a aquella que se da entre los microorganismos-electrodos (Figura 3) (Zhang et al., 2015), a excepción que los microorganismos usan ligandos y/o sideróforos, permitiendo la solubilidad del óxido por la formación de un complejo.

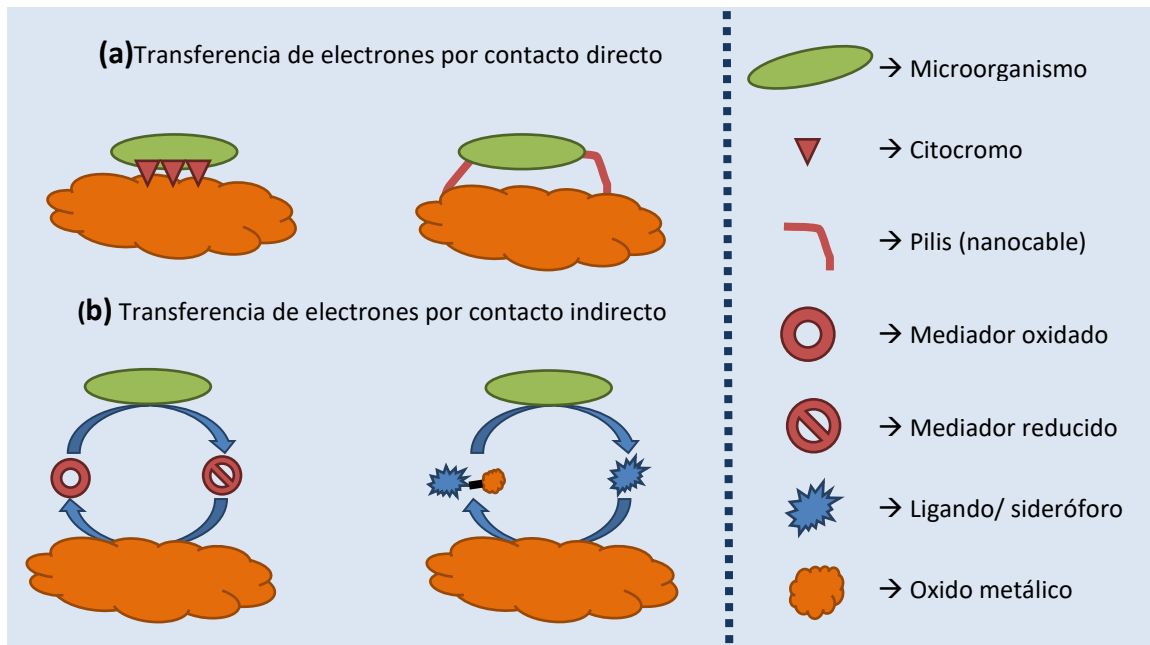


Figura 3. Bosquejo de los modelos de transferencia de electrones entre microorganismos y óxidos metálicos. (a) Transferencia directa, donde los citocromos y/o pilis reducen el óxido metálico; (b) Transferencia indirecta, donde los mediadores redox o ligandos ayudan a la reducción del óxido metálico (Modificado de Esther et al., 2015).

Esta similitud es de gran importancia, ya que las bacterias que pueden reducir el Fe (III) a Fe (II) pueden utilizarse para producir energía eléctrica en CCM (Zhi et al., 2014). Esto significa que la participación de estos microorganismos en las CCM puede ser clave para obtener mejores resultados, haciendo necesario entender el fenómeno biológico involucrado por la presencia de bacterias que reducen metales en la generación de electricidad. La comprensión de esta participación podría permitir también realizar un manejo adecuado de las variables biológicas hacia la producción de energía en las CCM (Folgora et al., 2015).

Por la similitud de los fenómenos de transporte de electrones entre los electrodos y los óxidos metálicos, se reportan experimentos de enriquecimiento para favorecer el crecimiento de las BRDM y así mejorar la eficiencia de las CCM. En un estudio de Pierra et al. (2015) se utilizó sedimento de una planta adaptada a una alta concentración salina, para inocular un medio que contenía Fe (III) como único aceptor de electrones, se inoculó una CCM con sedimento y otra con el cultivo del medio con Fe (III), obteniendo que la celda inoculada con el sedimento generó una eficiencia coulombica alrededor de  $30 \pm 4\%$ , mientras que las CCM con el cultivo en Fe (III) alcanzaron una eficiencia casi del 100%. Este aumento en la eficiencia coulombica es

importante, ya que es uno de los desafíos más importantes que se tienen en los sistemas bioelectroquímicos, buscando que la mayoría de los electrones disponibles contenidos en el sustrato orgánico se transfieran al ánodo para crear un proceso altamente eficiente.

En base a lo anterior se puede señalar que la selección de microorganismos es crucial para un buen funcionamiento de las CCM, por lo cual se han creado diferentes metodologías que permiten la detección de bacterias potencialmente útiles en las CCM. Entre estas metodologías se tiene a la reportada por Szöllősi et al. (2015), quienes evaluaron diversos microorganismos en un medio con Fe (III) considerando la medición de su capacidad de reducción de Fe (III), estableciendo una relación directa entre la cantidad de hierro reducido y la generación de energía eléctrica. Esta estrategia resulta de gran importancia desde un punto de vista metodológico, ya que permite encontrar microorganismos con potencial para ser utilizados en procesos bioelectroquímicos.

## **1.2 Electromicrobiología**

La electromicrobiología estudia la interacción microbio-electrodo (Schröder et al., 2015) abriéndose como una nueva área de investigación que de una forma multidisciplinaria avanzará en el entendimiento de los mecanismos que suceden en el electrodo de un sistema bioelectroquímico por acción de los microorganismos. Como se mencionó anteriormente, algunos microorganismos desarrollaron, a lo largo de millones de años de evolución, estrategias eficaces para el intercambio extracelular de electrones con minerales insolubles y aceptores de electrones o donantes naturales relacionados, tales como óxidos metálicos y compuestos orgánicos (Lovley, 2012). Cuando estas capacidades son usadas en sistemas bioelectroquímicos, se involucran electrodos metálicos o de materiales carbonáceos, útiles en la recolección de electrones para cumplir funciones electroquímicas. Así se establecen interacciones microorganismo-electrodo, que tienen una gran ventana de aplicaciones, entre ellas están la producción de electricidad, tratamiento de residuos y aguas residuales, biorremediación y la producción de productos valiosos.

### 1.2.1 Técnicas electroquímicas usadas en CCM

Para estudiar las interacciones microorganismo-electrodo se utilizan métodos electroanalíticos, que permiten monitorear la generación de corriente eléctrica, caracterizar los mediadores redox y así explicar el posible tipo de transferencia de electrones, comprendiendo el efecto de la formación de la biopelícula sobre la conductividad (Doyle et al., 2015). Muchas de las técnicas utilizadas en las CCM parten de las técnicas usadas en celdas de combustible químicas, entre las más utilizadas se encuentran la cronoamperometría y la voltametría cíclica.

a) La cronoamperometría es una técnica en la que se aplica continuamente un potencial exacto al electrodo de trabajo mientras que simultáneamente mide la salida actual resultante (Bard et al., 2001). En las CCM, los microorganismos intercambiarán los electrones de su metabolismo con el electrodo, siendo necesario cuidar el potencial considerado a aplicarse. En el caso de actividades anódicas, el potencial debe ser lo suficientemente positivo para asegurar la transferencia de electrones desde los citocromos microbianos y/o mediadores redox para que las reacciones sean termodinámicamente favorables, pero no tan altas como para plantear un estrés oxidativo a la célula (Doyle et al., 2015).

El potencial del ánodo, al ser el aceptor final de electrones, determina la ganancia de energía para las bacterias. Cuanto mayor sea la diferencia entre el potencial redox del sustrato y del ánodo, mayor la energía metabólica ganada por la bacteria, pero entre más baja sea, mayor será el voltaje obtenido en la CCM, por lo tanto, el potencial del ánodo debe mantenerse lo más bajo como sea posible. Sin embargo, si el potencial del ánodo se vuelve demasiado bajo, el transporte de electrones será inhibido y la fermentación del sustrato (si es posible) puede proporcionar mayor energía para los microorganismos (Logan et al., 2006). Diversos estudios han optado por establecer un potencial de 200 mV vs Ag/AgCl (Badalamenti et al., 2013). Alternativamente puede ser utilizado un enriquecimiento catódico para que el electrodo actúe como donante del electrón, aplicando potenciales negativos, en este caso se registra una corriente negativa. Aplicar un potencial controlado no sólo afecta al rendimiento de la CCM, sino que también puede tener un impacto en el nivel taxonómico, encontrando diferentes especies según sea el potencial aplicado (Doyle et al., 2015).

b) La voltametría cíclica es un método electroquímico controlado por un potencióstato que facilita la observación de la generación de corriente a través de una ventana de potenciales, permitiendo determinar el comportamiento redox de una especie (Bard et al., 2001). Para esta técnica, el potencial del electrodo de trabajo es escaneado linealmente con el tiempo hasta un valor establecido y luego retornado al punto de partida, con la corriente de respuesta registrada continuamente. Esto genera una curva I vs E, que suele estar poblada por picos característicos correspondientes a la actividad de un mecanismo de transferencia de electrones (es decir, registrar la corriente positiva o negativa que ocurre durante la oxidación o reducción de un citocromo o mediador redox por el electrodo). La altura de estos picos proporciona una visión de la concentración de compuestos redox activos como los mediadores redox de electrones y citocromos; y la distancia entre el pico oxidativo y reductivo ayuda a establecer si un proceso está limitado por difusión (Doyle et al., 2015).

Una desventaja de este método es que sólo proporciona información limitada sobre el mecanismo real de la transferencia de electrones, ya que muchos compuestos redox que son producidos por los microorganismos tienen firmas voltamperométricas muy similares. Finalmente, el potencial y la corriente de las especies electroquímicamente activas en las comunidades dependen fuertemente del material del electrodo e incluso de su biopelícula. Algunas de estas cuestiones pueden resolverse analizando el sobrenadante libre de células con electrodos estándar, como el de oro o carbón vítreo (Doyle et al., 2015).

### 1.2.2 Celdas usadas en sistemas bioelectroquímicos

La celda constituye el corazón de cualquier proceso electroquímico por lo que la viabilidad de un proceso depende del diseño de una celda. En general las celdas se pueden clasificar en: celdas divididas y sin dividir (Figura 4). Las celdas divididas se emplean cuando el producto obtenido en el electrodo de trabajo puede sufrir una transformación en el contra electrodo (cátodo), cuando por motivos de seguridad sea preciso separar los compartimientos, o por la misma naturaleza de la tecnología (Gómez, 1996).

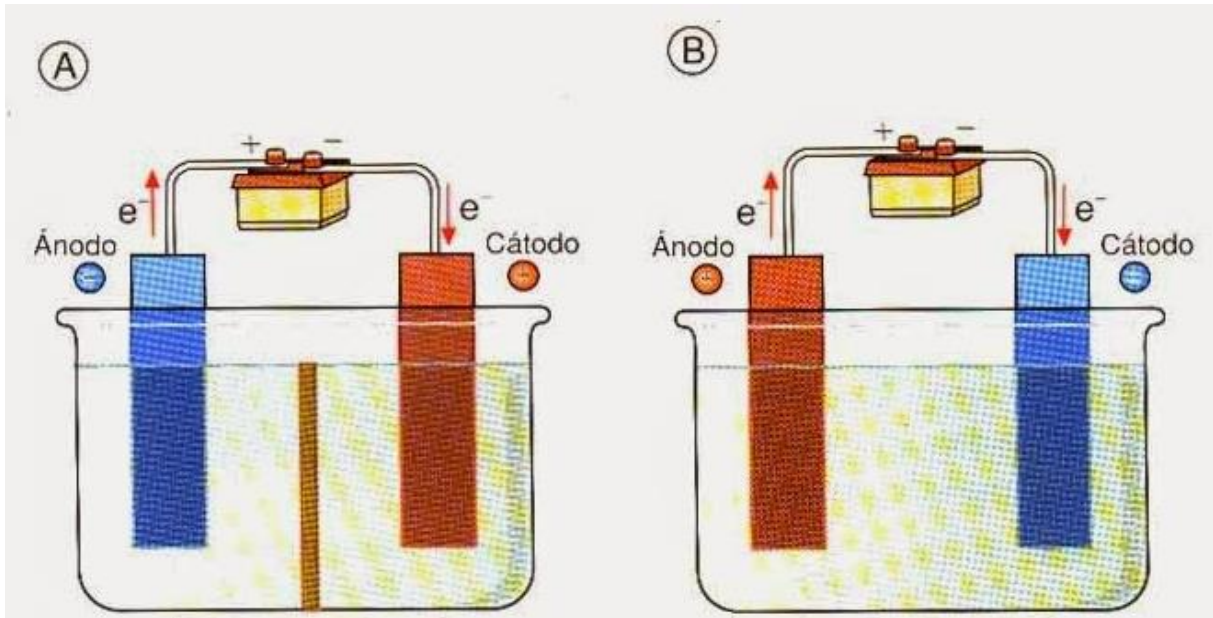


Figura 4. Diseños de celdas electroquímicas, A) celda dividida, B) celda sin dividir.

