



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Caracterización de cepas bacterianas con
potencial para la degradación de materia
orgánica aisladas de celdas de
combustible microbianas acopladas
a *Typha latifolia*”**

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

José Abraham Benítez Paniagua

Directores de Tesis:

Dr. José Roberto Zúñiga Silva

M.I.A Miriam Vega Hernández

Puebla, Pue. Febrero 2019

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS

CCM	Celda de Combustible Microbianas
pH	Potencial de hidrogeno
DBO	Demanda Biológica de Oxigeno
DQO	Demanda Química de Oxigeno
MMB	Medio Mineral Basal
PVC	Policloruro de vinilo
RLP	Reactor Lote con Planta
RLT	Reactor Lote Tratamiento
RLB	Reactor Lote Blanco
T	Temperatura
CAM	Carbon Assimilation Medium, Asimilación de Carbono
PDA	Potato Dextrose Agar, Agar de Papa y Dextrosa
TSA	Trypto-casein Soy Agar, Agar Soja y Trypticaseina
VCA	Voltaje en Circuito Abierto
mV	Milivoltio
μS/cm	microSiemens por centímetro

Dedicatorias

*A **Dios** y a la vida, por permitirme disfrutar de la existencia, rodeado de seres increíbles llamados familia y poder contemplar las maravillas que este mundo nos entrega.*

A mi madre

Hilda Paniagua Tehuacanero

A mi padre

Adalid Benítez Trujillo

Por ser la inspiración de mi vida, por su amor infinito y su apoyo incondicional.

*A mis hermanas **Martha Elena** y **María Magdalena** gracias por estar ahí siempre que las he necesitado.*

*A mi sobrino **Gustavo Bolaños Benítez***

*A mis abuelos **Elena, Martha, Samuel** y **Sixto**, aunque ya no se encuentren conmigo siempre estarán en cada paso de mi vida.*

A todos y cada uno de mis amigos, por los ratos compartidos, experiencias vividas y por hacer de mi paso por este mundo una vivencia inolvidable, llena de recuerdos imborrables.

Agradecimientos

*A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** y la **Facultad de Ingeniería Química**.*

*A la **M.I.A. Miriam Vega Hernández** por la oportunidad que me brindo al aceptar ser mi asesora de tesis, por sus conocimientos, paciencia y apoyo durante la carrera y la realización de este trabajo.*

*Al **Dr. José Roberto Zúñiga Silva** por sus conocimientos compartidos y al aceptar ser mi asesor de tesis.*

*A la **Mtra. María Margarita Victoria Romano Rodríguez** por su amistad y apoyo durante mi camino en mi formación académica.*

*Al **Mtro. Cuitláhuac López Flores** por su amistad, paciencia, apoyo y ser el mejor maestro de japonés.*

*Al **Mtro. Antonio Herrera Bonilla** por compartir sus conocimientos y entusiasmo.*

*A la familia **Márquez Aguirre** por apoyarme al abrirme las puertas de su hogar.*

*A **Alberto, Alejandra, Alejandro, Alemão, Ana Karen, Alfonso, Alfredo, Armando, Arturo, Cecilia, Clara, Demar, Diana, Diego, Edmundo, Edson, Eduardo, Elsa, Eric, Evelyn, Fernanda, Héctor, Henry, Itzia, Jaime, Javier, Karina Berra, Karina Lara, Karla, Lalito, Lissette, Lorena, Luis Miguel, Manuel, Mario, Oscar, Pablo, Roberto, Rafael, Seiko y Yadira** por su incondicional amistad, consejos y apoyo en el desarrollo de este trabajo.*

Caracterización de cepas microbianas con potencial para la degradación de materia orgánica aisladas de celdas de combustible microbianas acopladas a *Typha latifolia*

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
Resumen	1
Introducción.....	2
Objetivos	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis	3
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1 Celdas de Combustible Microbiana (CCM)	5
1.2 Estructura de las Celdas de Combustible Microbiana (CCM)	5
1.2.1 Celdas de Combustible Microbianas acopladas a plantas.....	6
1.3 Ánodo	7
1.4 Cátodo	8
1.5 Membrana de intercambio de protones.....	8
1.6 Sustrato.....	8
1.7 Microorganismos	9
1.7.1 Microorganismos electrogénicos.....	10
1.7.2 Microorganismos degradadores de materia orgánica.....	11
1.8 <i>Typha latifolia</i>	12
1.9 Efectos de las condiciones sobre las CCM.....	13
1.9.1 Temperatura	13
1.9.2 pH.....	14
CAPITULO II: METODOLOGÍA	15
2.1 Lugar de estudio	16
2.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica	16

2.2.1 Caracterización Fisicoquímica	16
2.2.2 Caracterización Microbiológica	17
2.3 Germoplasma	17
2.3.1 Toma de muestras.....	19
2.4 Aislamiento de microorganismos rizosféricos	21
2.4.1 Estudio de Biodiversidad	21
2.5 Armado de la Celda de Combustible Microbiana	23
2.6 Aislamiento de Microorganismos	26
2.7 Asimilación de materia orgánica	27
2.8 Producción de proteasas.....	28
2.9 Producción de lipasas	29
2.10 Cinéticas de asimilación de Carbohidratos	29
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Celda de Combustible Microbiano acoplada a <i>Typha latifolia</i>	31
3.2 Inóculo.....	31
3.3 Remoción de Materia Orgánica.....	31
3.4 Medición de Voltaje.....	34
3.5 Aislamiento de Cepas	36
3.6 Siembra de cepas fúngicas y consorcio bacteriano en placa.....	38
3.7 Pruebas Bioquímicas	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.1 Arquitectura típica de una celda de combustible microbiana acoplada a plantas de acuerdo con el diseño publicado por Zhao *et al.* (2013) 7
- Figura 1.2 Esquematación del tule (*Typha latifolia*) donde se observan sus raíces y la estructura general de la planta 13

CAPÍTULO II

- Figura 2.1 Cultivo de *Typha latifolia* creciendo en la laguna de San Juan Epatlán 17
- Figura 2.2 Localización de puntos de muestreo en la laguna Tezonteopan de San Juan Epatlán 20
- Figura 2.3 Armado de la Columna de Winogradsky utilizando los sedimentos recolectados en la laguna de San Juan Epatlán y el agua proveniente de la misma zona de muestreo 23
- Figura 2.4 Celda de Combustible Microbiana acoplada a planta de *Typha latifolia* 25
- Figura 2.5 Preparación de medio de cultivo PDA (Agar de papa y dextrosa) 27
- Figura 2.6 Preparación de medio de cultivo nutritivo 27
- Figura 2.7 Esterilización de medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos 27

CAPÍTULO III

- Figura 3.1 Cepas bacterianas aisladas en agar nutritivo 36
- Figura 3.2 Cepas fúngicas aisladas en agar de papa y dextrosa 36

Figura 3.3	Cepas fúngicas y cepas bacterianas aisladas de rizosfera de <i>Typha latifolia</i>	38
Figura 3.4	Crecimiento radias de las cepas	42
Figura 3.5	Crecimiento en el Caldo Tioglicolato de las muestras tomadas en la celda (Izquierda) y en los lodos del inóculo (Derecha)	43

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

Tabla 2.1	Metodología usada en muestreo de sedimentos y agua	16
Tabla 2.2	Composición de la solución nutritiva Hoagland	18
Tabla 2.3	Puntos de muestreo de la laguna Tezonteapan de San Juan Epatlán	19
Tabla 2.4	Preparación de medios cultivo PDA y nutritivo	27
Tabla 2.5	Preparación de medios de cultivo TSA y Agar	28

CAPÍTULO III

Tabla 3.1	Crecimiento promedio de plantas (cm)	34
Tabla 3.2	Resultado de pH, Conductividad Eléctrica y Potencial de Voltaje en Circuito Abierto (VCA)	35
Tabla 3.3	Siembra de cepas	37
Tabla 3.4	Siembra de cepas fúngicas y consorcio bacteriano en placa	39
Tabla 3.5	Crecimiento radial	41

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CAPÍTULO III

Gráfico 3.1	Remoción de materia orgánica	33
-------------	------------------------------	----

Resumen

En el presente trabajo se realizó la caracterización de cepas bacterianas de una celda de combustible microbianas acopladas a *Typha latifolia* con la finalidad de determinar el potencial de dichas cepas en la disminución de la materia orgánica. Para ello se diseñó y construyó tres celdas de combustible microbianas (RLP, RLT, RLB) las cuales se conformaron de dos cámaras (anódica y catódica) separadas por una membrana de intercambio de protones, el consorcio bacteriano se obtuvo del suelo de la Laguna de San Juan Epatlán el cual se agregó 600 mg a cada celda se utilizó bentonita y tezontle como soporte. Las dos primeras celdas fueron centro de objeto mientras que la tercera representó el blanco. Se estudio la degradación de materia orgánica del agua sintética dicha agua se elaboró en el laboratorio del Complejo Regional de la Mixteca en la localidad de Izúcar de Matamoros en la cual se usaron excretas de aves (pollinaza).

La estructura de las celdas consistió en cilindros de PVC con un diámetro de 15 cm y una altura de 34 cm con una capacidad de agua en cada celda de 4 L con un ingreso a la celda de 2 litros de agua sintética en un tiempo aproximado de 5 min con una residencia hidráulica de 3 días, dichos dispositivos simulan un humedal de flujo vertical sub-superficial que opero de manera intermitente durante 90 días en el caso de la celda donde se estudió la *Typha latifolia* especie vegetal de interés se realizó un pretratamiento aplicando una solución de sulfato de cobre más hidróxido de sodio al 1% durante 12 horas posteriormente se procedió al sembrado. Se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) aplicando la NMX-AA-030-SCFI-2012 y APHA-AWWA-WPCF-1992.

Se observo que los reactores con planta produjeron una densidad de potencia mayor que la celda sin planta, de modo que la especie vegetal *Typha latifolia* fue la que presentó mejores resultados tanto para generación de corriente eléctrica como para remoción de materia orgánica que alcanzó un 60.64%.

