



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“EVALUACIÓN DEL BIOFILM SOBRE
ELECTRODOS MODIFICADOS DENTRO
DE UN SISTEMA ELECTROQUÍMICO
INOCULADO CON *SHEWANELLA*
ONEIDENSIS MR-1 EN PRESENCIA DE
MICROORGANISMOS AMBIENTALES”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

SILVIA SATO SOTO

LIMA – PERÚ

2020

ASESOR DE TESIS

Dr. José Luis Bauer Cuya

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A todos mis profesores en Perú y Japón.

A mis amigos, colegas, y quienes me apoyaron para presentar esta investigación.

DEDICATORIA

A mi familia y todos los que me motivaron a seguir en esta carrera.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar con el grado de Maestro en Microbiología ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado por el laboratorio de Bioelectroquímica de la Universidad de Tsukuba y la beca “Monbukagakusho”, subvencionada por el gobierno Japonés para estudios de posgrado.

Tabla de contenido

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2.2. MARCO TEÓRICO	5
2.2.1. <i>Sistemas bioelectroquímicos: Tecnologías electroquímicas microbianas y celdas de combustible microbiano</i>	5
2.2.2. <i>Mediadores redox</i>	7
2.2.3. <i>Microorganismos electrogénicos</i>	10
2.2.4. <i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	10
2.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	13
2.4. HIPÓTESIS	15
2.5. OBJETIVOS	15
2.5.1. <i>Objetivo general:</i>	15
2.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	15
3. METODOLOGÍA	16
3.1. Diseño del estudio	16
3.2. Tratamiento de los electrodos	19
3.3. Modificación de electrodos por voltametría cíclica y evaluación por microbalanza de cristal de cuarzo	19
3.4. Diseño e Instalación de celdas electroquímicas o reactores	21
3.5. Cultivo y cosecha de Shewanella oneidensis MR-1	23
3.6. Conteo celular	24
3.7. Monitoreo de las celdas electroquímicas por cronoamperometría y voltametría cíclica 25	
3.8. Medición de la concentración de sustrato	26
3.9. Análisis del biofilm basado en el gen 16S rRNA	27

4. RESULTADOS	29
4.1. Modificación por voltametría cíclica	29
4.2. Cronoamperometría y eficiencia Coulúmbica	32
4.3. Consumo de lactato y acetato	35
4.4. Estabilidad de la modificación por voltametría cíclica	38
4.5. Estructura del biofilm	39
5. DISCUSIÓN	44
5.1. Modificación por voltametría cíclica y su estabilidad	44
5.2. Evaluación de los sistemas	46
5.3. Estructura del biofilm	48
6. CONCLUSIONES	53
6.1. Recomendaciones	54
6.2. Limitaciones	54
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmula estructural del rojo neutro..... 9
- Figura 2. Fórmula estructural de azul de toluidina 10
- Figura 3. Esquema general de las fases del experimento..... 16
- Figura 4. Esquema de la celda electroquímica utilizada y sus componentes (izquierda). El sistema constó de tres electrodos: electrodo auxiliar (Platino), electrodo de referencia (AgAgCl) y el electrodo de trabajo (fieltro de carbono conectado a cable de titanio). La superficie de los fieltros de carbono fue modificada electroquímicamente con rojo neutro o azul de toluidina. Como tratamiento control se utilizaron fieltros de carbono no modificados. El microorganismo fue el mismo en todos los tratamientos. Fotografía de la celda electroquímica (derecha). 17
- Figura 5. Fotografía del fieltro de carbono utilizado y el cable de titanio (izquierda) y esquema del fieltro con el cable de titanio insertado (derecha) 20
- Figura 6. Esquema de los tratamientos realizados con lactato o acetato como sustrato y con fieltros de carbono no modificados con mediador redox (SL, SA) y modificados con 2 mediadores redox distintos: rojo neutro (NRL NRA) y azul de toluidina (ATL, ATA). 23
- Figura 7. Voltamogramas de la modificación con azul de toluidina (A) y rojo neutro (B) utilizando una placa de cristal de cuarzo recubierta con carbono como electrodo (sección 3.3). Frecuencia (Hz) vs. tiempo (segundos)

como eje secundario durante la modificación con azul de toluidina (C) y rojo neutro (D). 30

Figura 8. Voltamograma durante la modificación electroquímica con rojo neutro NR(A) o NR(L), y azul de toluidina en el fieltro de carbono. 31

Figura 9. Voltamogramas luego de la modificación de la superficie del fieltro de carbono. TB corresponde al electrodo modificado con azul de toluidina, RNA y RNL con rojo neutro, y Bare1 y Bare 2 sin modificación. 32