En el análisis electroquímico de microorganismos, los trabajos publicados indican que la mejor opción es el uso de celdas divididas (Tabla 2), en la cámara anódica se coloca el/los microorganismo/microorganismos a estudiar, con el sustrato de interés, que varía dependiendo del microorganismo, mientras que en la cámara catódica hay un aceptor final de electrones. Por lo general se usa oxígeno pero también se puede utilizar ferricianuro (Xing et al., 2010). En cada cámara se coloca un electrodo, de variados tipos de materiales dependiendo de los alcances de la investigación, entre los más usados se encuentra el fieltro de carbono. Cada electrodo se une mediante una resistencia externa, siendo ampliamente usada la de  $1000 \Omega$ . Otro diseño también utilizado es la celda con el cátodo aireado, donde el cátodo está expuesto al aire, para que el oxígeno del medio ambiente sea el aceptor final de electrones.

Tabla 2. Características de las CCM usadas en el análisis electroquímico de microorganismos.

| Microorganismo                         | Tipo de celda       | Material Ánodo      | Material cátodo     | Resistencia ( $\Omega$ ) | Referencia                 |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>Rhodopseudomonas palustris DX-1</i> | Cátodo aireado      | Cepillo de grafito  | Tela de carbono     | 1000                     | (Xing et al., 2008)        |
| <i>Ochrobactrum anthropi YZ-1</i>      | Celda en forma de U | Tela de carbono     | Fibra de carbono    | 1000                     | (Zuo et al., 2008)         |
| <i>Lysinibacillus sphaericus VA5</i>   | Dos cámaras         | Filtro de carbono   | Filtro de carbono   | 100                      | (Nandy et al., 2013)       |
| <i>Citrobacter sp SX-1</i>             | Cátodo aireado      | Tela de carbono     | Tela de carbono     | 1000                     | (Xu et al., 2011)          |
| <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> | Dos cámaras         | Varillas de grafito | Varillas de grafito | 0.2 V vs Ag/AgCl         | (Badalamenti et al., 2013) |
| <i>Lysinibacillus sphaericus D-8</i>   | Dos cámaras         | Filtro de carbono   | Filtro de carbono   | 1000                     | (He et al., 2014)          |
| <i>Comamonas denitrificans</i>         | Dos cámaras         | Cepillo de grafito  | Tela de carbono     | 1000                     | (Xing et al., 2010)        |
| <i>Citrobacter freundii</i>            | Cátodo aireado      | Filtro de carbono   | Papel de carbono    | 1000                     | (Huang et al., 2015)       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa ZH1</i>      | Dos cámaras         | Grafito             | Grafito             | 10000                    | (Nor et al., 2015)         |
| <i>Geoalkalibacter subterraneus</i>    | Dos cámaras         | Varillas de grafito | Varillas de grafito | 0.2 V vs Ag/AgCl         | (Badalamenti et al., 2013) |
| <i>Acidiphilum cryptum</i>             | Dos cámaras         | Filtro de carbono   | Tela de carbono     | 500                      | (Borole et al., 2008)      |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>     | Dos cámaras         | Filtro de carbono   | Filtro de carbono   | 100                      | (Kang et al., 2014)        |
| <i>Ochrobactrum sp</i>                 | Dos cámaras         | Cepillo de carbono  | Alambre de titanio  | 1.8                      | (Li et al., 2014)          |
| <i>Cornebacterium sp</i>               | Cátodo aireado      | Filtro de carbono   | Filtro de carbono   | 1000                     | (Liu et al., 2010)         |
| <i>Kocuria rhizophila</i>              | Cátodo aireado      | Malla de carbono    | Malla de carbono    | 1000                     | (Luo et al., 2015)         |



|                                 |             |                    |                    |                |                             |
|---------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|----------------|-----------------------------|
| <i>Thermincola ferriacetica</i> | Dos cámaras | Varilla de grafito | Varilla de grafito | -0.06 V vs SHE | (Parameswaran et al., 2013) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | Dos cámaras | Filtro de carbono  | Filtro de carbono  | 10000          | (Zhang et al., 2008)        |

Aunque la mayoría de los autores reportan celdas divididas es conveniente usar celdas sin dividir, con una configuración de tres electrodos o semicelda controlada por un potenciostato, debido a que sus ventajas respecto a las celdas divididas son: a) menor consumo específico de energía al eliminar un electrolito y la membrana, b) sistema de distribución hidráulica más sencillo, c) diseño más sencillo, por lo que tiene menores costes de inversión y mantenimiento, y por último, d) mayor rendimiento espacio-tiempo.

Al estar controlado el sistema por un potenciostato se tiene un mayor control en la celda, por lo cual es mejor la caracterización electroquímica del microorganismo. En estos sistemas se debe aplicar un potencial al ánodo, para suministrar la energía necesaria que permita conducir un proceso que de otra manera sería desfavorable termodinámicamente, en términos de potencial electroquímico del donante y del aceptor del electrón (Doyle et al, 2015).

### 1.2.3 Transferencia extracelular de electrones

Como se mencionó anteriormente, en las CCM se encuentran microorganismos que tienen la capacidad de transferir sus electrones a un aceptor final externo, este fenómeno se denomina transferencia extracelular de electrones (TEE), y se encuentra en microorganismos que pueden oxidar completamente los compuestos orgánicos a dióxido de carbono con electrodos de grafito o de metales, o con óxidos de metales como Fe (III) o Mn (IV) que actúan como el aceptor de electrones. En las CCM, este proceso desempeña un papel clave en la producción de energía, ya que los microorganismos que poseen dicha capacidad son prometedores catalizadores para la conversión eficiente de una variedad de desechos orgánicos a electricidad, y simultáneamente producen una biomasa renovable (Reguera et al., 2006; Choi et al., 2015; Schröder et al., 2015).

*Geobacter metallireducens* fue una de las primeras bacterias aisladas con TEE y es también la más estudiada en el área. Es una bacteria Gram-negativa, bacilo Deltaproteobacteria de

la familia *Geobacteraceae*, aislada en 1987 del sedimento de agua dulce del río Potomac en Washington D.C, por el Dr. Derek Lovley. *G. metallireducens* tiene la capacidad de transferir electrones a los iones Fe (III) y Mn (IV), óxidos de nitrógeno, sustancias de alto peso molecular formadas por la degradación química y biológica de restos de plantas y de animales. Además, permite la transferencia de electrones de forma directa a los electrodos generando pequeñas corrientes eléctricas (Romero et al., 2012). Otro microorganismo frecuentemente estudiado es *Shewanella oneidenses*, una Proteobacteria de la familia *Shewanellaceae*, que se aisló por primera vez en el lago Oneida de Nueva York en 1988, de donde deriva su nombre. *S. oneidenses* es una bacteria que reduce metales pesados tóxicos y puede vivir en casi cualquier tipo de ambiente, con o sin oxígeno (Hau et al., 2007).

*G. metallireducens* y *S. oneidenses* no son los únicos microorganismos con esta capacidad, entre los microorganismos con TEE se encuentran especies de los filos Proteobacteria, *Firmicutes* (endobacterias), *Acidobacteria*, algunas microalgas, levaduras y hongos. En la Tabla 3 se muestra un listado de los microorganismos reportados en artículos relacionados con generación de energía eléctrica y sus principales compuestos y/o proteínas involucrados en la transferencia de electrones (Kumar et al., 2015).

Tabla 3. Microorganismos electroquímicamente activos con transferencia extracelular de electrones. Modificado de Kumar et al., 2015.

| Microorganismos                   |               | Densidad de potencia   | Proteínas /<br>Compuestos<br>involucrados en la<br>transferencia<br>extracelular de<br>electrones |
|-----------------------------------|---------------|------------------------|---|
| <i>Shewanella putrefaciens</i>    | Bacteria      | 4920 mW/m <sup>3</sup> | Citocromo c   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Bacteria      | 4310 mW/m <sup>2</sup> | Piocianina, fenazina-1-carboxamida  |
| <i>Shewanella oneidensis</i>      | Bacteria      | 3000 mW/m <sup>2</sup> | Flavinas, riboflavinas  |
| <i>Rhodopseudomonas palustris</i> | Bacteria      | 2720 mW/m <sup>2</sup> | Citocromo c   |
| <i>Geobacter metallireducens</i>  | Bacteria      | 40 mW/m <sup>2</sup>   | Citocromo c   |
| <i>Ochrobactrum sp.</i>           | Bacteria      | 2625 mW/m <sup>3</sup> | Desconocido *   |
| <i>Chlorella vulgaris</i>         | Alga          | 2485 mW/m <sup>3</sup> | Desconocido *   |
| <i>Coriolus versicolor</i>        | Alga          | 320 mW/m <sup>3</sup>  | Desconocido *   |
| <i>Arthrospira maxima</i>         | Cianobacteria | 10 mW/m <sup>3</sup>   | Desconocido *   |

|                                  |               |                        |               |
|----------------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| <i>Scenedesmus sp.</i>           | Alga          | 1926 mW/m <sup>2</sup> | Desconocido * |
| <i>Cyanobacteria sp.</i>         | Cianobacteria | 114 mW/m <sup>2</sup>  | Desconocido * |
| <i>Lysinibacillus sphaericus</i> | Bacteria      | 85 mW/m <sup>2</sup>   | Desconocido * |

| Microorganismos                    |          | Densidad de corriente   | Proteínas /<br>Compuestos<br>involucrados en la<br>transferencia<br>extracelular de<br>electrones |
|------------------------------------|----------|-------------------------|---|
| <i>Thermincola ferriacetica</i>    | Bacteria | 12000 mA/m <sup>2</sup> | Antraquinona – 2,6 –<br>disulfato.  |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i>    | Bacteria | 3147 mA/m <sup>2</sup>  | Pilis tipo IV,<br>Citocromo c   |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | Bacteria | 233 mA/m <sup>2</sup>   | Citocromo c   |
| <i>Klebsiella pneumonia</i>        | Bacteria | 199 mA/m <sup>2</sup>   | 2,6-di- terbutil-p-<br>benzoquinona   |
| <i>Escherichia coli</i>            | Bacteria | 3390 mA/m <sup>2</sup>  | Desconocido *   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | Levadura | 282 mA/m <sup>2</sup>   | Desconocido *   |
| <i>Citrobacter sp.</i>             | Bacteria | 205 mA/m <sup>2</sup>   | Desconocido *   |

Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de densidad de potencia obtenidos por *S. putrefaciens* son mayores que los de *S. oneidensis*, a pesar de pertenecer a la misma familia. Esta diferencia puede radicar en la diferencia que tienen los mecanismos de transferencia de electrones usados por cada especie. Para el caso de la generación de densidad de corriente, *Thermincola ferriacetica* y *Escherichia coli* producen los más altos valores, pero sólo se ha determinado el mecanismo de transferencia de electrones por mediadores redox para el primero de estos. Las especies *G. metallireducens* y *S. oneidenses* son ampliamente conocidas y usadas para la investigación de los microorganismos electroquímicamente activos (Debabov, 2008). Pero este hecho, no determina que *G. metallireducens* y *S. oneidenses* generen los valores más altos de densidad de potencia y/o corriente. En este sentido, es posible que exista una amplia gama de microorganismos que aún no se han aislado y con potencial de ser usados en CCM. Además, resultaría muy importante entender los mecanismos de transporte de electrones y su relación con el metabolismo microbiano.

Es importante resaltar que el proceso de transferencia de electrones desde la cadena respiratoria de un microorganismo hasta el electrodo es crucial para la operación de una CCM.

Estos procesos están siendo investigados para explicar los mecanismos involucrados. Algunos autores comienzan a llamar a dicho proceso como una nueva forma de respiración llamada respiración anódica (Torres, 2014). La TEE se puede categorizar en dos tipos, la transferencia directa y transferencia indirecta de electrones (Figura 5) (Rabaey et al., 2010).

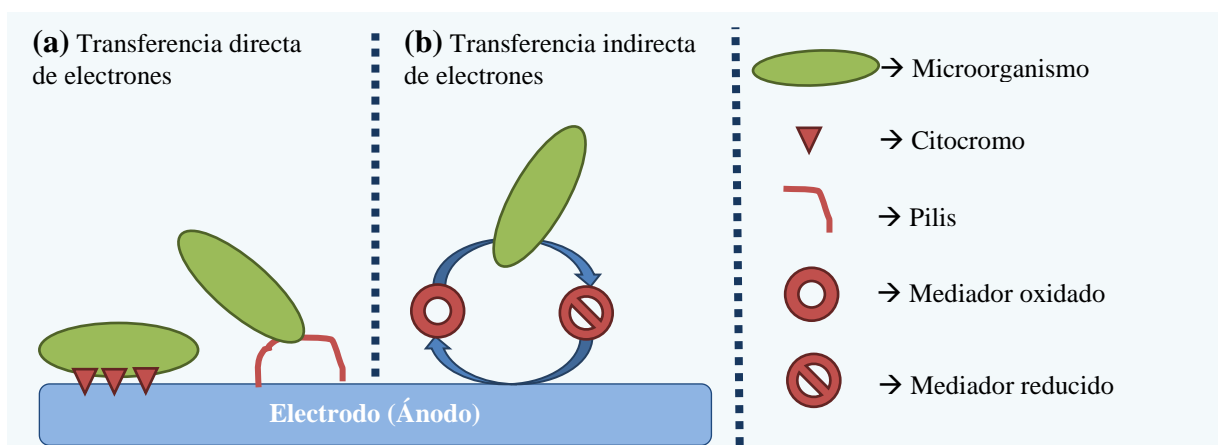
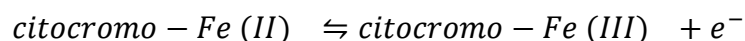


Figura 5. Representación de los métodos de transferencia de electrones de los microorganismos hacia los electrodos, (a) Transferencia directa, en el cual los citocromos y/o pilis transfieren los electrones al electrodo; (b) Transferencia indirecta, donde los mediadores redox ayudan en la transferencia de electrones al electrodo.