Introducción

En la región de la Mixteca Poblana, la contaminación del agua es un factor importante que incide en la calidad de la producción agrícola y en la salud de la población, por lo que representa un área de oportunidad para la implementación de una tecnología ecológicamente sustentable para la depuración de aguas residuales y la recuperación de ambientes acuáticos contaminados, en el municipio de Izúcar de Matamoros se localiza el río Nexapa, la principal fuente de contaminación de este ecosistema es debido a las descargas de aguas domésticas, lo cual ha influido sobre el aumento en la concentración de la carga orgánica ocasionando problemas de eutrofización que se traduce en disminución del oxígeno disuelto en el agua, afectando de manera directa a la flora y fauna del ecosistema, favoreciendo el desarrollo de microorganismos nocivos. Dentro de la gama de tecnologías disponibles para el tratamiento y depuración de aguas, los humedales representan una alternativa eficiente para la degradación de contaminantes y remoción de nutrientes, los costos son relativamente bajos en términos de instalación, operación y mantenimiento, por su parte las celdas de combustible microbiano son una tecnología emergente que está generando mucha atención gracias a su potencial de generación de energía durante el tratamiento de aguas residuales, el interés en el desarrollo de esta tecnología ha ido en aumento. Las celdas de combustible microbianas acopladas a plantas acuáticas se destacan de otros tipos de celdas, debido a que la principal fuente de energía son los electrones obtenidos en las reacciones químicas llevadas a cabo por microorganismos asociados a la rizósfera, estas reacciones electroquímicas se originan a partir de una gran variedad de sustratos, principalmente a partir de la descomposición de materia orgánica, por lo que la caracterización de comunidades bacterianas involucradas en el proceso de degradación de materia orgánica es de suma importancia pues permite elucidar la participación de las cepas involucradas en el proceso, y a partir llevar a cabo procesos de bioaumentación y bioestimulación que favorezcan la eficiencia de tratamiento de aguas residuales dentro del sistema de celdas de combustible microbiano.

Objetivos

Objetivo general

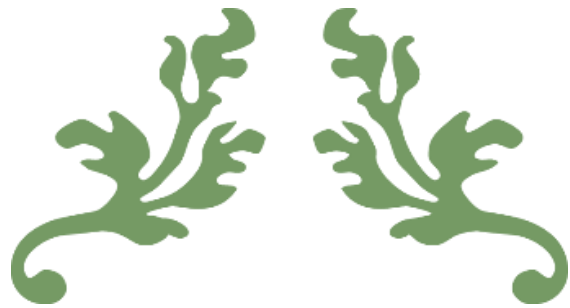
- Evaluar el potencial de las cepas bacterianas aisladas de celdas de combustible microbiano acopladas a *Typha latifolia* para la degradación de materia orgánica.

Objetivos específicos

- Implementar la tecnología para el armado de un prototipo de celda combustible microbiana acoplada a *Typha latifolia* con la finalidad de aislar cepas con la capacidad para degradar materia orgánica.
- Evaluar la capacidad metabólica de los microorganismos aislados para desarrollarse en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono para seleccionar las cepas bacterianas con potencial para degradar materia orgánica.
- Evaluar la remoción de carga orgánica (DQO) en una celda de combustible microbiana acoplada a plantas que simula un humedal artificial con *Typha latifolia* a escala de laboratorio, para el tratamiento de agua residual sintética de tipo doméstica.

Hipótesis

Las cepas bacterianas aisladas de una celda de combustible microbiana acoplada a plantas de *Typha latifolia* diseñada con la finalidad de remover DQO cuentan con la capacidad metabólica para la degradación de materia orgánica y por lo tanto están involucradas en la remoción de la Demanda Química de Oxígeno en el prototipo diseñado; además, en este sistema es posible generar una corriente eléctrica.



CAPITULO I: MARCO TÉORICO



CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Celdas de Combustible Microbiana (CCM)

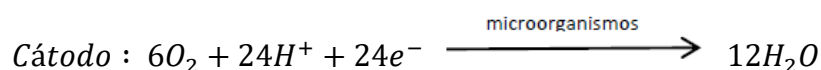
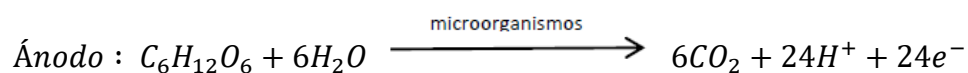
Las celdas de combustible microbiano son una tecnología emergente diseñada para contribuir a solucionar dos de los problemas más críticos que afronta la sociedad actual: la crisis energética y la disponibilidad de agua.

En una celda de combustible microbiana, los microorganismos son usados como biocatalizadores para aceptar electrones a partir del cátodo y así remplazar el uso de los catalizadores químicos costosos (Huang *et al.* 2011), los factores que influyen el desempeño eléctrico de las celdas están relacionados con la arquitectura, el tipo de separador utilizado, el material de los electrodos, el tipo de sustrato y los microorganismos, por lo que el diseño e implementación de esta tecnología contempla un trabajo multidisciplinario en las áreas de biotecnología, microbiología, química e ingeniería. (Revelo *et al.* 2013).

1.2 Estructura de las Celdas de Combustible Microbiana (CCM)

La celda de combustible microbiana es un reactor bio-electroquímico que convierte la energía química de la materia orgánica e inorgánica a bioelectricidad a través de las reacciones catalíticas de microorganismos bajo condiciones anóxicas. (Panwar *et al.* 2011)

La CCM está constituida por una cámara anódica y una cámara catódica separada por una membrana de intercambio de protones. Las bacterias en el ánodo oxidan la materia orgánica, generando protones (H^+) y electrones (e^-). Las ecuaciones siguientes representan una reacción típica con glucosa como sustrato:



De modo que el ánodo procede como aceptor de electrones externo para las bacterias, en consecuencia, los electrones son transferidos al cátodo vía ánodo, a través de un circuito externo produciendo una corriente eléctrica con la reducción del oxígeno puro o del aire para formar agua. (Gerteisen *et al.* 2007)

La cámara anaeróbica posee componentes orgánicos que al oxidarse, generan electrones, protones y CO₂. En cada cámara se coloca un electrodo, el ánodo en la cámara anaeróbica y el cátodo en la cámara aeróbica (Du *et al.* 2007), a medida que los electrones se liberan en la cámara anódica, éstos son atraídos por el ánodo y en consecuencia trasladados hacia el cátodo por un circuito externo, paralelamente, en la cámara anódica se crean protones que emigran a la cámara catódica por medio del separador donde se conciertan con el oxígeno del aire para tener como producto agua con los electrones que atraen solamente el cátodo. (Li *et al.* 2011)

1.2.1 Celdas de Combustible Microbianas acopladas a plantas

Existen diferentes alternativas de configuración y acoplamiento de las CCM una de ellas es la incorporación de plantas. Este diseño consiste en cultivar vegetación generalmente en la cámara anódica, dicha implementación de especies vegetales tiene dos ventajas fundamentales. Por un lado, la microbiota presente en las raíces podría contribuir con microorganismos electrogénicos para la generación de energía, y por otro lado la materia orgánica degradable es aportada por la misma vegetación constantemente, sin requerir alimentación externa de sustratos, aunque si se requiere un medio que proporcione los macro y micronutrientes para el crecimiento de la vegetación.

Uno de los estudios relacionados con esta configuración fue el realizado por Helder (Helder *et al.* 2012), donde se empleó una CCM de placa plana con plantas de *Spartina anglica*. El grupo investigador en este caso afirma que hay una estrecha relación entre la cantidad de raíces presentes y la generación de energía por parte de la celda, estableciendo que entre mayor cantidad de raíces exista, habría mayor disponibilidad de sustrato degradable proveniente de la exudación de estas. Esto

se obtuvo al diseñar la celda de modo que los dos electrodos fueran seccionados casa uno en tres partes, para estudiar los distintos parámetros de acuerdo a la profundidad en la celda, encontrándose que en el ánodo una mayor cantidad de raíces se da en la parte superior del mismo.

La estructura de una CCM determina la optimización de parámetros como la generación de energía y crecimiento de raíces al igual que degradación de sustrato tal como se ilustra en la Figura 1.1.

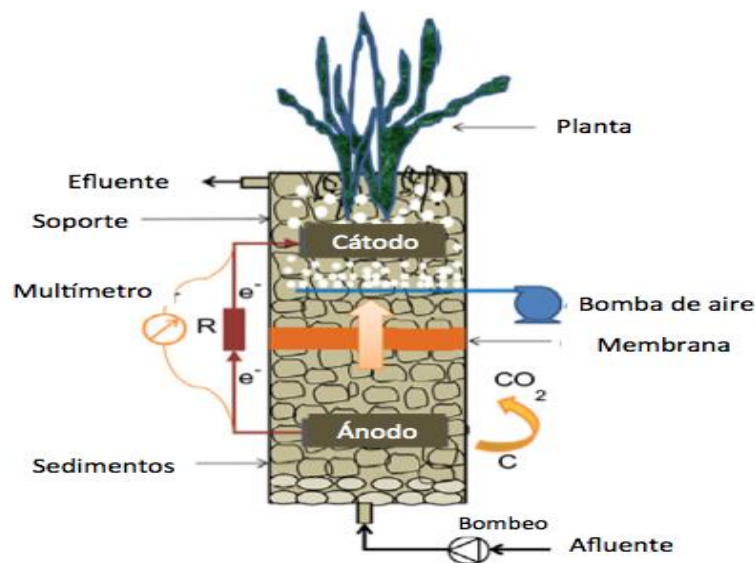


Figura 1.1. Arquitectura típica de una celda de combustible microbiano acoplada a plantas, de acuerdo con el diseño publicado por Zhao *et al.* (2013).

Al considerar las distintas investigaciones que se han empleado en celdas de combustible microbianas asociadas a macroflora, son pocos los estudios comparativos en donde se evalúan las especies vegetales más adecuadas para su uso en CCM a largo plazo. No obstante, los resultados reportados indican que la producción de energía eléctrica es posible en estos sistemas comparables a otros sistemas de CCM más ampliamente estudiados.

1.3 Ánodo

Electrodo en el que se produce una reacción de oxidación, mediante la cual un material, al perder electrones, incrementa su estado de oxidación, es el electrodo

positivo de una celda electrolítica hacia el que se dirigen los iones negativos dentro de la celda, por lo que recibe el nombre de aniones. (Buenaño *et al.* 2016)

1.4 Cátodo

Electrodo de una celda electroquímica vinculada al polo negativo, los protones producidos por la cámara del ánodo migran hacia el cátodo a través de la membrana de intercambio de protones que complete el circuito eléctrico, mediante la digestión metabólica y consumo de sustrato los protones generados viajan hacia la cámara catódica. (Zhao *et al.* 2013)

1.5 Membrana de intercambio de protones

Es conocido como el elemento intermedio entre las cámaras anódica y catódica mediante el cual se promueve por lo general el paso exclusivo de iones desde la cámara anódica a la catódica, a la vez que se impide difusión de oxígeno hacia el ánodo. (Buenaño *et al.* 2016)

La implementación de una membrana también permite reducir la distancia entre los electrodos, lo cual puede generar un aumento en la producción de energía de la celda, aunque también afecta la eficiencia coulombica de esta. (Zhang *et al.* 2010)

1.6 Sustrato

El sustrato constituye el combustible para generar energía, se pueden emplear gran diversidad de sustratos, desde compuestos puros hasta combinaciones complicadas (Liu *et al.* 2009).