Figura 10. Corriente durante la primera fase, en miliamperios, producida en los tratamientos con lactato (SL, RNL, ATL) y acetato (SA, RNA, ATA) en donde las reacciones de oxidación se producen en los electrodos no modificados (SL, SA) y modificados con rojo neutro (RNL y RNA), y azul de toluidina (ATL, ATA). 33

Figura 11. Corriente durante la tercera fase, en miliamperios. 34

Figura 12. Eficiencia coulúmbica en porcentaje 35

Figura 13. Concentración de acetato (SA, RNA, ATA) y lactato (SL, RNL, ATL) en las muestras colectadas del medio de cada tratamiento durante la fase 1 (figura 13A) y fase 3 “recuperación del sistema” (Figura 13B). Las líneas punteadas representan la corriente ya mostrada en la figura 10 y 11. La figura 13B muestra adicionalmente la concentración de acetato remanente en los tratamientos SL (◆), RNL (◆) y ATL (◆). Solo se

incluyeron las concentraciones menores y cercanas a 20mM de acetato..... 37

Figura 14. Voltamogramas de los tratamientos realizados a lo largo del tiempo. Solo se muestran las curvas en donde se detectó un cambio en su corriente. La última medición en los tratamientos con acetato ocurrió el día 69, mientras que en los tratamientos con lactato se realizó el día 89. 39

Figura 15. Resultados del secuenciamiento del gen 16S rRNA. Dentro de todos los tratamientos se incluyen los resultados del análisis de muestras de medio (M) o fieltros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3..... 40

Figura 16. Resultados del análisis del gen 16S rRNA a nivel de familia utilizando la base de datos "SILVA". Dentro de todos los tratamientos se incluyen los resultados del análisis de muestras de medio (M) o fieltros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3.....41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la modificación y caracterización con rojo neutro o azul de toluidina.

Tabla 2. Géneros identificados solo en los tratamientos con los filtros de carbono modificados con azul de toluidina y el porcentaje que cada OTU representó dentro del biofilm de cada muestra.

Tabla 3. Géneros identificados solo en los tratamientos con los filtros de carbono modificados con rojo neutro y el porcentaje que cada OTU representó en cada muestra.

Tabla 4. Géneros identificados solo en los tratamientos con los filtros de carbono no modificados y el porcentaje que cada OTU representó en cada muestra.

GLOSARIO

Ánodo – Electrodo en donde las reacciones de oxidación ocurren y el flujo de electrones inicia dentro de una celda de combustible microbiana.

Biofilm – Estructura tridimensional compleja compuesta por microorganismos que interactúan y crecen embebidos dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellos mismos producen.

Cátodo - Electrodo en donde las reacciones de reducción ocurren.

Celda de combustible microbiano (CCM): un tipo de tecnología electroquímica microbiana (TEM) que utiliza microorganismos para oxidar compuestos orgánicos a energía química de compuestos orgánicos en energía

Cronoamperometría (CA) - técnica electroquímica que permite evaluar la corriente producida bajo un determinado potencial que es aplicado constantemente.

Electrodo – Material sólido que funciona como aceptor o donador de electrones por su característica conductiva.

Frecuencia (Hz) – unidad física de medida para ciclos por segundo.

Mediador redox – molécula de origen natural o artificial que funciona como transportador de electrones y facilita la transferencia de electrones dentro de los sistemas bioelectroquímicos.

Microbalanza de cristal de cuarzo (MCQ) – equipo piezoeléctrico sensible al cambio de masas que se basa en un cristal de cuarzo oscilatorio capaz de detectar este cambio a una escala de nanogramos.

Microorganismo electrogénico – Microorganismo capaz de realizar una transferencia de electrones extracelular (TEE).

Microorganismos electroquímicamente activos (MEA) – Microorganismos capaces de dirigir un flujo de corriente en electrodos.

Potencial redox – Medida que permite estimar la facilidad con la que una molécula aceptaría o donaría electrones.

Sistema bioelectroquímico – Sistemas que combinan procesos biológicos y electroquímicos al utilizar enzimas o microorganismos para catalizar reacciones redox.

Tecnología electroquímica microbiana (TEM) – tecnología basada en sistemas bioelectroquímicos que utiliza microorganismos como catalizadores de reacciones redox.

Voltametría cíclica (VC) – técnica electroquímica que permite evaluar la corriente producida dentro de un rango de potencial aplicado. Sirve para evaluar las reacciones redox que ocurren a distintos potenciales aplicados.