#### 1.2.4 Transferencia directa

Los electrones producidos durante el metabolismo microbiano pueden ser transferidos hacia los electrodos por medio de los citocromos dispuestos en la membrana y/o pili eléctricamente conductivos como se observa en la Figura 5a (Kumar et al., 2015).

Los citocromos son proteínas que tienen como grupo prostético a un anillo porfirínico con hierro (grupo hemo). Los citocromos llevan a cabo oxidaciones y reducciones mediante la pérdida o ganancia de electrones aislados por el átomo de hierro situado en el centro de la molécula, de acuerdo con la siguiente reacción:



Existen varias clases de citocromos cuya diferencia radica en sus potenciales de reducción. Un citocromo puede transferir electrones a un aceptor (citocromo, quinona, Fe/S)

siempre que tenga un potencial de reducción mas positivo y pueda a su vez, aceptar electrones de un donador con un potencial de reduccion menos negativo. Los distintos citocromos se designan por letras (a, b, c) dependiendo del tipo hemo que contengan (Madigan et al., 2009). Los citocromos c de la membrana externa y los pilis de las células conductoras ayudan a facilitar la transferencia directa de electrones (Patil et al., 2012). Los resultados experimentales sugieren que el complejo OmcZ es el citocromo C más importante en las biopelículas (Ravinder et al., 2015).

Para el flujo de electrones en los pilis existen tres mecanismos principales para la transferencia: *tunneling*, *hopping* y *delocalization* (conductividad metálica). En los mecanismos de *tunneling* y *hopping* los electrones están asociados con portadores discretos que pueden atravesar uno o más sitios para migrar a grandes distancias. El mecanismo de *delocalization* es sustancialmente diferente a los de *tunneling* y *hopping*, ya que en lugar de que los electrones se ubiquen en moléculas individuales, los electrones se encuentran deslocalizados a lo largo de una cadena de moléculas y son libres de moverse por todo el material (Malvankar y Lovley, 2014).

#### 1.2.5 Transferencia indirecta

La transferencia indirecta de electrones se lleva a cabo cuando sustancias solubles o insolubles llamadas mediadores redox participan como intermediarios en el transporte de electrones entre el electrodo y los microorganismos (Figura 5b). Dichas sustancias son reducidas por el microorganismo y se oxidan en el electrodo, completándose así el transporte de electrones. Muchos microorganismos con transferencia extracelular de electrones secretan mediadores redox para promover la transferencia de electrones a los electrodos (Logan, 2007).

En algunos casos, estos mediadores redox se añaden a las CCM, porque ayudan a la transferencia de electrones del microorganismo al electrodo, al igual que ciertos microorganismos que no tienen respiración extracelular pero que pueden utilizar estos mediadores para la transferencia de electrones, como es el caso de las levaduras (Hubenova et al., 2015). Estos últimos son microorganismos más complejos en comparación a bacterias y de un gran interés biotecnológico. Algunos de los mediadores redox identificados son fenazinas, flavinas, enzimas solubles, melanina y ácidos húmicos (Logan, 2007).

Así, para conocer mejor los fenómenos involucrados en el proceso de transferencia de electrones desde la cadena respiratoria de un microorganismo hasta el electrodo, es importante contar con el microorganismo aislado, lo cual permitirá conocer y analizar la especie a mayor detalle.

### **1.3 Aislamiento e identificación de microorganismos provenientes de celdas de combustible microbianas**

Cuando se quiere conocer y analizar una especie es importante saber su entorno ambiental y su contexto biológico. El contexto biológico se refiere a las especies con las que coexiste y en muchos casos de las que depende. En el caso de los organismos macroscópicos es más sencilla la caracterización y conteo de las diferentes especies, pero en los microorganismos esta caracterización se complica, por lo que en las últimas décadas se han desarrollado diferentes estrategias, principalmente moleculares, para identificar las especies o grupos de microorganismos que constituyen una comunidad (Escalante, 2007). Aunque es necesario considerar que en un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismo, ya que existen las comunidades microbianas, como las biopelículas.

Una biopelícula se puede definir como colonias de células microbianas incorporadas en una matriz polimérica compleja, de producción propia, unida a una superficie biótica o abiótica. Las biopelículas pueden estar formadas por una especie individual (biopelícula de cultivo puro) o por múltiples especies (biopelícula de cultivo mixto y microbiomas) (Kumar et al., 2015). Así, los microbiomas se definen como comunidades de microorganismos naturalmente agrupadas para un fin determinado. Estos se componen de múltiples especies individuales, que viven en simbiosis, interconectadas y con un alto nivel de organización funcional (Koch et al., 2014). Por lo que, para realizar estudios detallados y controlados en laboratorio, que permitan conocer las características y su posible aplicación en la biotecnología, se debe dar inicio con el aislamiento de los microorganismos (Madigan et al., 2009).

#### **1.3.1 Aislamiento de microorganismos provenientes de una CCM**

Un modo de estudiar las comunidades microbianas de un sistema consiste en aislar los microorganismos y estudiar sus propiedades en cultivos de laboratorio. A partir del conocimiento de los microorganismos presentes y de sus capacidades metabólicas, se pueden extraer conclusiones sobre cómo funciona el ecosistema microbiano. El aislamiento requiere separar los diferentes microorganismos de la comunidad, para obtener un cultivo axénico (que contiene una sola clase de microorganismo), con lo que se podrán realizar estudios

experimentales en el laboratorio y ver sus aplicaciones en los campos de la biotecnología, microbiología industrial y ambiental (Madigan et al., 2009).

Los procedimientos de aislamiento habituales incluyen la siembra en placa por estrías, la siembra en profundidad y la dilución líquida. Una de las estrategias que utilizan muchos investigadores para obtener un cultivo axénico, es el método de dilución a la extinción, basado en una serie de diluciones seriadas, hasta el punto en el que una sola célula pueda crecer en los medios de cultivo, creando así una colonia única y visible. El problema de este método es que aísla la bacteria en mayor abundancia de la comunidad, por lo cual sería recomendable, un cultivo previo de enriquecimiento, para que las bacterias con las características que se buscan estén en mayor cantidad (Zhi et al., 2014).

En un cultivo de enriquecimiento se establecen las condiciones necesarias al crecimiento de los microorganismos que se desean aislar, es decir, tanto los nutrientes como las condiciones se optimizan para tener una mayor probabilidad de obtener el organismo deseado, así como el uso de diferentes medios enriquecidos que permitan el crecimiento de varios tipos de microorganismos (Madigan et al., 2009).

En el aislamiento de microorganismos con respiración extracelular, como el caso de *G. metallireducens*, algunos de los componentes de los medios que comúnmente son usados para su aislamiento son acetato de sodio (como donador de electrones), cloruro férrico (receptor de electrones), extracto de levadura y sales minerales (Lovley et al., 1988). Este medio permite el crecimiento de microorganismos con respiración extracelular y con la capacidad de transferir extracelularmente sus electrones ( $\text{Fe (III)} + e^- \rightarrow \text{Fe (II)}$ ). El uso de acetato de sodio se debe a que este ácido orgánico es el más abundante en ecosistemas termófilos, condición que permite a los microorganismos que tienen una respiración extracelular, degradar y reducir algunos compuestos de su entorno a otros como nitrato, óxidos metálicos, sulfatos, convirtiendo al acetato en dióxido de carbono y/o metano (Tor et al., 2001).

Un estudio pionero en aislar microorganismos provenientes de CCM es el de Pham et al. (2003), quienes aislaron una cepa de *Aeromonas hydrophila*, directamente de la cámara anódica de una CCM que contenía agua residual artificial. En años posteriores, el grupo de trabajo de Xing et al. (2008 y 2010) aislaron una cepa de *Rhodopseudomonas palustris* y posteriormente



aislaron una cepa de *Comamonas denitrificans*. A partir de ello, se comenzó a investigar más acerca de los microorganismos provenientes de CCM.

En Tabla 4 se muestran los medios utilizados en el aislamiento de microorganismos provenientes de los ánodos de las CCM, entre los medios más utilizados son el medio Luria Bertani y nutritivo, que son medios típicamente utilizados para el crecimiento de bacterias, pero estos medios no son selectivos, lo que permite que crezcan una gran variedad de microorganismos. Otros autores utilizan medios enriquecidos con Fe (III) similares a los de Lovley (1986), comprobando que son útiles en el aislamiento de microorganismos con respiración extracelular.

Tabla 4. Microorganismos aislados de CCM y los medios usados para su aislamiento.

| Microorganismo                         | Medio usado para el aislamiento    | Densidad de potencia (mW/m <sup>2</sup> ) | Densidad de corriente (mA/m <sup>2</sup> ) | Referencia              |
|--|------------------------------------|---|--|-------------------------|
| <i>Rhodopseudomonas palustris DX-1</i> | Sintético enriquecido con Fe (III) | 2720                                      | 0.99                                       | (Xing et al., 2008)     |
| <i>Ochrobactrum anthropi YZ-1</i>      | Luria Bertani                      | 89  | 708  | (Zuo et al., 2008)      |
| <i>Lysinibacillus sphaericus VA5</i>   | Nutritivo                          | 85  | 270  | (Nandy et al., 2013)    |
| <i>Citrobacter sp SX-1</i>             | Sintético enriquecido con Fe (III) | 88.1                                      | 205  | (Xu et al., 2011)       |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>            | Sintético enriquecido con Fe (III) | N/I                                       | 0.3  | (Pham et al., 2003)     |
| <i>Lysinibacillus sphaericus D-8</i>   | Luria Bertani                      | 92  | 142  | (He et al., 2014)       |
| <i>Comamonas denitrificans</i>         | Luria Bertani                      | 35  | 5.9  | (Xing et al., 2010)     |
| <i>Citrobacter freundii</i>            | Sintético enriquecido con Fe (III) | 204.5                                     | 205  | (Huang et al., 2015)    |
| <i>Kocuria rhizophila</i>              | Luria Bertani                      | 102                                       | N/I  | (Luo et al., 2015)      |
| <i>Pseudomonas sp.</i>                 | Nutritivo                          | 173.3                                     | 288.8                                      | (Manogari et al., 2015) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | Nutritivo                          | 451.26                                    | 654.90                                     | (Nor et al., 2015)      |
| <i>Klebsiella sp.</i>                  | Sintético enriquecido con Fe (III) | N/I                                       | 87.5                                       | (Lee et al., 2016)      |
| <b>N/I: No hay información.</b>        |                                    |   |  |                         |

El uso del ion Fe (III) en los medios se debe a que el primer fenómeno asociado a la transferencia extracelular de electrones se encontró en microorganismos reductores de dicho metal. Posteriormente, se investigó más acerca de este fenómeno, encontrando que no solo este metal se puede reducir, sino también otros metales tales como Co (III), Cr (IV) y Mn (IV) (Esther et al., 2014). Los microorganismos con respiración extracelular pueden reducir el ion Fe (III) a Fe (II), pero no se pueden usar todas las formas de hierro. En el laboratorio por lo general se usan tres formas que son cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), pirofosfato férrico ( $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ ) y citrato férrico ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ ) (Pham et al., 2003; Zuo et al., 2008; Xu et al., 2011; Huang et al., 2014).

Otra metodología que se usa para el aislamiento de microorganismos es usar una CCM especial en forma de U, donde se permite establecer el crecimiento de microorganismos en el ánodo. Este método consiste en inocular la celda referida cuando se presenta un pico de corriente eléctrica, transferir a un buffer de fosfatos estéril el ánodo, agitar y realizar diluciones hasta un punto final de  $10^{-8}$ . De la última dilución se toma una muestra que vuelve a ser inoculado a la CCM en forma de U. En cada paso del procedimiento se realiza una electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización hasta que el gel muestre una sola banda (Zhi et al., 2014; Zuo et al., 2008). El uso de electroforesis en gel resulta tardado y con necesidad de entrenamiento para el desarrollo de la técnica por lo que no resulta adecuada cuando se trata de realizar un tamizaje de varias muestras. Además, solo es posible el aislamiento de un solo tipo de microorganismo del inóculo inicial, discriminando a todas las demás bacterias presentes en el sistema, que podrían estar relacionadas con las respuestas observadas en conjunto del sistema como la generación de corriente.

Una vez que se obtiene una colonia de un solo tipo de microorganismo se procede a su identificación por diferentes técnicas. Algunos autores realizan pruebas bioquímicas (Pham et al., 2003; Nor et al., 2015) útiles para identificar de forma clara y precisa la presencia o ausencia de una actividad enzimática o de una vía metabólica completa en el microorganismo estudiado. También se pueden utilizar técnicas de microscopía electrónica de barrido para observar la morfología tridimensional de las estructuras de los microorganismos (Negroni, 2009; Xu et al., 2011). Finalmente, es importante resaltar el uso de técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos aislados desde CCM, usando por ejemplo metodologías de biología molecular, como la secuenciación del 16S ARNr.

### 1.3.2 Identificación molecular de microorganismos

Históricamente, la identificación y clasificación de los microorganismos se basó en sus características fenotípicas. Con el descubrimiento del ADN, se comenzaron a usar técnicas moleculares para la clasificación de bacterias como la determinación del porcentaje de guanina y citosina (%GC), perfilado de plásmidos y la compatibilidad con la transformación genética. En la actualidad hay dos aplicaciones moleculares que son ampliamente usadas en la detección e identificación de bacterias, basadas en la hibridación y secuenciación de nucleótidos. Estas aplicaciones ayudan en el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos, puesto que los segmentos de ácidos nucleicos, con o sin función conocida, proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Barghouthi, 2011).