Los sustratos más simples como acetato debido a su inactividad hacia los procesos microbianos (fermentación y metanogénesis), glucosa, sacarosa, almidón, lactato, ácido tereftálico, tintes sintéticos, lactosa, maltosa, xilosa, formiato, propionato, ácido succínico, etanol entre otros son usados de manera general (Liu *et al.* 2009). Actualmente el uso de sustratos de biomasa provenientes

de aguas residuales es aceptado para poder depurar y al mismo tiempo obtener energía.

Existen diversos factores que debemos tomar en cuenta para seleccionar el sustrato a utilizar:

- Costo, los sustratos puros suelen ser más caros por su proceso de producción, mientras que los sustratos complejos al ser obtenidos de desechos industriales o domésticos son fáciles de obtener y económicamente accesibles.
- La concentración del sustrato es otro factor pues es responsable de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en el interior de la CCM, el incremento de la concentración del sustrato apresura la velocidad de reacción, el resultado mayor generación de energía, al igual se a identificado efectos contrarios y elevadas densidades de potencia a pequeñas concentraciones (Sharma *et al.* 2010).
- Ciertos combinados del sustrato orgánicos suelen ser manejados para el crecimiento bacteriano mas no para la producción de electricidad (Sharma *et al.* 2010)

1.7 Microorganismos

Los microorganismos son un componente fundamental en el desempeño energético de la CCM, ya que actúan como medidores en la producción de electricidad en la celda, siendo comúnmente conocidos en el estudio de estos dispositivos, como microorganismos exoelectrógenos o electrógenos, los cuales, en conjunto, constituyen el inóculo introducido en el compartimiento anódico. Se suele emplear inóculos provenientes de cultivos puros o con una comunidad microbiana plenamente identificada, mientras que otros estudios buscan examinar la viabilidad de diversas sustancias como fuente de estos microorganismos, sin conocer las especies microbianas presentes en dichos inóculos. (Pineda *et al.* 2016)

Las bacterias reductoras de metales, como aquellas pertenecientes a las familias *Shewanella*, *Rhodoferax* y *Geobacter* son bastante comunes en experimentos en CCMs, ya que estas pueden emplear el ánodo como elceptor final de electrones. (Du *et al.* 2007). Estas y otras bacterias electrógenas, desarrollan distintos mecanismos de transferencia de electrones. Es ampliamente aceptado que por lo general los cultivos mixtos producen mayores cantidades de energía que los cultivos puros, dado que los primeros tienen capacidad de emplear una más amplia variedad de sustratos presentes para la obtención de los electrones necesarios (Catal *et al.* 2011).

Los inóculos provenientes de muestras ambientales o de efluentes industriales, cuya composición es desconocida, abarca comunidades generalmente mixtas de una gran variedad de microorganismos cuyo empleo en CCMs ha permitido a los investigadores estimar la capacidad de la diversidad microbiana para generar energía e identificar estas comunidades.

1.7.1 Microorganismos electrogénicos

Son microorganismos que a través de su crecimiento debido a la oxidación de compuestos orgánicos a dióxido de carbono pueden generar electrones para la producción de electricidad, dentro de un sistema de CCM estos microorganismos tienen una transferencia directa de electrones a sus ánodos. Estos microorganismos son muy utilizados en los procesos de generación de energía eléctrica, las bacterias electrogénicas suelen encontrarse en ambientes anaerobios como sedimentos de lagos o ríos. Entre los microorganismos de esta clase más estudiados se encuentran *Geobacter* y *Rhodoferax*; los cuales poseen mecanismos de transporte de electrones internos y no requieren la ayuda de mediadores para liberar los electrones al ánodo. (Buenaño *et al.* 2016)

Las geobacter habitan de forma natural en el subsuelo y esta especie durante millones de años ha utilizado los óxidos de hierro insolubles como aceptores de electrones para oxidación de la materia orgánica. Tiene una forma bacilar, es una bacteria anaerobia gramnegativa, que presenta pilis y un flajelo para

su respiración debido a que le permite moverse de una partícula sólida a otra cuando el óxido respirable se agota (Correa *et al.* 2015).

Geobacter es capaz de reducir materiales insolubles como los óxidos metálicos a través del contacto directo, y con ello obtiene una importante ventaja competitiva en lugares donde los aceptores finales de electrones solubles como el oxígeno o el nitrato son escasos (León *et al.* 2007).

La bacteria *Rhodoferriferreducens* también se utiliza en la producción de bioelectricidad, esta bacteria fue aislada en sedimentos del subsuelo como un reductor de Fe(III), entre los azúcares que oxida están la glucosa, fructosa, sacarosa y xilosa que estos son oxidados a CO₂ con un 80% de la recuperación de los e⁻ en forma de electricidad, estas bacterias tienen una gran producción de energía la misma que se debe a la cantidad de células que se adhieren a la superficie del electrodo durante periodos de tiempo largos y a su habilidad para mantenerse activas estas bacterias son candidatas importantes para su utilización en CCMs (Risso *et al.* 2009).

1.7.2 Microorganismos degradadores de materia orgánica

Los microorganismos rizosféricos, en particular, tienen una importante contribución en la degradación y remoción de contaminantes por lo que numerosas cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de plantas han sido reportadas por sus capacidades degradativas, esto sugiere que la introducción de este grupo de microorganismos, con características fisiológicas para la degradación de varios contaminantes podrían incrementar la remoción de contaminantes en un sistema de tratamiento determinado (Chaudhry *et al.* 2005)

La hidrólisis microbiana es un proceso a través del cual las macromoléculas son hidrolizadas a oligómeros y monómeros por la actividad microbiana antes de ser posteriormente degradadas, como por ejemplo aminoácidos, péptidos, monosacáridos y largas cadenas de ácidos grasos, por lo tanto, es el paso esencial en la degradación de la materia orgánica en las plantas de tratamiento de aguas, este proceso metabólico es llevado a cabo por enzimas extracelulares excretadas

por microorganismos con habilidad para degradar compuestos orgánicos. Las enzimas hidrolíticas son primeramente encontradas asociadas con las superficies celulares, donde la hidrólisis y la liberación de las macromoléculas degradadas parcialmente son repetidas hasta que los fragmentos hidrolíticos son suficientemente pequeños como para ser asimilados por los microorganismos (Salgado- Bernal *et al.* 2012).

Para la selección de microorganismos que puedan potencialmente influir sobre la disminución de la materia orgánica de los efluentes es importante estudiar la capacidad asimilativa de diferentes carbohidratos (Shon y Vigneswaran 2006), incluyendo monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, la capacidad para producir proteasas (organismos hidrolizantes de proteínas) (Xia *et al.* 2007) y la producción de lipasas (Gupta *et al.* 2004).

1.8 *Typha latifolia*

La enea o espadaña de hoja ancha (Figura 1.2), es una gran hierba que enraíza bajo el agua, un macrófito que encontraremos habitualmente en el margen más interior de la orilla de los cursos de agua lentos, de las pozas de arroyos y de las charcas. Posee rizomas subterráneos que le permiten extenderse y constituir poblaciones monoespecíficas o, a veces mixtas junto a su congénere, la enea de hoja estrecha (*T.angustifolia*).

La enea de hoja ancha saca unas hojas basales en forma de cinta larga, de hasta 2 metros de altura y de 1 a 2 cm de ancho, de color verde azulado. Los tallos están coronados por la inflorescencia que consta de dos partes, la inferior como un puro habano grueso que contiene las flores femeninas y, en posición contigua o con muy escasa separación, la parte superior más estrecha y clara donde se encuentran las flores masculinas.

A diferencia de la enea de hoja ancha, la de hoja estrecha no suele ser tan robusta, efectivamente sus hojas de color verde claro no superan 1 cm de ancho y, finalmente, las dos partes de la inflorescencia, la masculina arriba y la femenina abajo, están separadas por un tramo de tallo libre.

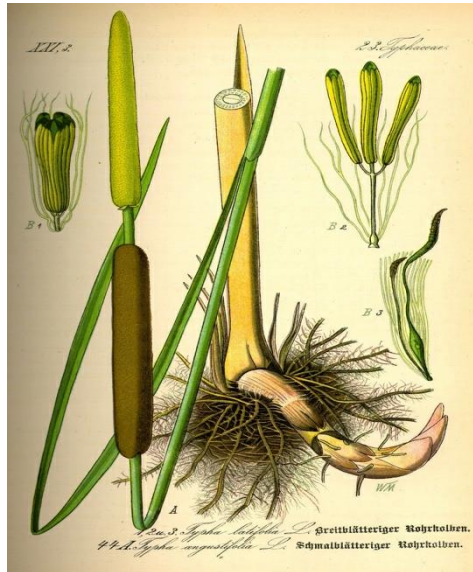


Figura 1.2. Esquematzación del tule (*Typha latifolia*), donde se observan sus raíces y la estructura general de la planta

1.9 Efectos de las condiciones sobre las CCM

1.9.1 Temperatura

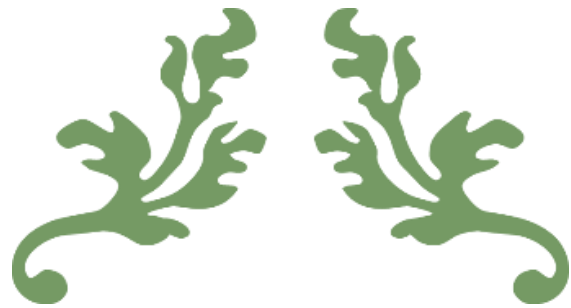
La temperatura es uno de los parámetros más relevantes en las CCMs, dado que estos sistemas se basan en la actividad metabólica de microorganismos anaerobios, las cuales en general son activos en un rango de temperatura entre 25°C – 40°C (Triviño 2006). Los estudios en CCMs consultados por lo general realizan sus experimentos a temperaturas comprendidas entre los 30°C y los 25°C. La importancia primordial del ajuste correcto de la temperatura de la CCM es principalmente, la obtención de condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la actividad catalítica que estos desempeñan.

La actividad de los microorganismos en las CCM disminuye cuando la temperatura baja, las pérdidas de polarización por concentración aumentan al reducir la temperatura por ente disminuye la potencia de la celda, ya que los procesos por propagación también disminuyan al reducir la temperatura (Huang *et al.* 2011).