RESUMEN

En las tecnologías electroquímicas microbianas (TEM) los electrodos son componentes muy importantes ya que sirven como soporte para la formación de biofilms y como aceptores (ánodo) o donadores de electrones (cátodo). Su superficie está en constante interacción con los microorganismos y dependiendo de sus propiedades, puede afectar a la formación del biofilm. Desde el biofilm, los microorganismos electrogénicos pueden transferir electrones hacia el ánodo, que obtienen por la oxidación del sustrato presente en el medio. Los mediadores redox mejora esta transferencia de electrones, pero si son inmovilizados sobre la superficie del ánodo, podrían ejercer un efecto sobre la formación del biofilm. Para evaluar este efecto, fieltros de carbono fueron modificados electroquímicamente con dos mediadores redox distintos. Se evaluó el establecimiento del biofilm por voltametría cíclica y cronoamperometría, usando lactato o acetato como sustrato específico y no específico para *Shewanella oneidensis* MR-1, respectivamente. Los resultados demuestran una mayor corriente en los tratamientos con lactato y con los ánodos modificados con los mediadores redox. Asimismo, *Shewanella* se mantuvo presente en todos los tratamientos, pero no fue el microorganismo predominante en ninguno de ellos. Los géneros presentes en todos los tratamientos fueron *Pseudomonas* y *Variovorax*, pero los géneros *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas* y otros que representaron <1% en los biofilm marcaron las diferencias entre los tratamientos.

Palabras claves: *Shewanella oneidensis*, filtros de carbono, biofilm, mediadores redox, sustratos.

ABSTRACT

Electrodes are very important components within microbial electrochemical technologies (MET) as they work as a support for biofilm growth and as an electron acceptor (anode) or electron donor (cathode). Their surface is in constant interaction with the microorganisms and depending on its properties, it could affect the biofilm formation. From the biofilm, the electrogenic microorganisms can transfer the anode the electrons they obtain from the oxidation of the substrate. Redox mediators can improve the electron transfer but if they are immobilized onto the anode surface, they may affect the biofilm formation. In order to evaluate this effect, carbon felts were modified electrochemically with 2 different redox mediators. The biofilm establishment was evaluated by cyclic voltammetry and chronoamperometry, using lactate or acetate as specific and non-specific substrate for *Shewanella oneidensis* MR-1, respectively. The results showed a higher current in the lactate treatments with the redox mediators modified anodes. Moreover, *Shewanella* remained present in all the treatments, but was not the predominant in any of them. *Pseudomonas* and *Variovorax* were also found in all the treatments, but genera like *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas* and others that represented <1% within the biofilms made the difference between treatments.

Key words: *Shewanella oneidensis*, carbon felt, biofilm, redox mediators, substrates.

1. INTRODUCCIÓN

Las celdas de combustible microbianas son un tipo de tecnología electroquímica microbiana que utiliza a los microorganismos como catalizadores de reacciones redox en las cuales se transfieren electrones hacia o desde electrodos permitiendo que a su vez se genere energía (Rabaey, 2019, Bajracharya et al., 2016). Por estas características, estos sistemas han sido propuestos para procesos de tratamiento de aguas residuales acoplado a la producción de energía, para conseguir la auto-sostenibilidad del tratamiento. Además de estas aplicaciones también han sido propuestas para procesos de biorremediación, monitoreo de ambientes contaminados, secuestro de carbono, manejo de humedales, desalinización, producción de compuestos, producción de energía renovable, desalinización y como biosensores (Shah, Venkatramanan, & Prasad, 2019).

Se han conseguido ejecutar pocas pruebas piloto que dirijan hacia una implementación a escala industrial (Trapero, Horcajada, Linares, & Lobato, 2017). Las pruebas piloto reportadas incluyen la generación de energía eléctrica acoplada al tratamiento de aguas (Hiegemann et al., 2016; Linares et al., 2019; Thung et al., 2017; Tota-Maharaj & Paul, 2015; Wu et al., 2016), tratamiento de orina (Walter, Merino-jiménez, Greenman, & Ieropoulos, 2018), y restauración in-situ del sedimento de ríos (Li et al., 2017). Si bien, los pilotos han funcionado, aún las densidades de corriente no son suficientes para sostener procesos a nivel industrial. Una de las razones de esta limitación es por una baja

capacidad en la transferencia de electrones desde las células hacia el electrodo (Martinez & Alvarez, 2018a).