En el análisis comparativo de secuencias de procariontes es muy útil usar el ARNr, específicamente el 16S ARNr, porque son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia esta moderadamente conservada, presentando una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución, lo cual es útil en la detección de bacterias. Dado el elevado número de diferentes secuencias posibles de moléculas, la similitud de dos secuencias indica alguna relación filogenética (Madigan et al., 2009) que proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. La secuencia del gen 16S ARNr se compone de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), que a su vez se dividen en zonas variables y zonas conservadas. El tamaño proporciona suficientes polimorfismos interespecíficos para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas para el análisis filogenético. Los iniciadores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas en el inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del gen. Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas, son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa. Gracias a estas propiedades, el 16S ARNr es el "estándar de oro" en la identificación de bacterias (Fernández et al., 2010).

El primer paso para la detección e identificación de bacterias consiste en extraer y purificar el ADN genómico (ADNg) de un cultivo puro. En la actualidad existen kits donde se obtienen moléculas de ADN integras y con mayor pureza. Una vez obtenido el ADNg se amplifica la región de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto, se requiere conocer una secuencia de la región del gen deseado, y en la identificación de microorganismos, es común usar iniciadores universales que son secuencias complementarias del 16S ARNr (Barghouthi, 2011; Alejos-Velázquez et al., 2014). En Tabla 5 se muestran algunos microorganismos aislados de CCM y los iniciadores (primers) usados en su identificación. En las publicaciones referenciadas se usa principalmente el par de iniciadores 27 F y 1492 R, los cuales abarcan gran parte del 16S ARNr, lo que proporciona suficiente poder discriminatorio al tener una secuencia mayor a 500 bases, y así, se tiene mayor certeza del género y especie al que pertenece el microorganismo de interés.

Tabla 5. Iniciadores usados en la identificación de microorganismos presentes en sistemas bioelectroquímicos

| Microorganismo                         | Iniciador hacia adelante | Iniciador reverso | Uso de clonas | Referencia             |
|--|--------------------------|-------------------|---------------|------------------------|
| <i>Rhodopseudomonas palustris DX-1</i> | 27 F                     | 1541 R            | Si            | (Xing et al., 2008)    |
| <i>Ochrobactrum anthropi YZ-1</i>      | 8 F                      | 1401 R            | Si            | (Zuo et al., 2008)     |
| <i>Lysinibacillus sphaericus VA5</i>   | Y1 F                     | Y2 R              | No            | (Nandy et al., 2013)   |
| <i>Citrobacter sp SX-1</i>             | 27 F                     | 1492 R            | Si            | (Xu et al., 2011)      |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>            | 27 F                     | 1492 R            | Si            | (Pham et al., 2003)    |
| <i>Lysinibacillus sphaericus D-8</i>   | 27 F                     | 1492 R            | Si            | (He et al., 2014)      |
| <i>Comamonas denitrificans</i>         | 968 F                    | 1401 R            | Si            | (Xing et al., 2010)    |
| <i>Citrobacter freundii</i>            | 27 F                     | 1492 R            | No            | (Huang et al., 2015)   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa ZH1</i>      | Fd1                      | Rp1               | No            | (Nor et al., 2015)     |
| <i>Klebsiella sp.</i>                  | 341 F                    | 907 R             | No            | (Lee et al., 2016)     |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i>        | 50 F                     | 1492 R            | No            | (Caccavo et al., 1994) |
| <i>Corynebacterium humireducen</i>     | 8F                       | 1492 R            | No            | (Wu et al., 2011)      |

El siguiente paso en la identificación de microorganismos consiste en quitar todos los residuos del producto de la PCR, en este punto se puede secuenciar, sin embargo, para obtener mayor calidad y por ende más confiabilidad de los datos obtenidos se realizan clonas del

fragmento del gen de interés en vectores; el vector de clonación usado por excelencia son los plásmidos. La mayoría de las investigaciones en la identificación de microorganismos suelen usar clonas, lo que permite la amplificación del gen de interés, en grandes cantidades, y así obtener una mayor concentración, haciendo más fácil la detección durante el proceso de secuenciación (Madigan et al., 2009; Márquez et al., 2014).

Entonces, la secuenciación se basa en conocer el orden que tienen los nucleótidos, esto es de gran interés debido a que la diferencia fundamental de los seres vivos se basa en el orden de las bases nitrogenadas. Así, la secuenciación es una herramienta que ha permitido entender la asociación de enfermedades con la variabilidad genética, la función de genes, el patrón de expresión de genes nuevos, la similitud o variación genética entre especies diferentes, la organización de la información genética y el origen de los genes. Cuando se inició a utilizar como herramienta a la secuenciación se trataba de un proceso muy costoso y complicado, pero en el año 1977 surgió la secuenciación Sanger como una técnica que revolucionó a la biología molecular. Desde entonces, este método se utiliza ampliamente en muchas líneas de investigación, surgiendo la necesidad de crear bases de datos para resguardar la información y hacerla accesible. La base de datos más común y más usada es el Gen Bank a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Márquez et al., 2014).

El último paso para la identificación de microorganismos consiste en el análisis de datos, mediante la comparación y alineamiento de la secuencia en las bases de datos disponibles. Se puede llevar a cabo mediante programas de cómputo que usan distintos algoritmos de búsqueda, siendo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) el más usado por conjuntar diferentes bases de datos ubicadas en internet; la Figura 6 muestra un diagrama de flujo de los pasos utilizados para el proceso de secuenciación. El alineamiento proporciona el porcentaje de similitud y de cobertura que, para la identificación de cultivos puros de bacterias, suele ser considerado con una similitud superior al 98% para asignar a la misma especie; los que tienen una similitud entre 98% y 95% se asignan al mismo género, y los que tienen una similitud del 80% son normalmente asignados al mismo phylum (Zhi et al., 2014). Las secuencias que tienen similitudes bajas (menores a 95%) es probable que se deba a la falta de disponibilidad de la secuencia de alineación o debido a la detección de una nueva especie, este potencial para descubrir nuevas especies debe descartarse como un error experimental con otros métodos, por

ejemplo, pruebas clásicas (medios de cultivo y bioquímicas) y por secuenciación de genes específicos de la especie o incluso, del genoma completo. La secuencia obtenida (ADNr o genoma completo) debe depositarse entonces en una de las bases de datos de nucleótidos (Barghouthi, 2011; Márquez et al., 2014).

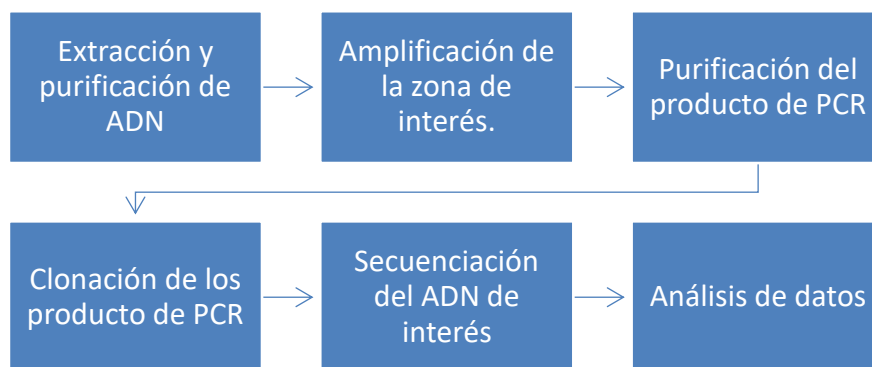


Figura 6. Diagrama de flujo para la identificación molecular de microorganismos.

Cuando se comparan dos secuencias es posible obtener la relación de parentesco, pero si se considera la información de más de dos secuencias, será posible conocer si determinada característica de un organismo es producto de la selección natural o de otros procesos evolutivos, lo cual permite analizar la historia de evolución o desarrollo de cualquier grupo, especie o raza de organismo, este tipo de estudio recibe el nombre de filogenia (Martínez Castilla, 2007).

La reconstrucción filogenética se ha convertido en un componente indispensable de los estudios basados en el método comparativo. Unas de las técnicas básicas en la comparación de secuencias son los arboles filogenéticos, que proporcionan la diferencia entre los genomas de especies vivas acumuladas a lo largo de más de 3 mil millones de años, con base en la reconstrucción de la evolución de los genomas a partir de la comparación detallada de los genomas contemporáneos. Un árbol consiste en nodos conectados por ramas (también llamadas bordes o aristas) donde los nodos terminales (también llamados otus que son unidades taxonómicas operativas, hojas o taxa terminales) representan secuencias u organismos de los que tienen datos. Los nodos internos representan a los ancestros hipotéticos y el ancestro de todas las secuencias comprendidas en el árbol es la raíz del árbol (Martínez Castilla, 2007). Existen diferentes tipos de modelos para los análisis filogenéticos, las estrategias de selección de modelos se basan en encontrar el nivel de complejidad apropiado con base en los datos. El

modelo más utilizado es el de *Neighbor Joining*, pues es un método comparativamente rápido y descubre la filogenia correcta si las secuencias analizadas cumplen con el supuesto de homogeneidad de tasas de divergencia (Martínez Castilla, 2007).

Así, en el entendimiento de los procesos bioelectroquímicos, el uso de herramientas de identificación y caracterización genética puede aportar información valiosa para avanzar en el conocimiento de la participación de los microorganismos, que junto a las técnicas electroanalíticas permitan dilucidar los fenómenos desarrollados en las celdas de combustible microbianas como es la generación de corriente eléctrica, los procesos de transferencia de electrones, el efecto de la biopelícula en la conductividad, etc.

## 2 Justificación

La generación de energía usando CCM es afectada por varios factores, siendo uno de los más cruciales los tipos de microorganismos que conforman el microbioma establecido en el bioanodo de la celda. En la actualidad, esta es un área de conocimiento que puede ser ampliamente explorada, ya que el aislamiento e identificación de los integrantes del microbioma de un sistema bioelectroquímico puede proporcionar información acerca de los microorganismos directamente involucrados en la generación de energía eléctrica si se trata de una celda de combustible microbiana. Al mismo tiempo, podría permitir avanzar en el análisis de los posibles mecanismos de transferencia de electrones donde participen los microorganismos aislados, ya que la mayoría de las investigaciones se centran con especies de los géneros *Geobacter* y *Shewanella*.

La justificación de este trabajo se basa en considerar que el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en el ánodo de una celda de combustible microbiana permitirá obtener microorganismos involucrados en la generación de energía eléctrica y mediante su análisis se podrá avanzar en la explicación de los fenómenos bioelectroquímicos asociados.



### **3 Hipótesis**

El aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en el microbioma de una celda de combustible microbiana permitirá caracterizar aquellos con capacidad de reducción de Fe (III) y explicar su participación en la producción de densidad de corriente.

### **4 Objetivo General**

Caracterizar los microorganismos presentes en el microbioma de celdas de combustible microbianas que estén involucrados en la generación de densidad de corriente, específicamente aquellos con capacidad de reducción de Fe (III).

#### **4.1 Objetivos específicos**

- 1) Obtener biopelículas formadas sobre electrodos (ánodos) en dos diseños diferentes de celdas combustible microbianas.
- 2) Aislar microorganismos de biopelículas formadas en celdas de combustible microbianas mediante técnicas microbiológicas.
- 3) Identificar los microorganismos aislados de biopelículas desarrolladas en celdas de combustible microbianas, mediante técnicas de biología molecular como PCR, clonación, y secuenciación.
- 4) Identificar los microorganismos con capacidad de degradación de Fe (III), de aquellos aislados previamente.
- 5) Caracterizar los microorganismos seleccionados con mejor capacidad de reducción de Fe (III) mediante técnicas electroquímicas.

## 5 Metodología

### 5.1 Obtención de biopelículas

Para esta tarea experimental se instalaron cinco celdas de combustible microbianas, tres unidades tuvieron una configuración de celdas de una cámara y las restantes una configuración de dos cámaras. En estos sistemas se usaron como ánodo piezas de fieltro de carbono con una dimensión de 2 cm x 2 cm. Como cátodo se usaron diferentes materiales dependiendo de la celda; en las celdas de una cámara se usó alambre de acero inoxidable, mientras que en las celdas de dos cámaras se usó fieltro de carbono. Para cerrar el circuito se usó una resistencia externa de 1 k $\Omega$  conectada mediante caimanes. En la Figura 7 se muestran las unidades de CCM utilizadas.