La capacidad de adaptación de las comunidades microbianas frente a variaciones importantes de temperatura, han llevado a varios investigadores a establecer que, si bien los descensos de temperatura pueden reducir la cantidad de energía generada, las densidades de potencia pueden ser reestablecidas una vez que la temperatura de la celda vuelva a su estado original, por lo que puede decirse que no se generan efectos negativos irreversibles derivados de la exposición temporal a bajas temperaturas. (Gonzalez *et al.* 2013)

1.9.2 pH

El pH de cada una de las cámaras es un factor determinante en el comportamiento de la CCM, en la cámara es fundamental mantener un pH neutro, para mantener condiciones ambientales óptimos para la actividad microbiana en tanto que, para la cámara catódica este pH puede variar dependiendo de los procesos que se lleven a cabo en ella. Dado que en muchos casos es necesaria la implementación de una membrana para evitar el paso de oxígeno y sustrato entre las cámaras (Du *et al.* 2007).



CAPITULO II: METODOLOGÍA



CAPITULO II: METODOLOGÍA

2.1 Lugar de estudio

El sitio de muestreo corresponde a el municipio de Epatlán el cual se localiza en la parte suroeste del estado de Puebla, sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 33'24"y 18° 39'12" de latitud norte y los meridianos 98° 18'54" y 98° 24'18" de longitud occidental, gran parte del municipio se encuentra cubierta por selva baja caducifolia, intercalada con vegetación secundaria arbustiva y arbórea; esta vegetación se presenta en las zonas montañosas, al noroeste y sudeste, en las zonas de vegetación de selva baja, así mismo existe un ecosistema acuático en la laguna de San Felipe, el municipio se localiza dentro de la subcuenca del río Nexapa, afluente del Atoyac, uno de sus tributarios, el Atotonilco, lo recorre por la parte occidental, al centro existe un sistema de canales y un borde o laguna que mide aproximadamente 1 kilómetro de ancho por 2 kilómetros de largo (Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones en México, Consultado en Febrero de 2018).

2.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica

2.2.1 Caracterización Fisicoquímica

Los análisis realizados a las muestras de agua y sedimentos se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Metodología usada en muestreo de sedimentos y agua	
<i>Metodologías para sedimentos</i>	<i>Metodologías para agua</i>
Materia orgánica / Humedad / Textura	DQO / DBO
pH / Conductividad eléctrica	Oxígeno disuelto / Potencial Redox / pH
Nitrógeno: Kjendahl, AOAC 42.014,1970 Fósforo (Método metavanadato – molibdato / Ácido fosfórico APHA 4500 – P – C)	

2.2.2 Caracterización Microbiológica

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo para llevar a cabo la caracterización microbiológica:

- Agar nutritivo: el medio de cultivo utilizado para la conservación de las cepas, se utilizó este medio para propagar todas las cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.
- Medio Mineral Básico (MMB): para las pruebas de asimilación de carbono se utilizó un medio mineral base el cual fue enriquecido con los carbohidratos o la fuente de materia orgánica correspondiente, la composición base consiste en: NaCl 5 g, NH₄HPO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g., con un pH 6.5 ± 0.1 y una temperatura de 25°C

2.3 Germoplasma

Las plantas que se utilizaron en este trabajo corresponden a la especie vegetal conocida como tule, cuyo nombre científico es *Typha latifolia*, en el punto de muestreo seleccionado se tomaron varias muestras (Figura 2.1.) de la planta las cuales fueron propagadas en el laboratorio utilizando una solución nutritiva tipo Hoagland (Hoagland y Aron, 1950) con un pH de 6.0, esta solución (Tabla 2.2) fue de las primeras desarrolladas para el cultivo de plantas sin suelo/sustrato, la solución de Hoagland proporciona todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y es apropiado para una amplia gama de especies, para este trabajo se recolectaron plantas completas con raíces y tallos, las cuales fueron lavadas antes de utilizarse en el armado de las celdas de combustible microbiano.



Figura 2.1. Cultivo de *Typha latifolia* creciendo en la laguna de San Juan Epatlán.

Tabla 2.2. Composición de la solución nutritiva Hoagland		
Componente	Solución de reserva	mL Solución de reserva/1L
Macronutrientes		
2M KNO ₃	202 g/L	2.5
1M Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	236 g/0.5L	2.5
Hierro (Sprint 138 quelato de hierro)	1.5 g/L	1.5
2M MgSO ₄ •7H ₂ O	493 g/L	1
1M NH ₄ NO ₃	80 g/L	1
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2.86 g/L	1
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81 g/L	1
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22 g/L	1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.051 g/L	1
H ₃ MoO ₄ •H ₂ O or	0.09 g/L	1
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.12 g/L	1
Fosfato		
1M KH ₂ PO ₄ (pH to 6.0)	136 g/L	0.5

2.3.1 Toma de muestras

Se realizó el muestreo de agua proveniente de la laguna Tezonteopan de San Juan Epatlán, para la recolección se tomaron muestras de germoplasma correspondiente a *Typha latifolia* y también se recolectaron muestras de agua y sedimentos en los puntos mostrados en la Tabla 2.3. dichos puntos se ubican en la Figura 2.2.

Tabla 2.3. Puntos de muestreo de la laguna Tezonteopan de San Juan Epatlán	
Punto de muestreo	Coordenadas
1	18.627070, -98.361732
2	18.626610, -98.361445
3	18.626731, -98.361253
4	18.626938, -98.360934
5	18.627014, -98.360811
6	18.627578, -98.360906
7	18.628218, -98.361035
8	18.628355, -98.361089



Figura 2.2. Localización de puntos de muestreo en la laguna Tezonteopan de San Juan Epatlán. Fuente: Google Maps.

2.4 Aislamiento de microorganismos rizosféricos

2.4.1 Estudio de Biodiversidad

El estudio de las comunidades microbianas en condiciones de laboratorio puede realizarse fácilmente en una columna de Winogradsky, la cual simula un microecosistema o microambiente que ilustra como los microorganismos ocupan microespacios altamente específicos de acuerdo con sus necesidades vitales, tales como: requerimientos de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia, de forma tal que la actividad metabólica de un microorganismo posibilita el crecimiento de otros y viceversa, a partir de los sedimentos recolectados en la laguna se procedió al montaje de una columna de Winogradsky de acuerdo con la siguiente metodología:

La columna fue realizada en un recipiente de vidrio con un volumen de un litro, para el cual se utilizaron 500 gramos de suelo que consiste en sedimentos, restos de raíces vegetales de *Typha latifolia* y un litro de agua proveniente de la misma zona de muestreo de la laguna, para el armado de la columna se utilizaron los siguientes materiales:

- 4 gramos de cada una de las siguientes sales minerales.
 - CaCO_3 (o la cascara pulverizada de un huevo)
 - CaSO_4
 - CaHPO_4
- 1 yema de huevo cocido
- 3 tornillos o clavos de hierro
- Papel periódico finamente cortado
- Medio Mineral

El procedimiento para armar la columna consistió en los siguientes pasos:

1. Colectar una cantidad del suelo de estudio y adicionarle 1 g de cada una de las sales, el papel finamente cortado y el huevo desmenuzado. Mezclar hasta homogeneizar completamente.

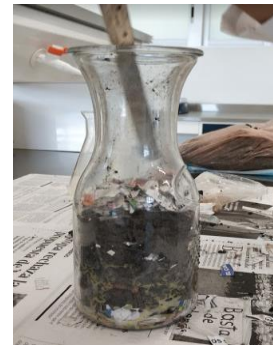
2. Colocar la mezcla en un recipiente adecuado hasta ocupar 1/3 del volumen total. Compactar el suelo con la ayuda de una espátula a fin de eliminar las burbujas de aire (Figura 2.3).
3. Mezclar la muestra de agua con el medio mineral en proporción de 1:1.
4. Añadir la solución anterior a la muestra de suelo hasta llegar a una altura de aproximadamente de 3 a 5 cm abajo del borde, con cuidado de no resuspender la muestra compactada, para ello inclinar la botella y resbalar el agua lentamente por las paredes.
5. Agitar la solución con una varilla de vidrio para eliminar burbujas de aire.
6. Registrar el aspecto final de la columna (color del sedimento y del líquido).
7. Colocar dos clavos (uno galvanizado y uno no galvanizado) al fondo, sobre el sustrato amarrados de un hilo.
8. Marcar el nivel de agua y cubrir la boca de la botella con el plástico auto adherible, es recomendable hacer algunas perforaciones para reducir la evaporación, por lo que puede ser necesario reponer agua para mantener el nivel original.
9. Incubar a temperatura ambiente (25 a 30°C) cerca de una ventana para que reciba la luz solar.



a) Adición de Suelo



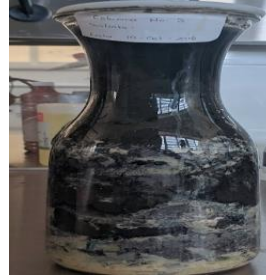
b) Adición de Clavos



c) Compresión del material



d) Adición de Medio Mineral



e) Montaje de la Columna

Figura 2.3. Armado de la Columna de Winogradsky utilizando los sedimentos recolectados en la laguna de San Juan Epatlán y el agua proveniente de la misma zona de muestreo.

10. Esta columna se mantendrá en observación por aproximadamente 90 días para evaluar la presencia de diversidad microbiana en el sedimento proveniente de la laguna.

2.5 Armado de la Celda de Combustible Microbiana

Se construyeron dos conjuntos de celdas que operaran bajo diferentes condiciones de flujo, cada cilindro de PVC simuló un humedal artificial a escala de laboratorio en el que se implementaron los componentes de una celda electroquímica. En este sistema experimental se utilizará la especie vegetal *Typha latifolia* y será alimentado con agua residual doméstica diseñada en laboratorio, utilizando excretas de aves “pollinaza” como fuente de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, los sistemas implementados operaran bajo condiciones de temperatura e iluminación ambiente.