Unas de las estrategias para permitir una mejor transferencia de electrones es la aplicación de mediadores redox, moléculas sintéticas o naturales que actúan como transportadores de electrones entre los microorganismos y los electrodos. Estos mediadores redox pueden influir en el crecimiento y metabolismo en los microorganismos (D. H. Park & Zeikus, 1999) que a su vez, podrían influir en la formación y composición del biofilm promoviendo o no el crecimiento de especies capaces de transferir electrones. En el presente estudio se utilizará la modificación electroquímica de la superficie de fieltros de carbono con dos mediadores redox distintos y se evaluará el efecto de estas modificaciones en la composición de los biofilms que se desarrollen sobre estos electrodos modificados al final de los tratamientos.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La baja transferencia de electrones es uno de los problemas que limita la aplicación de las celdas de combustible microbianas a escalas industriales. Muchas investigaciones se han realizado en torno a la solución de este problema como la exploración de distintos microorganismos electroactivos (Fan & Xue, 2016), el mejoramiento genético de los microorganismos (West, Jain, & Gralnick, 2017), el uso de mediadores redox (Martinez & Alvarez, 2018b, Mardiana et al., 2015), distintos diseños de reactor (Shah et al., 2019), el uso de distintos materiales para los electrodos (Zhou, Chi, Luo, He, & Jin, 2011), etc. Sin embargo, todos estos puntos no deben considerarse de manera aislada.

Los microorganismos, dentro de las CCM, forman estructuras complejas que se denominan “biofilm” y se establecen sobre la superficie de los electrodos dependiendo de ciertas características relacionadas al tipo de material, su carga, hidrofobicidad, etc (Guo, Freguia, et al., 2013). A esto se le debe sumar no solo la interacción del biofilm con la superficie, sino también la interacción entre distintas especies que componen finalmente el biofilm bajo ciertas condiciones. Es decir, el estudio de este espacio “biofilm-electrodo” es muy importante para un buen funcionamiento de las CCM ya que es aquí donde se establecen las condiciones para una buena transferencia de electrones. Esta interacción “biofilm-electrodo” debe ser considerada en todo momento que se decida trabajar con estos sistemas y al elegir nuevos materiales.

Los materiales más utilizados por ser más idóneos en estos sistemas son los electrodos basados en carbono. Estos materiales, como el uso de mediadores redox, ha dado buenos resultados. En el estudio de Mardiana et al., (2015) se reportó que el rojo neutro polimerizado sobre la superficie de fieltros de carbono daba las densidades de corriente más altas de entre todos los tratamientos. Guo et al., (2013) también reportó una densidad de corriente más alta al modificar la superficie de fieltros de grafito con rojo neutro. Sin embargo, estos estudios no describen si la modificación del ánodo afecta también a la composición del biofilm. Solo Guo et al., (2013) realiza una evaluación mediante un mapeo topográfico por microscopía de fuerza de masas, pero no da cuenta del cambio de los microorganismos que finalmente componen el biofilm, un aspecto muy importante al tratarse de los biocatalizadores del sistema y los que liberan los electrones hacia el espacio extracelular para que finalmente lleguen al ánodo.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. *Sistemas bioelectroquímicos: Tecnologías electroquímicas microbianas y celdas de combustible microbiano*

Dentro de los sistemas bioelectroquímicos (SBE), las tecnologías electroquímicas microbianas (TEM) engloban una serie de sistemas que utilizan microorganismos electroquímicamente activos (MEA) para catalizar reacciones redox sobre la superficie de los electrodos. Los primeros estudios sobre estos sistemas se remontan a 1911, en donde Potter reportó que la descomposición de compuestos orgánicos por parte de *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies de bacterias inoculadas en una celda galvánica, pueden estar asociadas a cambios eléctricos (Potter, 1911). Demostró que durante el proceso de fermentación por parte de levaduras y otros microorganismos se genera una fuerza electromotriz expresada en voltios y que dependiendo de la concentración de sustrato (glucosa), cantidad de inóculo de microorganismo (expresado en gramos) y la temperatura del sistema, se genera esta fuerza electromotriz. Especialmente cuando las temperaturas eran no favorables para el crecimiento del microorganismo (0°C y 50°C) no se registró ningún cambio de voltaje, demostrando la relación entre la producción de corriente y el crecimiento del microorganismo (Potter, 1911). Distintas investigaciones se dieron sin captar mucha atención hasta la década de los 80's, cuando se reportaron las primeras investigaciones que sostenían que la densidad de corriente podía incrementarse

añadiendo mediadores de electrones o mediadores redox (Roller et al., 1984). Con el avance en las investigaciones, y la vinculación entre distintas disciplinas tanto fundamentales como aplicadas que incluyen biología, física, química, matemática, e ingeniería, se han podido identificar múltiples factores que afectan al rendimiento de estos sistemas. Estos factores están relacionados con el microorganismo, la configuración del reactor o celda, el material de los electrodos, el tipo de donador y aceptor de electrones, el tipo de catalizador, entre otros.