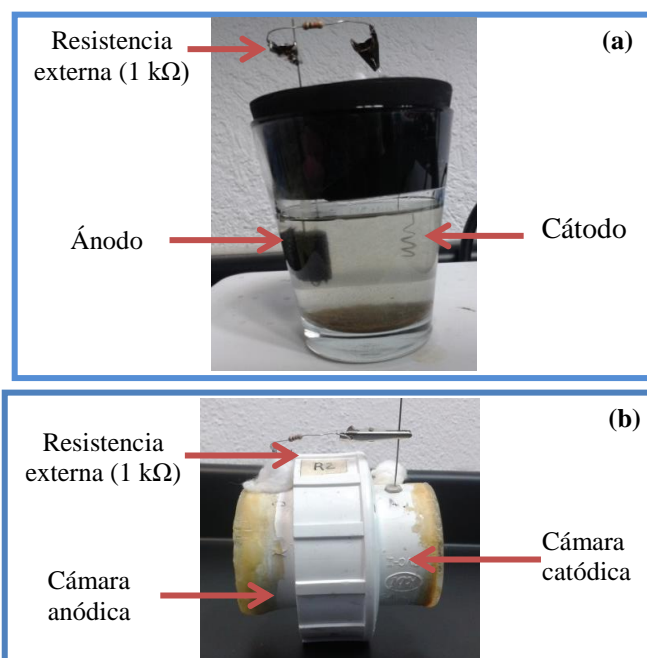


Figura 7. Configuración de las celdas de combustible microbianas utilizadas en el experimento. Las flechas indican las diferentes partes de las celdas: (a) Celda sin división; (b) Celda con división.

Como sustrato se utilizaron dos tipos diferentes de inóculos. El primero fue agua residual tomada de la parte de lodos activados presentes en la planta tratadora de CIDETEQ. A las muestras tomadas se les adicionó acetato de sodio hasta una concentración de 20 mM; se usó este inóculo por los antecedentes de otros grupos de trabajo que obtienen biopelículas capaces de producir electricidad (González-Nava, 2016). El segundo sustrato fue lixiviado de composta, obtenido a partir de humus de lombriz. La preparación de este lixiviado se llevó a cabo

mezclando dos partes de volumen de humus en tres partes de una solución de KCl (50 mM) y acetato de sodio (20 mM), la mezcla se mantuvo en agitación moderada (300 rpm) por 24 h, se centrifugó a 1000 rpm para recuperar el sobrenadante referido como lixiviados de composta (Cercado-Quezada et al., 2010).

Los volúmenes de trabajo en cada una de las configuraciones de celdas usadas fueron de 80 ml para las CCM de una cámara, mientras que, en las CCM de dos cámaras, se agregaron 40 ml de inóculo a la cámara anódica y 30 ml de una solución de KCl (50 mM) a la cámara catódica. En esta última configuración de celda, las cámaras fueron separadas mediante una membrana de intercambio iónico Ultrex CMI-7000, la cual se dejó sumergida por 24 h en una solución de KCl (50 mM) (Rosales-Sierra et al., 2017). En la Tabla 6 se muestran las características de las CCM instaladas y el código asignado.

*Tabla 6. Características de la configuración de las CCM instaladas.*

| <b>Celda</b> | <b>Numero de cámaras</b> | <b>Inóculo</b>         | <b>Tiempo de funcionamiento</b> |
|--------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|
| <b>R1</b>    | 1                        | Agua residual          | 20 días                         |
| <b>R2</b>    | 2                        | Agua residual          | 20 días                         |
| <b>R3</b>    | 1                        | Agua residual          | 10 días                         |
| <b>L1</b>    | 2                        | Lixiviados de composta | 20 días                         |
| <b>L2</b>    | 1                        | Lixiviados de composta | 10 días                         |

Las celdas se mantuvieron a una temperatura constante de 35°C y agitación orbital de 300 rpm. Durante el tiempo de operación, se realizaron lecturas del voltaje de cada celda con un multímetro de alta impedancia y mediante la ley de Ohm (Corriente=Voltaje/Resistencia) se calcularon las corrientes generadas. Después de observarse la formación de biopelícula y una respuesta eléctrica, se optó por desmontar las celdas.

## **5.2 Aislamiento de microorganismos provenientes de las CCM**

Para el aislamiento de los microorganismos se tomaron los ánodos de las CCM y se sumergieron en un buffer de fosfatos (0.5 M), en condiciones estériles. Mediante un agitador tipo vórtex, se agitaron para crear una suspensión celular, de la que se tomó 1 ml para inocular tres diferentes medios de cultivo: caldo nutritivo (N), Luria Bertani (LB) y un medio sintético enriquecido con Fe (III) (E). La composición del medio LB fue: 5.0 g/l de cloruro de sodio, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l peptona de caseína. La composición del medio sintético fue:

6.57 g/l de citrato férrico amoniacal, 2.5 g/l de acetato de sodio, 0.5 g/l de extracto de levadura, 0.15 g/l de cloruro de potasio (Xu et al., 2011).

Los caldos inoculados se incubaron a 35°C, durante 24 horas. Posteriormente, se tomó 1 ml y se realizaron diluciones seriadas hasta una dilución  $1 \times 10^{-7}$ , usando un buffer de fosfatos 0.5 M. De la última dilución y de cada uno de los caldos inoculados, se tomó 1 ml para inocular medios sólidos (N, LB y E). Estos medios sólidos se dejaron incubar a 35°C durante 24 h. Posteriormente, se tomaron colonias aisladas que presentaran características diferentes y se les asigno un código. Se propagaron las cepas por estriado simple y estriado por agotamiento hasta obtener colonias iguales en tamaño, color y aspecto. La Figura 8 muestra un esquema general de la metodología para obtener los aislados.

Una vez obtenidos cultivos axenicos, se les realizó tinción gram y la descripción morfológica de cada colonia que habian sido previamente sembradas en caldo N, a 35°C. Despues de 24 h se tomaron muestras para realizar diluciones seriadas hasta  $1 \times 10^{-7}$ , sembrando 0.1 ml de la última dilución en medios sólidos para tener colonias aisladas. La descripción morfológica se realizó de acuerdo a Ortigoza-Ferado et al. (2008).

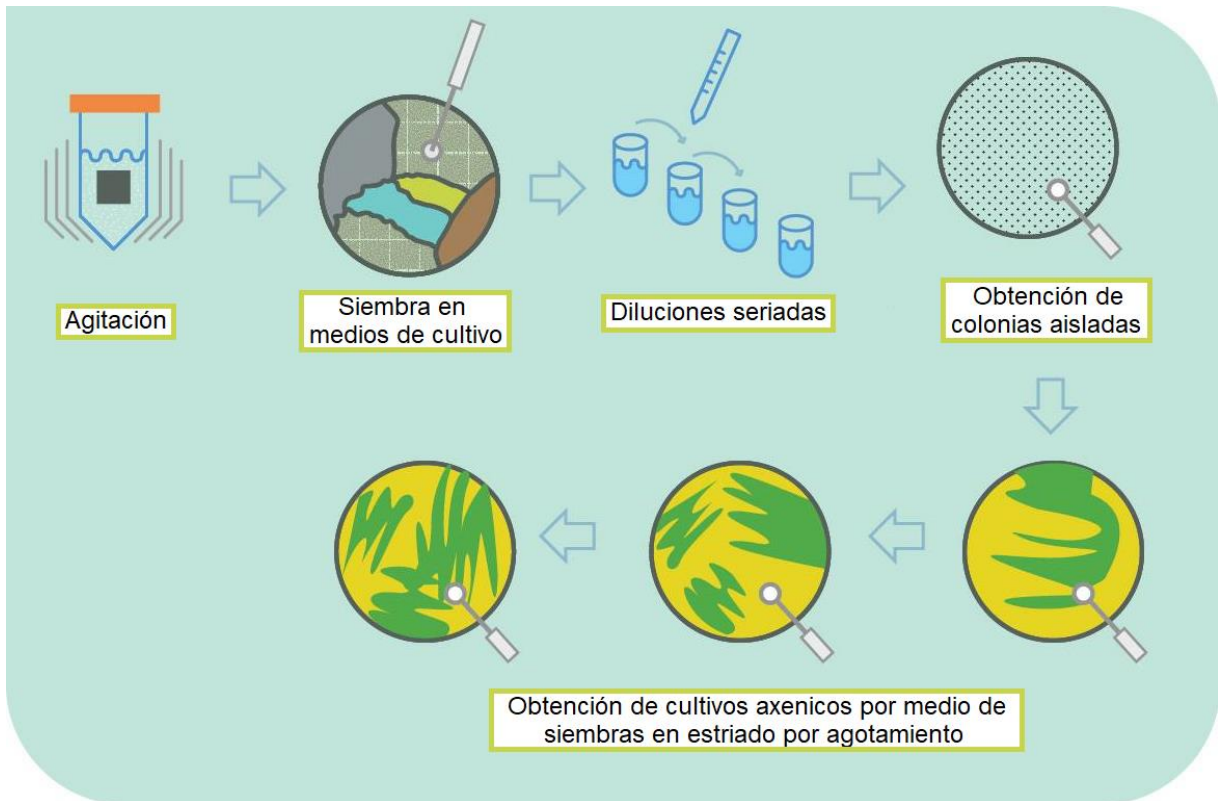


Figura 8. Esquema de la metodología para el aislamiento de microorganismos desde biopelículas de ánodos de CCM.

### 5.3 Identificación molecular de los microorganismos

Para la identificación molecular se propagaron las colonias de las bacterias aisladas en 10 ml de medio LB por 24 h y se recuperaron las células por centrifugación de 2 ml del caldo fermentado. De la pastilla obtenida después de la centrifugación se extrajo el ADN<sub>g</sub> usando el kit de extracción ZR Soil microbe DNA Microprep (Catalogo No. D6003, Zymo Research) siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Mediante electroforesis sobre gel de agarosa 0.8% se verificó la integridad del ADN<sub>g</sub> con 1 µl del eluido. Después de obtener el ADN<sub>g</sub>, se amplificó la región del 16S ARNr por medio de PCR usando el par de primers: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTTGTTACG ACTT-3') reportados por Xu et al. (2011), y la polimerasa de alta fidelidad Phusion High-Fidelity (Catálogo M0530, Thermo Scientific). Las condiciones de las reacciones utilizadas en el termociclador TECHNE TC-512 fueron las indicadas por el fabricante (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros usados en la PCR con la polimerasa Phusion High-Fidelity.

| Etapa                     | Temperatura | Tiempo       | Número de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 2 minutos    | 1                |
| Desnaturalización         | 95°C        | 30 segundos  | 25               |
| Alineación                | 55°C        | 30 segundos  | 25               |
| Extensión                 | 72°C        | 300 segundos | 1                |

Para verificar la amplificación del gen de interés se realizó un gel de electroforesis sobre gel de agarosa 1.6%. El producto obtenido fue purificado con el kit “MinElute PCR purification” (Catalogo No. 28004, QIAGEN), ligado conforme el kit “CloneJET PCR Cloning” (Catalogo No. K1232, Thermo Scientific) y clonado usando el kit “Mix & Go” (Catalogo No. T3001, ZymoResearch) en células de *Escherichia coli*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las colonias obtenidas de la transformación se recuperaron individualmente y propagaron en agar LB con ampicilina 100 µg/ml a 37 °C. Posterior a 24 horas de crecimiento, se tomaron 5 clonas aleatorias, se inocularon a 37°C en caldo LB con ampicilina 100 µg/ml y en agitación a 180 rpm. Después de 24 horas de crecimiento se les extrajo el plásmido mediante la metodología de lisis alcalina con SDS (Green et al., 2012). Se realizó PCR al plásmido, usando los primers pJET1.2 F (5'- CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC- 3') y pJET1.2 R (5'- AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG- 3), propios del vector de clonación y la GoTaq® Green Master mix (Promega) para observar que contuvieran clonada la secuencia esperada (1500 pb). Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros usados en la PCR con GoTaq® Green Master mix.

| Etapa                     | Temperatura | Tiempo       | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C        | 2 minutos    | 1      |
| Desnaturalización         | 94°C        | 30 segundos  | 35     |
| Alineación                | 60°C        | 30 segundos  | 35     |
| Extensión                 | 72°C        | 120 segundos | 1      |

Mediante electroforesis en gel de agarosa 1.6%, se comprobó la presencia del inserto en las clonas. Las clonas que contenían el inserto de interés se incubaron a 37°C en caldo LB con ampicilina 100 µg/ml y agitación de 180 rpm, posterior a 24 horas de crecimiento se extrajo y

purificó el plásmido con el kit “QIA prep spin” (Catalogo No. 27104, QIAGEN). A los productos obtenidos se les midió la relación de absorbancia 260/280 y 260/230 usando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Con estos datos se conoce la pureza del DNA y su concentración. Para la secuenciación, se enviaron los productos al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), usando los primers pJET1.2 F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGG C- 3') y pJET1.2 R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG- 3').

Los electroferogramas obtenidos fueron visualizados mediante el programa Unipro U-gene, escogiendo las secuencias con picos definidos y que no estuvieran encimados; para las secuencias en sentido reverso se obtuvo el complementario y se buscó el consenso con la secuencia forward. Obtenida la secuencia completa se realizó un análisis BLAST en la página: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Con los datos obtenidos mediante este análisis fue posible obtener similitud y cobertura de la secuencia de las muestras analizadas con las secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information.

Para un análisis completo de los datos se realizó un análisis filogenético de las secuencias creando árboles filogenéticos mediante el método *Neighbor-Joining*, usando el programa MEGA 7.0 (Tamura et al., 2007), basado en un análisis con 1000 de bootstrap. La Figura 9 muestra un esquema de los pasos usados en la metodología.