La configuración de las celdas consiste en cilindros de PVC con un diámetro de 15 cm y una altura de 34 cm, las dimensiones fueron tomadas con base en las proporciones utilizadas por Liu y colaboradores (2013). El volumen total de cada reactor fue de 7 L, mientras que el volumen de trabajo o de líquido en los reactores empacados fue de 4 L. Las celdas cuentan con un ánodo, un cátodo, colectores de corriente, una capa de fibra de polipropileno que actuó como separación entre la parte anódica y la catódica, medio de soporte, puntos de muestreo y la entrada y salida de agua. La capa inferior al ánodo está conformada por bentonita y tezontle. Esta capa se inocula con sedimentos provenientes de la laguna de San Juan Epatlán, para lo cual se depositan 600 mg de inóculo repartidos en alturas de 6, 16

y 20 cm, por encima de esta última capa se instala un ánodo correspondiente a un electrodo de grafito de 10 mm de espesor y una longitud de 15 cm. Encima del ánodo se colocó una capa de 1 cm de grafito granulado. Posteriormente, se emplearon 200 mL de inóculo y, enseguida, la raíz de la especie vegetal *Typha latifolia*. Se colocó el material textil de fibras sintéticas conocido como pellón el cual es descrito en el artículo de Daud et al. (2015) de manera que interpusiera una separación física entre cátodo y ánodo, para finalizar se coloca una capa de 6 cm de altura de tezontle y, por último, se instaló el cátodo, constituido del mismo material que el ánodo, en contacto con el aire, estas condiciones podrían permitir a los electrones transferidos en el cátodo reaccionar con los protones difundidos a través de la celda para mantener la electroneutralidad, mientras que el colector de corriente se hizo con cable de cobre del calibre número 12.

En el caso de las especies vegetales de *Typha latifolia*, los rizomas recibieron un pretratamiento aplicando una solución que consiste en sulfato de cobre más hidróxido de sodio al 1% de cada uno dejando las raíces en contacto con esta disolución durante 12 horas. Posterior a la esterilización, se incubaron dentro de un recipiente de PVC con tezontle durante 3 días a 25°C. Los cilindros de PVC se empaquetan con tezontle previamente lavado y esterilizado a 121°C por 30 min (Timmers y colaboradores, 2013). El tamaño de partícula estuvo distribuido en la parte inferior (abajo del ánodo) con tezontle de 5.6-19.0 mm de diámetro granular teniendo esta capa una altura de 12 cm, mientras que la sección comprendida entre el pellón se mantiene la misma distancia.

Los sistemas evaluados serán operados por lote de acuerdo a las siguientes características: se permitirá el ingreso a la celda de 2 litros de agua residual sintética en un tiempo aproximado de 5 minutos. Esta agua queda retenida (tiempo de residencia hidráulica de 3 días). Luego, el agua se evacua por completo mediante el ingreso de la misma cantidad de agua residual por la parte inferior del reactor en un tiempo de cinco minutos, lo que permitía la salida del agua tratada y a su vez el ingreso de agua residual del recipiente alimentador, a los tres días se repite la misma metodología constituyendo así un proceso por lotes de acuerdo a las siguientes especificaciones:

- **Celda RLP (Celda Reactor Lote con Planta):** Consiste en una celda electroquímica conformada por el ánodo, el cátodo, el tezontle entre el ánodo y el cátodo, la planta acuática *Typha latifolia*, la resistencia eléctrica, los colectores de corriente y los puntos de muestreo (Figura 2.4).
- **Celda RLT (Celda Reactor Lote Tratamiento):** Consiste en una celda electroquímica con los elementos mencionados para la celda RLP con la diferencia de que no tiene la especie vegetal.
- **Reactor RLB (Celda Reactor Lote Blanco):** Consiste en una celda conformada por el ánodo, el cátodo, la resistencia eléctrica, los colectores de corriente, y los puertos de muestreo. Contiene entrada de agua residual sintética y esta celda no tiene planta, no inóculo solo tezontle.

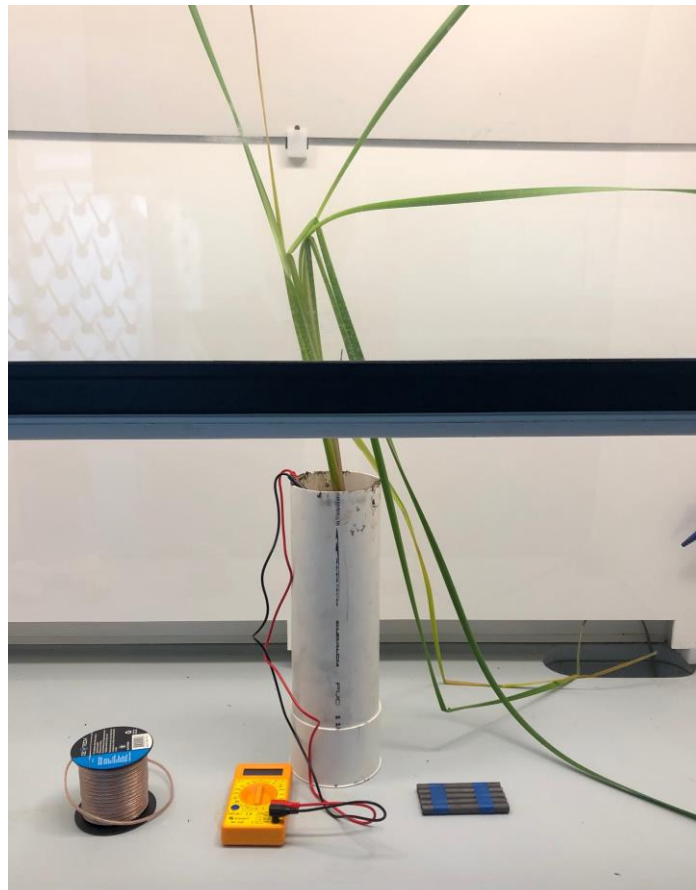


Figura 2.4. Celda de Combustible Microbiano acoplada a planta de *Typha latifolia*

Se trabajó con agua residual sintética preparada en el laboratorio con el fin de simular un agua residual doméstica para mantener un control de las características del influente. Para la preparación del agua sintética se agregaron

31.6 g de acetato de sodio que corresponden a 632.14 mg/L de carbono, 4.71 g de sulfato de amonio que corresponden a 20 mg/L de nitrógeno, 1.74 g de fosfato monobásico de potasio que corresponden a 10 mg/L de potasio y 7.95 mg/L de fósforo, y 0.5 g de sulfato heptahidratado de magnesio que corresponde a 1 mg/L de magnesio, por otra parte una fuente diferente de alimentación para las celdas, será excreta de pollo mejor conocida como pollinaza, la cual también es considerada una fuente de nutrientes compleja.

Los parámetros para el seguimiento del sistema son los siguientes: concentración de materia orgánica medida como la demanda química de oxígeno (DQO total), concentración de nitrógeno pH, temperatura (T) mientras que para evaluar la producción de electricidad se miden los siguientes parámetros: voltaje en circuito abierto, corriente y potencia eléctrica variando los valores de resistencia eléctrica externa.

Para determinar la demanda química de oxígeno total (DQO total) se aplican los métodos validados por la Asociación Estadounidense de Salud Pública, la Asociación Estadounidense de Tratamiento de Agua y la Federación de Control de la Contaminación del Agua (APHA-AWWA-WPCF, 1992) así como la normativa mexicana NMX-AA-030- SCFI-2001 (www.gob.mx), que especifican la técnica para la determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

2.6 Aislamiento de Microorganismos

La metodología utilizada para el aislamiento de bacterias y hongos filamentosos fue de acuerdo al protocolo propuesto por Muratova *et al.* (2003) como se describe a continuación:

- Se removió el suelo no rizosférico de las raíces.
- La raíz con suelo rizosférico adherido se lavó en 100 mL de agua destilada y se agito por 30 min.
- Con la suspensión se prepararon diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-7} .

- Se realizaron 3 réplicas en placa de cada dilución en agar PDA (Tabla 2.4, Figura 2.5) y se incubó a 30°C (temperatura del lugar de muestreo) por 48 horas.
- Posteriormente se seleccionaron las colonias con características visibles diferentes de cada muestra y se conservaron en agar nutritivo a 4°C (Tabla 2.4, Figura 2.6).
- Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos (Figura 2.7)

Tabla 2.4. Preparación de medios de cultivo PDA y Nutritivo			
Agar	No. de placas	Volumen preparado (mL)	Cantidad de agar (g)
PDA	15	300	11.7
Nutritivo	5	100	2.3



Figura 2.5. Preparación de medio de cultivo PDA (Agar de papa y dextrosa)



Figura 2.6. Preparación de medio de cultivo nutritivo



Figura 2.7. Esterilización de medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 min

2.7 Asimilación de materia orgánica

Las cepas se sembraron por estriado y por duplicado en un medio sólido para evaluar la asimilación de carbono (Carbon Assimilation Medium-CAM). Los carbohidratos utilizados fueron glucosa, lactosa y almidón. Para la selección de estos compuestos se tomó en cuenta que son encontrados con frecuencia en los efluentes.

La composición del CAM (por litro) es la siguiente:

- Solución de agar 500 ml
- **Medio mineral basal 500 mL:** carbohidrato 10 g, NaCl 5 g, NH₄HPO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g.
Contando con un pH 6.5 ± 0.1 y una temperatura de 25°C.
- La solución de agar se esterilizo en autoclave por 15 min a 121°C
- Medio mineral basal se esterilizó por filtración.

2.8 Producción de proteasas

Para evaluar la capacidad de hidrolisis de caseína se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Prescott (2002). Para ello las cepas bacterianas se sembraron en medio con caseína que consto de dos fracciones que a continuación se describirán:

- **Agar TSA:** Preparación de 300 mL se necesitó 12 g de agar
- **Leche descremada:** 6 g para preparación de 300 mL

Posteriormente se procedió al esterilizado y sembrado en placa:

- La solución de caseína se esterilizó a 115°C durante 30 minutos, se dejó enfriar hasta los 45°C, se mezcló y repartió el medio en cajas Petri.
- El sembrado se realizó en placas por una estría central gruesa y se incubó por 5 días a 30°C (Tabla 2.5).
- La lectura de la prueba se realizó observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Tabla 2.5. Preparación de medios de cultivo TSA y Agar			
Agar	No. de placas	Volumen preparado (mL)	Cantidad de agar (g)
TSA	15	300	12
Agar	15	300	4,5

2.9 Producción de lipasas

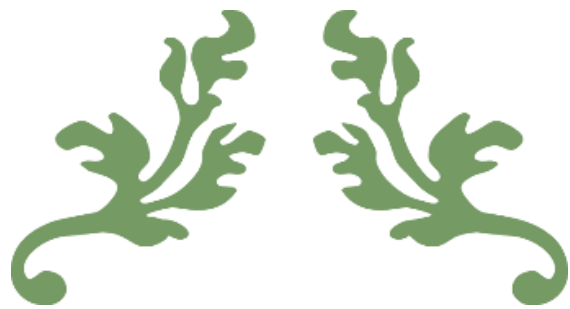
Para evaluar la producción de lipasas se utilizó Tween 80®, ya que las lipasas son generalmente producidas por carbono lipídico como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tweens (Gupta *et al.* 2004). Para ello se prepararon 300 mL de medio con las siguientes cantidades de reactivos:

- **Peptona:** 3 g
- **NaCl:** 1.5 g
- **CaCl₂*H₂O:** 0,03 g.
- **Tween 80®:** 3 mL.
- **Agar:** 4,5 g.