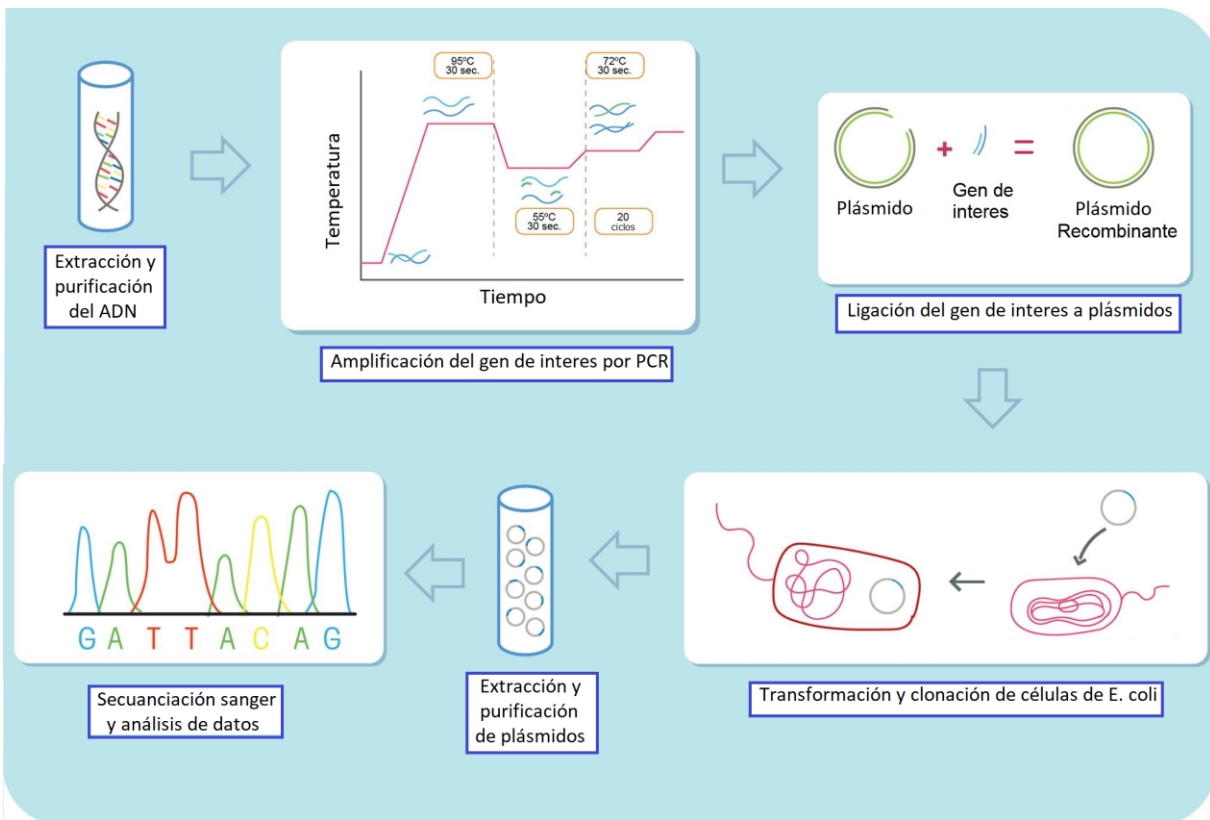


Figura 9. Esquema de la metodología usada en la identificación molecular de los microorganismos.

#### 5.4 Identificación de los microorganismos reductores de Fe (III).

Para identificar los microorganismos capaces de reducir Fe (III) se estandarizó una prueba de reducción de hierro según lo descrito por Szöllósi et al. (2015). Esta técnica utiliza un medio enriquecido con Fe (III). La composición del medio usado fue: 6.57 g/l de citrato férrico amoniacal (aceptor de electrones), 2.5 g/l de acetato de sodio (donador de electrones), 0.15 g/l de cloruro de potasio y extracto de levadura; el medio fue preparado según lo reportado por Xu et al. (2011). Se planteó un diseño experimental factorial de dos factores, el primer factor fueron los aislados del medio nutritivo con 10 niveles (1 por cada aislado) y el segundo factor fue la concentración de extracto de levadura con dos niveles, una concentración alta correspondiente con 5 g/l y una baja de 0.5 g/l, debido a que el acetato y el extracto de levadura son potenciales donadores de electrones para la reducción de hierro (Lovley et al., 1988). Como variable de respuesta se consideró el porcentaje del ion férrico degradado.

La cepa a evaluar fue cultivada durante 24 h en medio nutritivo (35°C, 200 rpm). Una vez obtenido este cultivo, se tomaron 0.1 ml para inocular 10 ml del medio enriquecido con Fe



(III). El medio inoculado fue incubado por 24 horas a 35°C. Posterior a este tiempo se tomó una alícuota, la cual se diluyó 1:100 obteniendo una mezcla final de 5 ml, a la que se adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado y 0.1 ml de tiocianato de amonio (50 g/l) como agente acomplejante. La mezcla se agitó y se midió su absorbancia a 450 nm. Las pruebas se realizaron por triplicado. La Figura 10 muestra un esquema de la metodología usada. Con los valores de absorbancias obtenidas y por medio de una curva de calibración (Anexo 2) se calculó la concentración de Fe (III) final presente en el medio. La eficiencia de degradación de Fe (III) se calculó mediante la siguiente relación:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{concentración de Fe (III) control} - \text{concentración de Fe (III) muestra}}{\text{concentración de Fe (III) control}} * 100$$

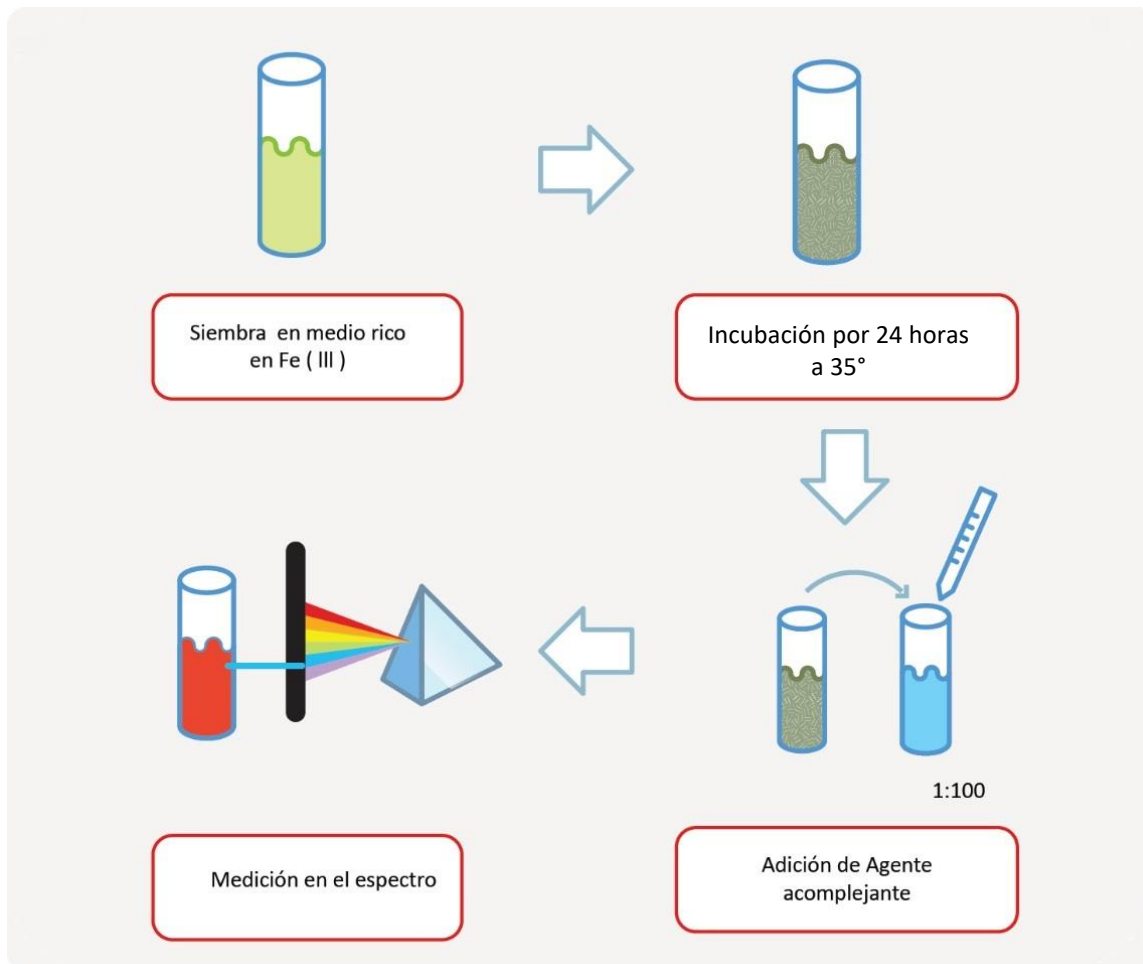


Figura 10. Esquema de la metodología para determinar reducción de Fe (III) en cultivos microbianos.

#### 5.4.1 Cinética de crecimiento microbiano contra degradación de Fe (III)

Una vez obtenida la cepa que presentó el mayor porcentaje de degradación de Fe (III), se realizó una cinética de crecimiento microbiano para asociar el crecimiento con su capacidad de degradación de Fe (III). Para tal efecto, se inició con un cultivo en medio nutritivo (200 rpm) y 24 h de crecimiento. Posterior a este tiempo, se tomaron dos volúmenes diferentes de inóculo (1 ml y 0.1 ml) para inocular 50 ml de medio nutritivo fresco. Este caldo se dejó por 5 días a 35°C. Cada 24 h se tomó una muestra para medir la concentración celular y la cantidad de hierro degradado.

### 5.5 **Caracterización de la actividad bioelectroquímica**

Para realizar estos experimentos se usaron las cepas con mayor y menor capacidad demostrada en la prueba descrita en el punto 3.1. Se instalaron celdas de una sola cámara con un volumen de 80 ml, como ánodo se usó fieltro de carbono con una dimensión de 2 cm x 2 cm y como cátodo se usó malla de titanio con una dimensión de 2 cm x 2 cm. El medio utilizado fue un mínimo mineral tamponado con buffer de fosfatos, de acuerdo a la siguiente composición: 2.5 g/l de acetato de sodio, 0.5 g/l de extracto de levadura, 0.32 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.15 g/l de  $\text{KCl}$ , 3.3 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 4.2 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

El inóculo usado fue de un crecimiento bacteriano de 24 h (35°C) con agitación de 200 rpm; del cual se tomaron 30 ml, se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min y el paquete celular obtenido fue resuspendido en 80 ml del medio mínimo mineral, previamente descrito. Todo el material usado fue esterilizado y la celda fue instalada en condiciones estériles.

Para evaluar la generación de corriente eléctrica se conectó la celda a un potencióstato (Marca BioLogic, modelo VSP) y se realizó una cronoamperometría a un potencial de 0.2 V vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . Después se realizaron voltametrías cíclicas en una ventana de potencial de -0.7 a 0.7 V a 20 mv/s en diferentes etapas del experimento que correspondieran con el medio de cultivo antes de inocular y después de realizada la cronoamperometría, sobre el medio usado con un ánodo sin crecimiento bacteriano y en un medio limpio (sin inocular) insertando el ánodo (con biopelícula) desarrollado durante la cronoamperometría.

La determinación de metabolitos bacterianos, presumiblemente fenazinas, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico. La composición del medio utilizado fue 20 mM de óxido férrico, 30 mM de acetato de sodio (donador de electrones), 2 mM de cloruro de potasio, 6 mM de cloruro de amonio y 0.5 g de extracto de levadura. Este medio se inoculó con la cepa que mostró mayor capacidad de degradación de Fe (III), posterior a 24 h de crecimiento se tomó una muestra y se hizo un barrido de 350 nm a 800 nm en un espectro UV-VIS Lambda XLS+.

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Obtención de biopelículas

En todas las condiciones de celdas de combustible microbianas evaluadas se observó la formación de biopelícula sobre el ánodo, pero se obtuvieron diferentes valores de densidad de corriente para cada condición (Tabla 9) a lo largo del tiempo de operación (Figura 11). La celda identificada como L1 fue la que mostró mayor densidad de corriente, con el valor máximo de  $301 \text{ mA/m}^2$ , mientras que la celda denominada L2 fue la que menor densidad de corriente presentó con un valor de  $2.75 \text{ mA/m}^2$ . Ambas celdas fueron inoculadas con lixiviados de composta como inóculo, pero con tiempo de operación y configuración diferentes. La celda L1 tuvo un diseño de dos cámaras y un tiempo de operación de 20 días, mientras que la celda L2 tuvo un diseño de una cámara y un tiempo de operación de 10 días.