Posteriormente se inocularon las placas por estría y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días.

2.10 Cinéticas de asimilación de Carbohidratos

Para evaluar la capacidad de asimilación de materia orgánica se tomaron 4 compuestos como fuente de carbono 3 carbohidratos, Glucosa, Lactosa y Almidón y una fuente de carbono inorgánica que consiste en acetato de sodio, para la evaluación de las cepas microbianas aisladas se propone un diseño experimental por bloques en el que cada bloque representa una fuente de carbono y cada tratamiento corresponde a una cepa microbiana aislada.



CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Celda de Combustible Microbiano acoplada a *Typha latifolia*

Una planta necesita nutrientes primarios: nitrógeno, fósforo y potasio; macronutrientes secundarios: calcio, magnesio y azufre y micronutrientes que son necesarios en proporciones mucho menores: hierro, manganeso, cloro, cobre, zinc, boro y molibdeno, en los estudios realizados con celdas de combustible microbiano acopladas a plantas, estos nutrientes son suministrados por medio de una solución nutritiva Hoagland, la cual contiene todos los elementos necesarios para que una planta se desarrolle en condiciones hidropónicas, las plantas acuáticas sobreviven en condiciones anóxicas y/o anaerobias, por lo que son aptas para este tipo de sistemas.

3.2 Inóculo

Las bacterias electroquímicamente activas oxidan la materia orgánica y transfieren electrones hacia el ánodo, en el caso de este trabajo se ha utilizado como inóculo base el material sedimentario bioaumentado a través de la columna de Winogradsky, el cual fue mantenido durante un periodo de 90 días.

3.3 Remoción de Materia Orgánica

Los mayor parte de contaminantes presentes en las descargas de agua de tipo domestico son por lo general sustancias orgánicas, entre las que se encuentran mayoritariamente materia orgánica, nitrógeno y fósforo en exceso, lo cual puede resultar en eutrofización, aunque también pueden encontrarse compuestos xenobióticos de origen orgánico y con posibilidad de encontrar en menor proporción contaminantes de origen inorgánico, debido a esto se utiliza el acetato de sodio como fuente de carbono de origen inorgánico. La mayor parte de los contaminantes orgánicos son utilizados por los microorganismos como fuente de energía y para la formación de biomasa esto sucede con la glucosa, lactosa y el almidón, por lo tanto, el agua residual sintética utilizada en este proyecto se diseñó para permitir una fuente de carbono, nitrógeno, fosforo, todos estos compuestos deber ser los

requeridos para la reproducción y mantenimiento de los microorganismos presentes en el sistema. La demanda química de oxígeno se determinó con el método titulométrico en reflujo cerrado de los métodos estandarizados para el análisis de agua potable y agua residual, los reactores construidos se alimentaron con agua residual sintética, el primero con *Typha latifolia*, el segundo no contenía planta y un tercer reactor que funcionó como control, sin planta y con agua proveniente de la laguna de Epatlán. Los reactores con planta produjeron una densidad de potencia menor que la celda sin planta, de modo que la especie vegetal *Typha latifolia* fue la que presentó mejores resultados tanto para generación de corriente eléctrica como para remoción de materia orgánica medida como DQO.

La experimentación se llevó a cabo en dos etapas: la primera etapa fue de adaptación (14 días), durante el cual se visualizó la vitalidad de las especies vegetales sembradas en el dispositivo, a partir del día 15 se midió el voltaje de las celdas, la conductividad eléctrica, el pH, la temperatura, así como el seguimiento de la demanda química de oxígeno en cada reactor. La remoción de materia orgánica no sigue una tendencia constante, en promedio alcanzó apenas el 60.64% aproximadamente la remoción abiótica detectada se observa en el gráfico 2.1 y se asoció con la capacidad de remoción del soporte (tezontle), el análisis estadístico utilizando el comparativo de medias demostró que no existe una diferencia significativa para los valores de remoción entre los reactores.

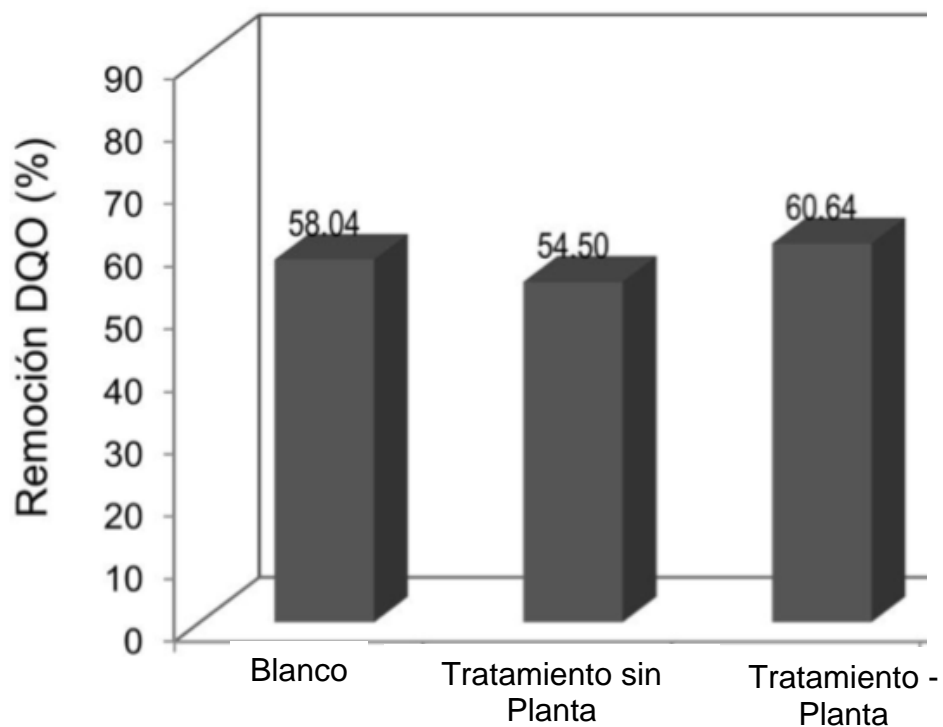


Gráfico 3.1. Remoción de materia orgánica

El incremento inicial de la materia orgánica medida como DQO, entre el influente y el efluente de los dispositivos, se asocia con los exudados de la planta, la diferencia en la remoción de la materia orgánica entre los reactores con y sin inóculo sugieren que los microorganismos que mejor removieron materia orgánica provienen de la planta en mayor proporción a las que el inóculo, la diferencia en la remoción entre los reactores implica que las raíces son las portadoras de los microorganismos que degradaron la materia orgánica, en el dispositivo sin planta, la ausencia de microorganismos por parte de la planta y del inóculo ocasionó una remoción menor, considerando que los dispositivos en el presente experimento operaron en circuito abierto la mayoría del tiempo, la remoción se atribuye a la actividad microbiana sin la intervención de reacciones electroquímicas.

Los tres dispositivos se alimentaron con agua residual sintética preparada en el laboratorio con la misma composición, los dispositivos instalados simulan un humedal del flujo vertical subsuperficial, operando de manera intermitente con un tiempo de residencia hidráulico de 90 días, la alimentación de la solución de alimentación tuvo una DQO inicial de 1000 mg/L.

3.4 Medición de Voltaje

Los valores de pH oscilaron entre 6.78 ± 0.34 , manteniéndose cercano a la neutralidad, por otra parte la conductividad eléctrica mantuvo valores estables alrededor de $975.0 \pm 55.18 \mu\text{S}/\text{cm}$, para los últimos días de muestreo se registró un descenso hasta $550 \mu\text{S}/\text{cm}$, por su parte el potencial de óxido-reducción se obtuvo en valores negativos, garantizando ambientes anóxicos o anaerobios que son adecuados para las reacciones de transferencia de electrones registrándose un valor promedio de $-100.45 \pm 21.21 \text{ mV}$. En este sentido los valores de pH, conductividad eléctrica y potencial redox registrados favorecen la producción de energía eléctrica. Con respecto a la planta, esta mostró un crecimiento estable en un inicio la planta contaba con un solo brote y hojas de aproximadamente $15 \pm 0.4 \text{ cm}$ pero al final del experimento las hojas alcanzaron una longitud total de $25 \pm 1.0 \text{ cm}$ y se observó el crecimiento de brotes (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1 Crecimiento promedio de plantas (cm)	
Día	Crecimiento Promedio de la planta (cm) Tres dispositivos
5	13.5 ± 0.5
15	15.45 ± 0.3
25	17.87 ± 0.2
35	19.23 ± 0.1
45	20.15 ± 0.15
55	21.78 ± 0.8
65	23.5 ± 0.67
75	25.5 ± 1.0

El voltaje fue medido en circuito abierto (VCA), los valores fueron muy inestables en los primeros días de medición (hasta el día 30); los valores registrados fueron variables desde 24.53 hasta 126.81 mV, la celda se mantuvo expuesta a luz solar directa, al aire libre, con el propósito de observar la influencia de la radiación solar en el voltaje y se guardaba por las noches en el laboratorio, así mismo la celda

permanecía guardada los fines de semana, no obstante, no se notó ninguna influencia significativa por la radiación, la celda se mantuvo bajo un sistema en lote con una alimentación inicial, sin embargo fue necesario agregar solución nutritiva para el mantenimiento de la misma y esto se realizó en el día 30, en este mismo día se observó una influencia por la adición de solución nutritiva lo que hizo que el voltaje aumentara de 40.5 hasta 212.14 mV (día 35), a partir de este momento y hasta la siguiente adición de solución nutritiva (Día 45) el voltaje se mantuvo en 25.41 ± 3.17 mV. El voltaje máximo en circuito abierto fue de 256 mV el día 69. La celda permaneció en el mismo lugar, a la sombra durante las 48 horas previas. El día 75, con el propósito de disminuir las fluctuaciones de temperatura al exterior del laboratorio y que de esta manera no se afectara la actividad microbiana en la celda, esta se colocó en el interior del laboratorio, en un lugar en donde recibía la luz solar directamente durante la mayor parte del día, después del cambio de ubicación se observó un descenso en el VCA hasta valores menores a 200 mV durante los últimos días de experimentación (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Resultados de pH, Conductividad Eléctrica y Potencial de Voltaje en Circuito Abierto (VCA)

DIA	pH		Voltaje en Circuito Abierto (VCA) mV	
	Celda sin Planta	Celda con Planta	Celda sin Planta	Celda con Planta
0	6.0	6.0	20 ± 0.5	24.53 ± 0.3
8	6.12	6.24	111.32 ± 2.3	125.32 ± 1.1
15	6.15	6.44	100.23 ± 2.5	122.38 ± 5.0
23	6	6.43	125.66 ± 1.3	125.81 ± 4.2
30	6.11	6.33	125.16 ± 1.8	126.81 ± 4.2
35	6.21	6.34	32.02 ± 2.2	40.5 ± 3.3
45	6.2	6.54	30.02 ± 2.4	212.14 ± 1.8
56	6.11	6.56	30.35 ± 5.3	155.45 ± 4.2
69	6.18	6.23	45.34 ± 3.2	256 ± 1.2
75	6.19	6.33	100.32 ± 8.3	200.11 ± 1.1
90	6.12	6.33	100.53 ± 21	200 ± 1.3

3.5 Aislamiento de Cepas

A partir del aislamiento de la celda de combustible microbiana acoplada a *Typha latifolia* se realizó el aislamiento de diferentes tipos de cepas, el medio utilizado para el aislamiento de cepas bacterianas fue agar nutritivo, a la par se realizó el aislamiento de cepas fúngicas en agar papa dextrosa pues fue posible observar el crecimiento de diferentes colonias fúngicas, de acuerdo con la Figura 3.1. y 3.2.



Figura 3.1. Cepas Bacterianas aisladas en Agar Nutritivo



Figura 3.2. Cepas Fúngicas aisladas en Agar de papa y dextrosa

De las cepas obtenidas se realizó una resiembra en agar medio mineral, en el cual se utilizó como fuente de carbono acetato de sodio, el cual se utilizó como criterio de selección para aquellas cepas que tuvieran capacidad para degradar materia orgánica, pues el acetato de sodio es una fuente de carbono de tipo inorgánico, después de esta selección se obtuvieron 5 cepas fúngicas y un consorcio bacteriano, los cuales fueron nombrados de acuerdo a la nomenclatura presente en la Tabla 3.3. donde se menciona el agar, cepa y la nomenclatura usada al igual el método de sembrado:

Tabla 3.3. Siembra de cepas			
Agar	Cepa	Nomenclatura	Método de sembrado
PDA	Fúngica	HTYP01.1	Picadura en el centro de caja Petri
		HTYP01.2	
		HTYP01.3	
	Fúngica	HTYP02.1	
		HTYP02.2	
		HTYP02.3	
	Fúngica	HTYP03.1	
		HTYP03.2	
		HTYP03.3	
	Fúngica	HTYP04.1	
		HTYP04.2	
		HTYP04.3	
	Fúngica	HTYP05.1	
		HTYP05.2	
		HTYP05.3	
Nutritivo	Bacteriana	BTYP01.1	Estría cruzada
		BTYP01.2	
		BTYP01.3	
		BTYP01.4	
		BTYP01.5	

- Se contó con 5 cepas fúngicas y 1 consorcio bacteriano.
- En el caso de las cepas fúngicas se hizo por triplicado en medio PDA (Agar de papa y dextrosa).
- Para el caso de la cepa bacteriana se realizó por quintuplicado en medio nutritivo.
- Se dejó en incubación por 5 días a 30°C.

A continuación, se presentan las evidencias fotográficas de las cepas (Figura 3.3) antes mencionadas:

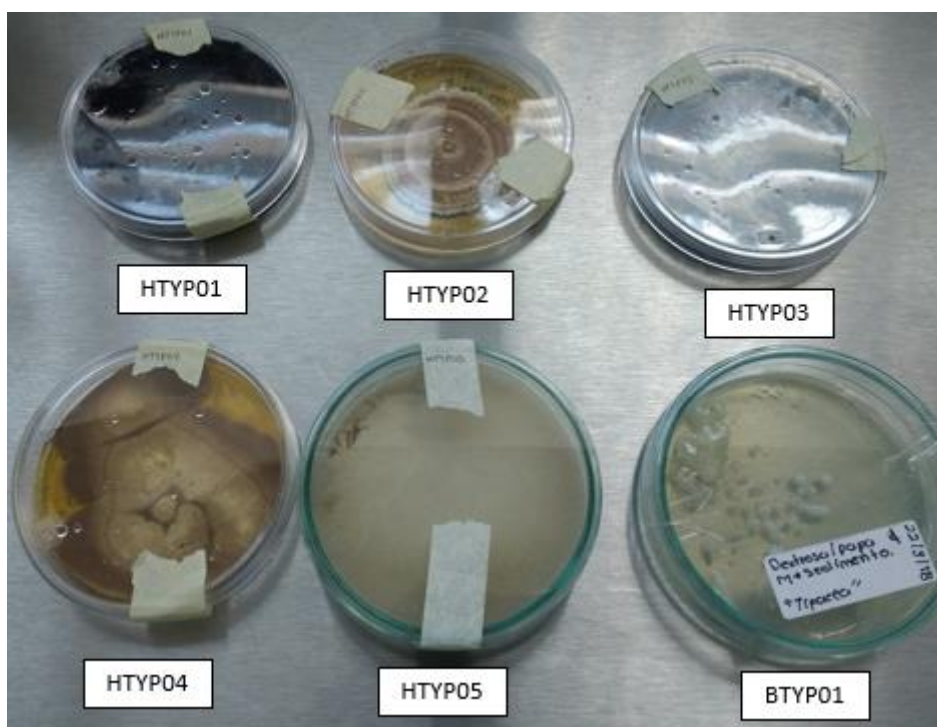


Figura 3.3 Cepas fúngicas y cepa bacteriana aislada de rizósfera de *Typha latifolia*

3.6 Siembra de cepas fúngicas y consorcio bacteriano en placa

Una vez que se evaluaron las cepas que crecieron en acetato de sodio se purificaron las cepas microbianas, en el caso de las cepas fúngicas con nomenclatura HTYP mientras que el consorcio bacteriano con nomenclatura BTYP01.4, ambos grupos se sembraron en medio mineral en medios diferenciales para determinar la asimilación de diferentes tipos de carbohidratos Almidón, Glucosa y Lactosa, para la determinación cualitativa de lipasas se utilizó Tween 80®, y para el caso de la determinación cualitativa de proteasas se utilizó medio TSA el cual tiene como base el uso de leche descremada, en la Tabla 3.5 se indican los resultados del crecimiento radial (Figura 3.4.) en agar TSA y Tween 80® para las cepas fúngicas dadas en la Tabla 3.4. estas pruebas en placa se realizaron para las cepas previamente aisladas y que fueron capaces de crecer en medio mineral con acetato de sodio como fuente de carbono.

Tabla 3.4. Siembra de cepas fúngicas y consorcio bacteriano en placa

Agar		Cepa	Nomenclatura	Método de sembrado	
Medio Mineral	Almidón	Fúngica	HTYP01.1.1	Picadura en el centro de caja Petri	
			HTYP01.1.2		
			HTYP01.1.3		
	Glucosa		HTYP01.1.1		
			HTYP01.1.2		
			HTYP01.1.3		
	Lactosa		HTYP01.1.1		
			HTYP01.1.2		
			HTYP01.1.3		
	Almidón		Fúngica		HTYP02.1.1
					HTYP02.1.2
					HTYP02.1.3
	Glucosa	HTYP02.1.1			
		HTYP02.1.2			
		HTYP02.1.3			
	Lactosa	HTYP02.1.1			
		HTYP02.1.2			
		HTYP02.1.3			
	Almidón	Fúngica			HTYP03.2.1
					HTYP03.2.2
					HTYP03.2.3
	Glucosa		HTYP03.2.1		
			HTYP03.2.2		
			HTYP03.2.3		
Lactosa	HTYP03.2.1				
	HTYP03.2.2				
	HTYP03.2.3				
Almidón	Fúngica	HTYP04.1.1			
		HTYP04.1.2			

	Glucosa		HTYP04.1.3		
			HTYP04.1.1		
			HTYP04.1.2		
			HTYP04.1.3		
			HTYP04.1.1		
			HTYP04.1.2		
	Lactosa		HTYP04.1.3		
			HTYP05.3.1		
	Almidón		HTYP05.3.2		
			HTYP05.3.3		
			HTYP05.3.1		
	Glucosa		Fúngica		HTYP05.3.2
			HTYP05.3.3		
			HTYP05.3.1		
Lactosa	HTYP05.3.2				
	HTYP05.3.3				
	HTYP05.3.3				
Tween 80®		Bacteriana	BTYP01.4.1	Estría cruzada	
			BTYP01.4.2		
			BTYP01.4.3		
			BTYP01.4.4		
			BTYP01.4.5		
TSA			BTYP01.4.1		
			BTYP01.4.2		
			BTYP01.4.3		
			BTYP01.4.4		
			BTYP01.4.5		
Medio Mineral	Almidón	BTYP01.4.1			
		BTYP01.4.2			
		BTYP01.4.3			
	Lactosa	BTYP01.4.1			
		BTYP01.4.2			
		BTYP01.4.3			
Glucosa	BTYP01.4.1				

			BTYP01.4.2	
			BTYP01.4.3	

Tabla 3.5 Crecimiento radial			
Agar	Cepa	Nomenclatura	Crecimiento radial (cm)
TSA	Fúngica	HTYP01	4.8
		HTYP01'	3.5
		HTYP01''	3.1
	Fúngica	HTYP02	0.9
		HTYP02'	1.6
		HTYP02''	1.9
	Fúngica	HTYP03	1.5
		HTYP03'	1.1
		HTYP03''	2.9
	Fúngica	HTYP04	0.7
		HTYP04'	0.6
		HTYP04''	0.7
	Fúngica	HTYP05	3.1
		HTYP05'	2.8
		HTYP05''	3.6
Tween 80®	Fúngica	HTYP01	0.9
		HTYP01'	1.4
		HTYP01''	1.9
	Fúngica	HTYP02	0.9
		HTYP02'	1.2
		HTYP02''	1.9
	Fúngica	HTYP03	1.9
		HTYP03'	2.2
		HTYP03''	2.1
	Fúngica	HTYP04	1.2