Tabla 9. Densidades de potencia y densidades de corriente obtenidas en las CCM instaladas.

| Celda | Máxima densidad de potencia ( $\text{mW/m}^2$ ) | Máxima densidad de corriente ( $\text{mA/m}^2$ ) | Número de cámaras | Inóculo                | Tiempo de funcionamiento |
|-------|---|--|-------------------|------------------------|--------------------------|
| R1    | 0.664   | 40.75  | 1                 | Agua residual          | 20 días                  |
| R2    | 0.027   | 8.25   | 2                 | Agua residual          | 20 días                  |
| R3    | 0.008   | 4.5  | 1                 | Agua residual          | 10 días                  |
| L1    | 36.24   | 301  | 2                 | Lixiviados de Composta | 20 días                  |
| L2    | 0.002   | 2.75   | 1                 | Lixiviados de Composta | 10 días                  |

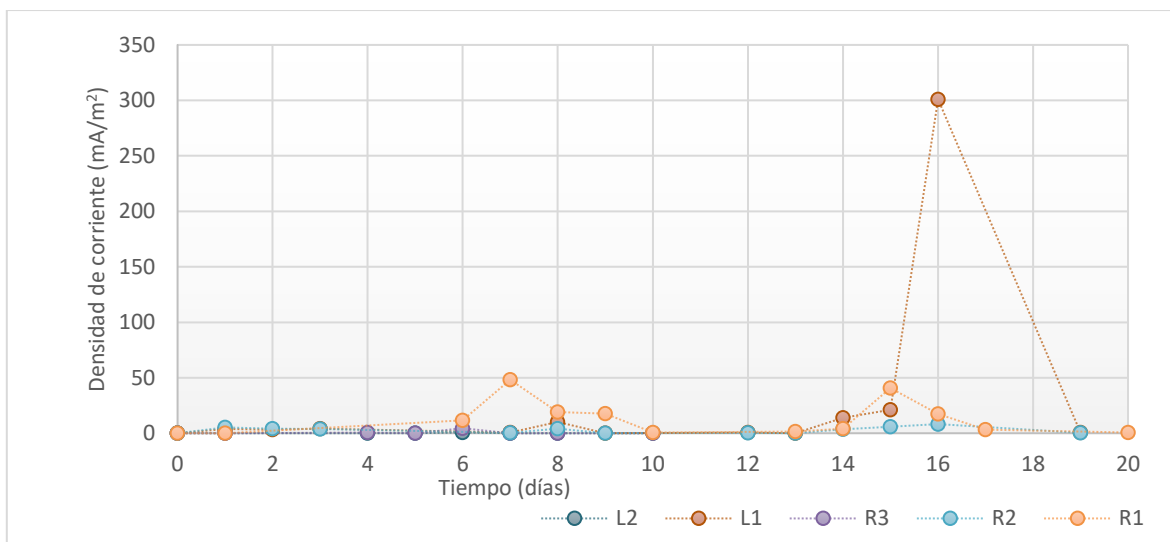
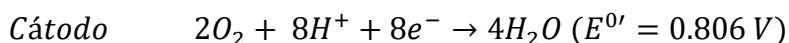
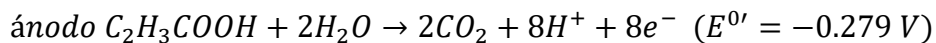


Figura 11. Valores de densidad de corriente en las diferentes configuraciones de CCM instaladas.

Comparando estas celdas con aquellas que fueron inoculadas con agua residual, se encuentra que generaron una densidad de corriente menor a la celda L1, aun cuando la celda R2 compartía las mismas características. Esto se puede deber a que el inóculo de aguas residuales provenía de lodos activados, los cuales incluyen microorganismos aerobios para la degradación de compuestos orgánicos, mientras que la respiración que se lleva a cabo en las CCM es anaerobia (Kracke, et al., 2015). Considerando esto, posiblemente se necesita mayor tiempo de adaptación de los microorganismos. Así, la celda R1 mostró una generación de densidad de corriente de  $40.75 \text{ mA/m}^2$ , en comparación con la celda R3 y R2 que mostraron densidades de corriente menores, las cuales durante todo el tiempo de funcionamiento fueron muy bajas. Algunos autores acondicionan el inóculo antes de usar en las CCM con medios enriquecidos en hierro, para que proliferen las bacterias que tengan una respiración extracelular, ya que el enriquecimiento previo del medio inhibe metanogénesis y favorece la conversión eficiente de la energía química de los compuestos orgánicos a energía eléctrica (Kim et al., 2005; Pierra et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, otro factor que pudo afectar en la generación de densidad de corriente fue el diseño de la celda. En las celdas de dos cámaras, la mitad del volumen de la cámara catódica fue llenado con agua, por lo que estaba aireada. Esto podría estar

relacionado con la presencia de oxígeno en la cámara catódica, permitiendo la reducción hacia la formación de agua, bajo la suposición de que las reacciones que se lleven a cabo en los electrodos, de acuerdo con Liu et al. (2010), son:



Considerando, que el potencial total que se puede producir en cualquier celda de combustible es el diferencial de los potenciales del ánodo y cátodo ( $\Delta E_T^{0'} = E_{\text{Ánodo}}^{0'} - E_{\text{Cátodo}}^{0'}$ ), entonces las anteriores reacciones tienen un diferencial de potencial de 1.085 V. Este cálculo expresado en energía libre de Gibbs ( $\Delta G^0 = -n * F * \Delta E_T^{0'}$ ) es de -837.62 KJ, lo que indica que estas reacciones se pueden llevar en forma espontánea. Así mismo, son llevadas a cabo de forma natural sin la aplicación de una fuente de energía externa (Logan et al., 2006).

## 6.2 Aislamiento de microorganismos provenientes de CCM

Las técnicas utilizadas en el aislamiento fueron la de diluciones seriadas y estriado en placa. Aunque no son las únicas técnicas reportadas, si resultan la más sencillas y como metodologías estandarizadas para su desarrollo en laboratorio.

Durante el aislamiento de las colonias, algunos de los medios de cultivo que presentaron crecimiento de microorganismos comenzaron a desarrollar una coloración verde (24-48 h), cambiando a diferentes tonalidades de este color durante las siguientes 48 h de incubación (Figura 12). La coloración verde podría estar relacionada con la producción de compuestos que tienen la función de mediadores redox. Estos metabolitos han sido descritos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como *G. fermentans*, *S. oneidensis*, *Pseudoonas aeruginosa* y *Lactococcus lactis*, y relacionados con los procesos de transferencia de electrones a los electrodos (Kumar et al., 2015).

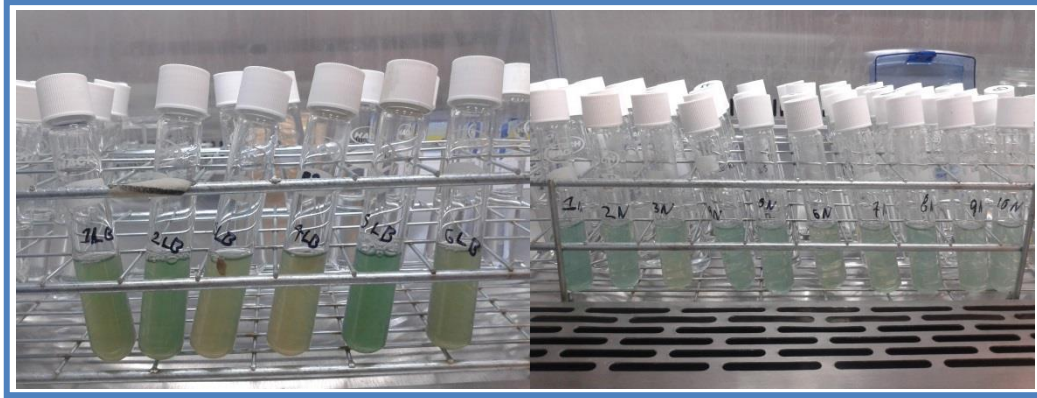


Figura 12. Crecimiento bacteriano en cultivos líquidos inoculados con los diferentes aislados obtenidos. Tiempo de cultivo: 48 h.

La selección de las colonias aisladas se realizó de acuerdo con las características morfológicas mostradas, considerando aquellas que presentaron características diferentes. Se obtuvieron 21 aislados de todos los sistemas utilizados. Estas colonias sólo representan un pequeño porcentaje de las bacterias presentes en las celdas, ya que existe un gran porcentaje de microorganismos no cultivables (Tanaka et al., 2014).

La descripción morfológica de las colonias se realizó sobre cultivos axénicos para comprobar la pureza del aislado y determinar características similares entre ellas (Tabla 10). Los resultados mostraron la obtención de dos grupos de colonias con características similares, el primer grupo fueron las colonias 9N y 1N, el segundo grupo fueron las colonias 1E, 2E 3E, 4E y 5E, mientras que todas las demás presentaron morfologías diferentes. Después de esta caracterización se aislaron y se determinó la identidad molecular de cada una de ellas.

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**



**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**



**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**



**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**



**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**



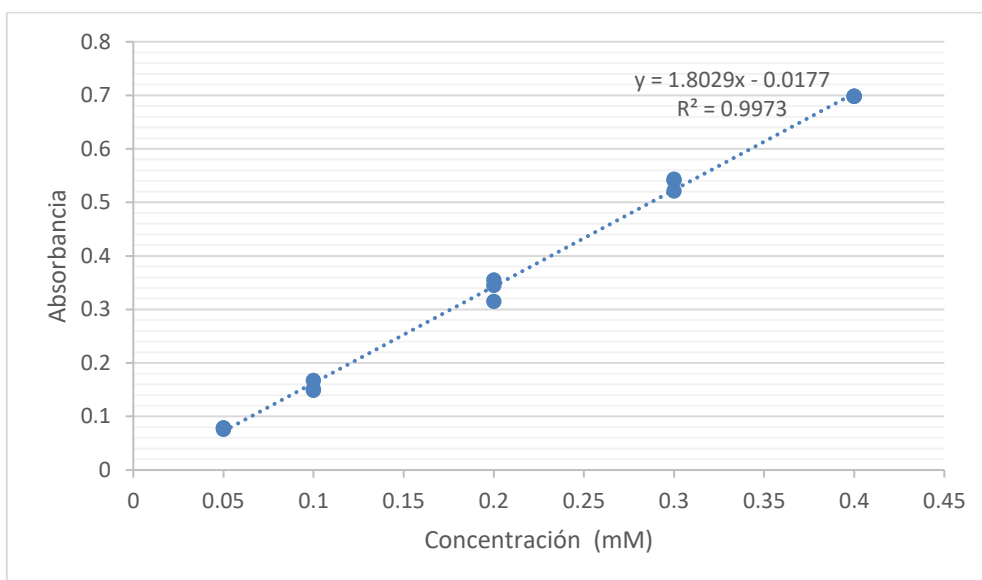
**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

**Esta página fue eliminada debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 Fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.**

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAG  
GTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGATAGATGATTGGG

Anexo 2. Curva de calibración de citrato férrico amoniacal.

| Repetición | Concentración (mM) | Absorbancia ( $\lambda$ ) |
|------------|--------------------|---------------------------|
| <b>1</b>   | 0.05               | 0.079                     |
|            | 0.1                | 0.151                     |
|            | 0.2                | 0.345                     |
|            | 0.3                | 0.541                     |
|            | 0.4                | 0.698                     |
| <b>2</b>   | 0.05               | 0.076                     |
|            | 0.1                | 0.167                     |
|            | 0.2                | 0.355                     |
|            | 0.3                | 0.543                     |
|            | 0.4                | 0.698                     |
| <b>3</b>   | 0.05               | 0.078                     |
|            | 0.1                | 0.149                     |
|            | 0.2                | 0.315                     |
|            | 0.3                | 0.521                     |
|            | 0.4                | 0.698                     |



Anexo 3. Diseño de experimentos y análisis de varianza para los valores de porcentaje de reducción de Fe (III) de los aislados de interés

| <b>Cepa</b> | <b>Experimento</b> |                     | <b>Repetición 1</b> |                     | <b>Repetición 2</b> |                     |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|             | Exceso levadura    | Sin Exceso levadura | Exceso levadura     | Sin Exceso levadura | Exceso levadura     | Sin Exceso levadura |
| 1N          | 48.3%              | 34.2%               | 23.1%               | 14.7%               | 18.0%               | 30.6%               |
| 2N          | 30.3%              | 26.7%               | 13.8%               | 10.6%               | 15.8%               | 9.1%                |
| 3N          | 34.5%              | 22.0%               | 17.8%               | 20.7%               | 16.5%               | 15.8%               |
| 4N          | 35.3%              | 26.4%               | 0.7%                | 10.3%               | 3.6%                | 16.7%               |
| 5N          | 40.1%              | 21.9%               | 15.3%               | 12.4%               | 6.9%                | 17.0%               |
| 6N          | 35.6%              | 19.0%               | 12.7%               | 7.3%                | 3.6%                | 11.6%               |
| 7N          | 12.6%              | 26.1%               | 14.0%               | 1.9%                | 4.3%                | 7.3%                |
| 8N          | 7.8%               | 8.6%                | 14.3%               | 0.7%                | 0.0%                | 5.3%                |
| 9N          | 34.5%              | 19.1%               | 7.3%                | 7.1%                | 12.2%               | 0.0%                |
| 10N         | 27.0%              | 41.0%               | 3.9%                | 2.0%                | 11.2%               | 0.0%                |

| <b>Fuente</b>                  | <b>Suma de Cuadrados</b> | <b>Grados de libertad</b> | <b>Cuadrado Medio</b> | <b>Razón-F</b> | <b>Valor-P</b> |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| <i>A: microorganismo</i>       | 0.179157                 | 1                         | 0.179157              | 45.26          | 0              |
| <i>B: extracto de levadura</i> | 0.00111005               | 1                         | 0.00111005            | 0.28           | 0.598          |
| <i>bloques</i>                 | 0.0138177                | 3                         | 0.0046059             | 1.16           | 0.3295         |
| <i>Error total</i>             | 0.292937                 | 74                        | 0.00395861            |                |                |
| <i>Total (corr.)</i>           | 0.487022                 | 79                        |                       |                |                |

R-cuadrada = 39.8514 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 35.7873 porciento

Error estándar del est. = 0.0629175

Error absoluto medio = 0.0467514

Estadístico Durbin-Watson = 1.91182 (P=0.1811)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0126993

La Tabla ANOVA particiona la variabilidad de eficiencia en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, un efecto tiene un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