		HTYP04'	1.6
		HTYP04''	1.5
	Fúngica	HTYP05	3.6
		HTYP05'	2.7
		HTYP05''	3.1

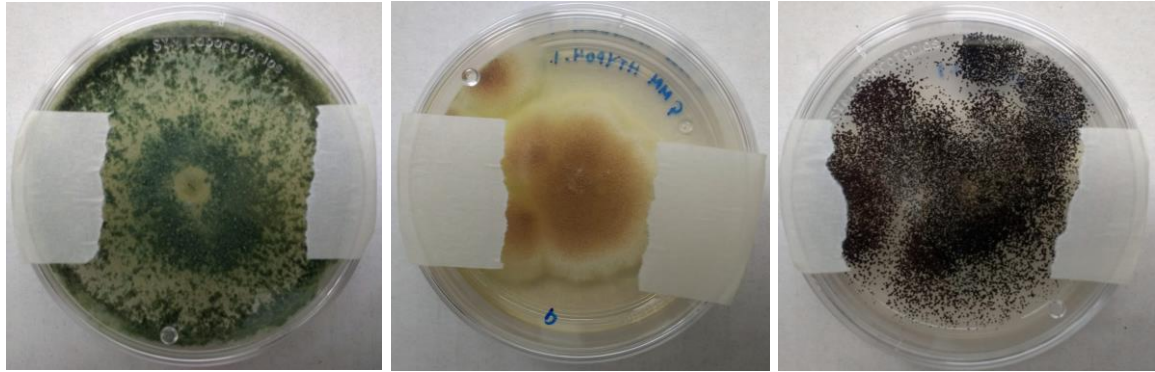


Figura 3.4. Crecimiento radial de las cepas

3.7 Pruebas Bioquímicas

Se realizaron pruebas microbiológicas para la determinación del tipo de microorganismos presentes en las celdas en funcionamiento, como inóculo base se utilizaron los lodos que estuvieron en la columna de Winogradsky, la cual se consideró pues era una muestra del suelo proveniente de la laguna de Epatlán, el cual se encontraba bioaumentado, los dispositivos en los que se recolectaron las muestras evaluadas llevaban 90 días de operación y además se tomó muestra del lodo que se utilizó como inóculo. Los microorganismos de interés en las celdas son los anaerobios, por lo que las pruebas microbiológicas comprendieron una prueba para la determinación de bacterias de acuerdo con el tipo de metabolismo que llevan a cabo (caldo de tioglicolato), esta prueba se utilizó debido a su fácil interpretación, en este medio simplemente se observa el crecimiento de los organismos estrictamente aerobios (cuando hay), en la parte superior del tubo de cultivo (Figura 3.5.), mientras que los anaerobios facultativos o anaerobios estrictos crecen en la profundidad del tubo y también son observables. Este medio permite el crecimiento de una amplia variedad de organismos estrictos y nutricionalmente exigentes sin necesidad de incubación en una atmósfera anaerobia. Por medio de la prueba de caldo de tioglicolato se observó el desarrollo de microorganismos en

el fondo del tubo como un sólido esponjoso, esto fue un indicador de la presencia de organismos anaerobios en el medio inoculado después de tres días de crecimiento.



Figura 3.5. Crecimiento en el Caldo Tioglicolato de las muestras tomadas en la celda (Izquierda) y en los lodos del inóculo (Derecha)

CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó un prototipo de celda de combustible microbiano acoplado a plantas de *Typha latifolia*, con la finalidad de demostrar que las bacterias asociadas a su rizósfera son capaces de degradar materia orgánica a la par de producir pulsos de energía eléctrica, los modelos de prototipo utilizados en este trabajo permitieron determinar la habilidad de estos consorcios bacterianos para degradar diferentes fuentes de materia orgánica desde carbohidratos simples hasta carbohidratos complejos, en ambos prototipos de celdas se obtuvo una medición de voltaje, pero a diferencia de la celda sin *Typha latifolia* los valores obtenidos fueron menores en comparación con la presencia de la planta, la cual registró valores estables de voltaje por lo que existe una relación entre la planta y los microorganismos inoculados en la celda; en el caso de la degradación materia orgánica se obtuvo un 60.64 % de degradación de materia orgánica y en el caso de la producción de energía se observaron diferencias significativas en el voltaje en circuito abierto (VCA) entre la celda sin planta con 125.66 ± 1.3 mV valor registrado a los 23 días del montaje y la celda con planta con 256 ± 1.2 mV registrado en el día 69; a la celda con planta se les añadió solución nutritiva y se expuso a radiación solar siendo esta un factor que no afectó el desarrollo experimental, en el día 75 se

cambió de ubicación para no afectar el crecimiento de los microorganismos, se observó que el voltaje en circuito abierto (VCA) disminuyó a 200 ± 1.3 por lo que la exposición a radiación solar es un factor importante para la planta y los microorganismos presentes en la celda, con respecto a la remoción de la materia orgánica entre los reactores con y sin inóculo sugieren que los microorganismos provenientes de la planta se encuentran en mayor proporción que el inóculo, dicha remoción entre los reactores implica que las raíces son portadores de microorganismos degradadores de materia orgánica, por lo que la celda que no contó con planta carece de microorganismos lo que ocasionó una remoción menor por lo que se comprueba que la rizósfera de *Typha latifolia* es un excelente reservorio para la presencia de bacterias con la habilidad para degradar materia orgánica y además de producir pulsos de energía que pueden ser medidos mediante un multímetro.

BIBLIOGRAFÍA

Catal, T., Kavanagh, P., O'Flaherty, V., & Leech, D. (2011). Generation of electricity in microbial fuel cells at sub-ambient temperatures. *Journal of Power Sources*, 196(5), 2676-2681. doi: 10.1016/j.jpowsour.2010.11.031

Chaudhry Q., Blom–Zandstra M., Gupta S. y Joner E.J. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12, 34–48

CORREA, Vega et al. (2015). “Microorganismos bioelectrogénicos” *Environ. Sci. Technol*, vol 19, nº4 (México) pp. 765-775.

DAUD, S. M., KIM, B.H., GHASEMI, M., DAUD, W. R. W. (2015) Separators used in microbial electrochemical technologies: current status and future prospects. *Bioresource technology*, 195, 170-179.

DU, Z. LI, H. & GU, T. (2007) “A state of the art review on microbial fuel cells:A promising technology for wastewater treatment and bioenergy”.*Biotechnology Advances*, vol.25,nº3 (Mexico) pp. 464-482.

Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. [En línea] [Fecha de consulta: 8 de enero de 2019] Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21062a.html>

GERTEISEN, Dietmar., etal. AC impedance modelling study on porous electrodes of proton exchange membrane fuel cells using an agglomerate model. *Journal of Power Sources*. Alemania. Vo. 1. 2007, pp. 346 – 356.

Gonzalez del Campo, A., Lobato, J., Cañizares, P., M.A., R., & Fernandez Morales, F. (2013). Short-term effects of temperature and COD in a microbial fuel cell. *Applied Energy*, 101, 213-217. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.02.064.

Gupta R., Gupta N. y Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763–781

Helder, M., Strik, D. P., Hamelers, H. V., & Buisman, C. J. (2012). The flat-plate plant-microbial fuel cell: the effect of a new design on internal resistances. *Biotechnology for Biofuels*, 5(70), 10. doi:10.1186/1754-6834-5-70

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California. Agricultural Experiment Station. Circular 347. 32 p

Huang L, Regan JM, Quan X. (2011). Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells, *Bioresource Technology*: 102 (1), 316-323

LEÓN, G et al. (2007) “Propiedades catalíticas del humus y su potencial aplicación en la degradación de contaminantes prioritarios”. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, vol. 3, nº 2, (Chile) pp. 118-128.

LIU, S. SONG, H., LI, X., YANG, F. (2013) Power generation enhancement by utilizing plant photosynthate in microbial fuel cell coupled constructed wetland system. *International Journal of Photoenergy*.

LIU, Zhang. (2009) Study of operational performance and electrical response on mediator-less microbial fuel cells fed with carbon- and protein-rich substrates. *Biochemical Engineering Journal*. Suecia. Vol.45, No.3, pp. 185–191.

Muratova, A., Hubner, T., Narula, N., Wand, H. (2003). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological research*, 158(2), 151.

NMX-AA-030- SCFI-2012, [En línea] [Fecha de consulta: 8 de enero de 2019] Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166774/NMX-AA-030-1-SCFI-2012.pdf>

PANWAR, N., et al. (2011) Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. India. Vol.15. No. 2., pp. 1513-1524.

Prescott H. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*. Fifth ed. The McGraw–Hill Companies, 466 p.

Public Health Association, American & Water Works Association, American & Pollution Control Federation, Water. (2019). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales / American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. SERBIULA (sistema Librum 2.0).

REVELO, Dolly M et al. (2013) “Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica”. *Información tecnológica*, vol. 24, nº 6, (Colombia) pp. 17-28.

RISSO, C. (2009) “Genome-scale comparison and constraintbased metabolic reconstruction of the facultative anaerobic Fe (III)-reducer *Rhodoferrax ferrireducens*”. *BMC Genomics*, vol. 22: nº 10, (Great Britain) p. 447.

Salgado-Bernal, I, Duran-Dominguez, C, Cruz-Arias, M., Carballo-Valdes, M.E., Martinez-Sardiñas, A. (2012). Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 17-26

SHARMA, Yogesh., & LI, Baikun. (2010) Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC), *International Journal of Hydrogen Energy*. Estados Unidos. Vol. 35, No. 8., pp. 3789-3797.

Shon H.K. y Vigneswaran S. (2006). Effluent Organic Matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36, 327–374.

Timmers, R. A., Strik, D.P.B. T. B., Hamelers, H. V. M., Buisman, C. J. N. (2013) Electricity generation by a novel design tubular plant microbial fuel cell. *Biomass and Bioenergy.*, 51, 60–67.

Triviño Cuellar, O. M. (2006). Estudio, diseño y construcción de una celda de combustible microbiana de una sola cámara para generación de energía eléctrica y tratamiento de aguas residuales. *Trabajo de grado en maestría en Ingeniería Mecánica*. Bogotá D.C., Colombia: Univerisdad de los Andes.

Xia Y., Kong Y. y Nielsen P.H. (2007). In situ detection of protein–hydrolysing microorganisms in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 156–165.

Zhang, X., Cheng, S., Huang, X., & Logan, B. E. (2010). Improved performance of single-chamber microbial fuel cells through control of membrane deformation. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(7), 1825-1828. doi: 10.1016/j.bios.2009.11.018.

Zhao Y, Collum S, Phelan M, Goodbody T, Doherty L, Hu Y. (2013). Preliminary investigation of constructed wetland incorporating microbial fuel cell: batch and continuous flow trials. *Chem Eng J.* 229, 364 – 370.