## 10 Referencias

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>
- Alejos-Velázquez, L. patricia, Aragón-Martínez, M. del C., & Cornejo-Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo-Romero, A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar, & M. G. Roche-Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (pp. 1–20). Mexico: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Arends, J. B. A., & Verstraete, W. (2012). 100 years of microbial electricity production: three concepts for the future. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 333–346. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00302.x>
- Badalamenti, J. P., Krajmalnik-Brown, R., & Torres, C. I. (2013). Generation of high current densities by pure cultures of anode-respiring *Geobacter* spp. under alkaline and saline conditions in microbial electrochemical cells. *mBio*, 4(3), e00144-13-e00144-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00144-13>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications* (2nd ed.). EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Barghouthi, S. A. (2011). An universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 430–444. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>
- Borole, A. P., O'Neill, H., Tsouris, C., & Cesar, S. (2008). A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1367–1372. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9700-y>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3752–9. Retrieved from <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/60/10/3752%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cercado-Quezada, B., Delia, M. L., & Bergel, A. (2010). Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40(2), 225–232. <https://doi.org/10.1007/s10800-009-0001-5>
- Choi, S. (2015). Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.021>
- Debabov, V. G. (2008). Electricity from microorganisms. *Microbiology*, 77(2), 123–131. <https://doi.org/10.1134/S002626170802001X>
- Doyle, L. E., & Marsili, E. (2015). Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. *Bioresource Technology*, 195, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.025>
- Escalante, A. E. (2007). Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. In L. E. Eguiarte, V. Soauza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (Primera, pp. 393–424). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Esther, J., Sukla, L. B., Pradhan, N., & Panda, S. (2015). Fe (III) reduction strategies of dissimilatory iron reducing bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0286-x>
- Folgosa, F., Tavares, P., & Pereira, A. S. (2015). Iron management and production of electricity by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8329–8336. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6897-2>
- George, M. G. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 3: The Firmicutes* (2nd ed.). New York, USA: Springer.
- Gómez, J. R. O. (1996). *Electrosíntesis y electrodiálisis: fundamentos, aplicaciones tecnológicas y tendencias*. EUA: McGraw-Hill.
- González Nava, C. (2016). *Evaluación del efecto de la adición de ácidos húmicos en el funcionamiento de celdas de combustible microbiana*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C.
- Grahl, N., Kern, S. E., Dianne K. N., & Hogan, D. A. (2013). The yin and yang of phenazine physiology. In S. Chincholka & L. Thomashow (Eds.), *Microbial Phenazines Biosynthesis, Agriculture and Health* (1ra ed., pp. 43–69). Springer US.

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). New York, USA: Cold Spring Harbor.
- Hau, H. H., & Gralnick, J. a. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 237–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- Hawver, L. A., Jung, S. A., & Ng, W.-L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 738 LP-752. Retrieved from <http://femsre.oxfordjournals.org/content/40/5/738.abstract>
- He, H., Yuan, S.-J., Tong, Z.-H., Huang, Y.-X., Lin, Z.-Q., & Yu, H.-Q. (2014). Characterization of a new electrochemically active bacterium, *Lysinibacillus sphaericus* D-8, isolated with a WO<sub>3</sub> nanocluster probe. *Process Biochemistry*, 49(2), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.008>
- Huang, J., Zhu, N., Cao, Y., Peng, Y., Wu, P., & Dong, W. (2015). Exoelectrogenic bacterium phylogenetically related to *Citrobacter freundii*, isolated from anodic biofilm of a microbial fuel cell. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1879–1891. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1418-9>
- Hubenova, Y., & Mitov, M. (2015). Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review. *Bioelectrochemistry*, 106, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.04.001>
- Kang, C. S., Eaktasang, N., Kwon, D.-Y., & Kim, H. S. (2014). Enhanced current production by *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm in a mediator-less microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 165(C), 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.148>
- Kanso, S., Greene, A. C., & Patel, B. K. C. (2002). *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 869–874. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.01842-0>
- Kim, J. R., Min, B., & Logan, B. E. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1845-6>
- Koch, C., Müller, S., Harms, H., & Harnisch, F. (2014). Microbiomes in bioenergy production: From analysis to management. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.006>
- Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>
- Kumar, R., Singh, L., Wahid, Z. A., & Din, M. F. M. (2015). Exoelectrogens in microbial fuel cells toward bioelectricity generation: a review. *International Journal of Energy Research*, 39(8), 1048–1067. <https://doi.org/10.1002/er.3305>
- Lee, Y.-Y., Kim, T. G., & Cho, K. (2016). Enhancement of electricity production in a mediatorless air–cathode microbial fuel cell using *Klebsiella* sp. IR21. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(6), 1005–1014. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1579-8>
- Li, W.-W., Sheng, G.-P., & Yu, H.-Q. (2013). Electricity generation from food industry wastewater using microbial fuel cell technology. In S. L. Taylor (Ed.), *Food Industry Wastes* (First Edit, pp. 249–261). Lincon, USA: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00014-7>
- Li, X., Zhong, G., Qiao, Y., Huang, J., Hu, W. H., Wang, X., & Li, C. M. (2014). A high performance xylose microbial fuel cell enabled by *Ochrobactrum* sp. 575 cells. *RSC Advances*, 4(75), 39839. <https://doi.org/10.1039/C4RA05077K>
- Liu, D., Wang, F., Dong, H., Wang, H., Zhao, L., Huang, L., & Wu, L. (2016). Biological reduction of structural Fe (III) in smectites by a marine bacterium at 0.1 and 20MPa. *Chemical Geology*, 438, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.05.020>
- Liu, H., Ramnarayanan, R., & Logan, B. E. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 38(7), 2281–2285. <https://doi.org/10.1021/es034923g>
- Liu, M., Yuan, Y., Zhang, L., Zhuang, L., Zhou, S., & Ni, J. (2010). Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 101(6), 1807–1811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.003>
- Logan, B. E. (2007). *Microbial fuel cells* (1st Editio). Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
- Lovley, D. R. (2012). Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>

- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1986). Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal potomac river. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 751–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347168>
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1472–80. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.50.1998>
- Luo, J., Li, M., Zhou, M., & Hu, Y. (2015). Characterization of a novel strain phylogenetically related to *Kocuria rhizophila* and its chemical modification to improve performance of microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.025>
- Luu, Y.-S., & Ramsay, J. A. (2003). Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe (III) as an energy source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 215–225. <https://doi.org/10.1023/A:1023225521311>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (10th edición). Editorial Pearson.
- Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>
- Manogari, R., & Daniel, D. K. (2015). Isolation, characterization and assessment of *Pseudomonas sp.* VITDM1 for electricity generation in a microbial fuel cell. *Indian Journal of Microbiology*, 55(1), 8–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0491-7>
- Márquez Valdelamar, L. M., Díaz Serrato, A., & Flores, Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. (pp. 231–250). Mexico: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Martínez Castilla, L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. In L. E. Eguiarte, V. Soauza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (primera, pp. 87–160). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Mejía, A. A. R., Vásquez, J. A., & González, A. L. (2012). Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Tecnura*, 16(32), 118–143. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/tecn/v16n32/v16n32a11.pdf>
- Milazzo, G., & Blank, M. (1983). *Bioelectrochemistry I*. (G. Milazzo & M. Blank, Eds.). Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3697-6>
- Nandy, A., Kumar, V., & Kundu, P. P. (2013). Utilization of proteinaceous materials for power generation in a mediatorless microbial fuel cell by a new electrogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VA5. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(5), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2013.07.006>
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica* (2nd ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Nimje, V. R., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Jean, J., Reddy, A. S., Fan, C., & Chen, J. (2009). Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 190(2), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.01.019>
- Nor, M. H. M., Mubarak, M. F. M., Elmi, H. S. A., Ibrahim, N., Wahab, M. F. A., & Ibrahim, Z. (2015). Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge. *Bioresource Technology*, 190, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.103>
- Oliveira, V. B., Simões, M., Melo, L. F., & Pinto, a. M. F. R. (2013). Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.012>
- OMS. (2006). Guías para la calidad del agua potable. Retrieved from [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf?ua=1](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf?ua=1)
- Panwar, N. L., Kaushik, S. C., & Kothari, S. (2011). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(3), 1513–1524. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.037>
- Parameswaran, P., Bry, T., Popat, S. C., Lusk, B. G., Rittmann, B. E., & Torres, C. I. (2013). Kinetic, electrochemical, and microscopic characterization of the thermophilic, anode-respiring bacterium *Thermincola ferriacetica*. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 4934–4940. <https://doi.org/10.1021/es400321c>
- Patil, S. a., Hägerhäll, C., & Gorton, L. (2012). Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. *Bioanalytical Reviews*, 4(2–4), 159–192. <https://doi.org/10.1007/s12566-012-0033-x>
- Pham, C. A., Jung, S. J., Phung, N. T., Lee, J., Chang, I. S., Kim, B. H., & Chun, J. (2003). A novel electrochemically active and Fe(III) reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 129–134.



[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00354-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00354-9)

- Pierra, M., Carmona-Martínez, A. A., Trably, E., Godon, J. J., & Bernet, N. (2015). Microbial characterization of anode-respiring bacteria within biofilms developed from cultures previously enriched in dissimilatory metal reducing bacteria. *Bioresource Technology*, *195*, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.010>
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P., & Newman, D. K. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, *189*(17), 6372–6381. <https://doi.org/10.1128/JB.00505-07>
- Rabaey, K. (2010). *Bioelectrochemical Systems*. United Kingdom: IWA.
- Rasamiravaka, T., & El Jaziri, M. (2016). Quorum-Sensing mechanisms and bacterial response to antibiotics in *P. aeruginosa*. *Current Microbiology*, *73*(5), 747–753. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1101-1>
- Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(11), 7345–7348. <https://doi.org/10.1128/AEM.01444-06>
- Revelo, D. M., Hurtado, N. H., & Ruiz, J. O. (2013). Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información Tecnológica*, *24*(6), 7–8. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2007). Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe (III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5347–5353. <https://doi.org/10.1128/AEM.00804-07>
- Rosales-Sierra, A., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., Celis, L. B., Razo-Flores, E., & Cercado, B. (2017). Acclimation strategy using complex volatile fatty acid mixtures increases the microbial fuel cell (MFC) potential. *Chemistry Select*, *2*(22), 6277–6285. <https://doi.org/10.1002/slct.201701267>
- Schröder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environmental Science*, *8*(2), 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Sharma, M., Bajracharya, S., Gildemyn, S., Patil, S. a., Alvarez-Gallego, Y., Pant, D., & Dominguez-Benetton, X. (2014). A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems. *Electrochimica Acta*, *140*, 191–208. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.02.111>
- Szöllősi, A., Rezsényi-Szabó, J. M., Hoschke, Á., & Nguyen, Q. D. (2015). Novel method for screening microbes for application in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, *179*, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.004>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, & H., Kamagata, Y. (2014). A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(24), 7659–7666. <https://doi.org/10.1128/AEM.02741-14>
- Tor, J. M., Kashafi, K., & Lovley, D. R. (2001). Acetate oxidation coupled to Fe (III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(3), 1363–1365. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1363-1365.2001>
- Torres, C. I. (2014). On the importance of identifying, characterizing, and predicting fundamental phenomena towards microbial electrochemistry applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *27*, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.008>
- Vázquez-Larios, A. L., Ríos-Leal, E., Solorza-Feria, O., & Poggi-Varaldo, H. M. (2010). Influencia de la temperatura sobre las características y desempeño de celdas de combustible microbiana. In *Energías Renovables Biológicas-Hidrógeno-Pilas de Combustible-II* (pp. 148–160).
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., & Srikanth, S. (2014). Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *40*, 779–797. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.109>
- Venkataraman, A., Rosenbaum, M., Arends, J. B. A., Halitschke, R., & Angenent, L. T. (2010). Quorum sensing regulates electric current generation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in bioelectrochemical systems. *Electrochemistry Communications*, *12*(3), 459–462. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.01.019>
- Wu, C.-Y., Zhuang, L., Zhou, S.-G., Li, F.-B., & He, J. (2011). *Corynebacterium humireducens* sp. nov., an alkaliphilic, humic acid-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *61*(4), 882–887. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020909-0>
- Xing, D., Cheng, S., Logan, B. E., & Regan, J. M. (2010). Isolation of the exoelectrogenic denitrifying bacterium

- Comamonas denitrificans* based on dilution to extinction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1575–1587. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2240-0>
- Xu, S., & Liu, H. (2011). New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05129.x>
- Yong, X.-Y., Shi, D.-Y., Chen, Y.-L., Jiao, F., Lin, X., Zhou, J., & Zheng, T. (2014). Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 152, 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.086>
- Yuan, S., He, H., Sheng, G., Chen, J., Tong, Z., Cheng, Y., & Yu, H. Q. (2013). A photometric high-throughput method for identification of electrochemically active bacteria using a WO<sub>3</sub> nanocluster probe. *Scientific Reports*, 3(1), 1315. <https://doi.org/10.1038/srep01315>
- Zhang, L., Zhou, S., Zhuang, L., Li, W., Zhang, J., Lu, N., & Deng, L. (2008). Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochemistry Communications*, 10(10), 1641–1643. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.08.030>
- Zhang, Y.-C., Jiang, Z.-H., & Liu, Y. (2015). Application of electrochemically active bacteria as anodic biocatalyst in microbial fuel cells. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43(1), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(15\)60800-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60800-3)
- Zhi, W., Ge, Z., He, Z., & Zhang, H. (2014). Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresource Technology*, 171, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.096>
- Zuo, Y., Xing, D., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2008). Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-Tube microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3130–3137. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>