Las celdas de combustible microbiano (CCM) son un tipo de tecnologías electroquímicas microbianas (TEM) compuestas por dos compartimentos principalmente. En el compartimento anódico, donde ocurren las reacciones de oxidación, se liberan electrones que mediante un circuito migran al cátodo. En el compartimento catódico, los electrones finalmente son transferidos desde el cátodo hacia un aceptor final de electrones, como el oxígeno o algún compuesto oxidado que esté presente en el medio (Rabaey & Rozendal, 2010).

El compartimento anódico ha sido muy estudiado ya que es en éste donde se da la oxidación de la materia orgánica. El ánodo debe cumplir con ciertos criterios como una alta conductividad eléctrica, amplia área superficial, y ser biocompatible para un buen desarrollo del biofilm. Para ello se exploran diversos materiales y a la vez se

modifican para permitir un aumento en el área superficial específica, mejor biocompatibilidad, mejor intercambio de electrones entre electrodo-microorganismo, mayor conductividad intrínseca, mejor transferencia de masas de los sustratos y productos, y mejor adherencia (Guo, PrévotEAU, Patil, & Rabaey, 2015).

2.2.2. *Mediadores redox*

Los mediadores redox son compuestos que han permitido mejorar el funcionamiento de los sistemas electroquímicos ya que facilitan la transferencia de electrones hacia la superficie del ánodo (Goswami & Mishra, 2018). No obstante, deben cumplir con ciertas características para ser utilizados en los sistemas bioelectroquímicos. Deben tener una buena reversibilidad electroquímica y un potencial redox cercano al potencial redox del biocatalizador (Mardiana et al., 2015) o menor al de NAD (D. H. Park & Zeikus, 1999). Muchos de éstos reaccionan con varias enzimas redox e incluso pueden alterar algunas reacciones biológicas en los microorganismos cuando sus potenciales redox son menores al de NAD (D. H. Park & Zeikus, 1999).

La naturaleza de los mediadores redox es diversa, y son compuestos que pueden ser producidos por el mismo microorganismo, pueden encontrarse en el medio que rodea al microorganismo, o pueden ser compuestos químicos artificiales (Liu, Shi, & Gu, 2018). Entre los compuestos producidos por los microorganismos están las flavinas,

quinonas y fenazinas. Los compuestos naturales que se pueden encontrar en el medio por lo general son los ácidos húmicos. Y entre los compuestos químicos artificiales están el rojo neutro, ferrocianuro de potasio, 2-antraquinona, 6-disulfato, y polímeros de fosfolípidos sintetizados (Liu et al., 2018).

Uno de los compuestos químicos artificiales que ha sido utilizado en los sistemas bioelectroquímicos es el rojo neutro (Guo, Chen, et al., 2013; Mardiana et al., 2015; Doo Hyun Park, Kim, Shin, & Jeong, 2000; Doo Hyun Park & Zeikus, 2000). Esto se debe a que su potencial redox, -0.325 V vs. electrodo estándar de hidrógeno (EEH), es muy cercano al par NAD^+/NADH , -0.32 V (vs. EEH), que es utilizado dentro de la cadena transportadora de electrones durante el proceso de respiración (D. H. Park, Laivenieks, Guettler, Jain, & Zeikus, 1999) (Figura 1). Como lo demostró Park et al. (1999), al adicionar rojo neutro reducido electroquímicamente dentro de un sistema bioelectroquímico, *Actinobacillus succinogenes* aumentó en un 20% el consumo de glucosa y la producción de succinato en comparación al sistema que solo tenía glucosa, sin rojo neutro. Explica que esto sucede porque el rojo neutro reducido, libre en el medio, se une a la membrana celular, se oxida por la reducción de NAD, y luego nuevamente se reduce creando así electricidad, la cual permite a la célula ganar un mayor poder de reducción que las células que crecen solo con glucosa. Este incremento en la translocación de protones también ocasiona una

mayor síntesis de ATP, incremento del metabolismo y crecimiento. (D. H. Park & Zeikus, 1999). Por otro lado, Guo et al. (2013) modificaron la superficie de filtros de grafito mediante una reacción espontánea de las sales de diazonio de rojo neutro y encontraron que en una celda bioelectroquímica con acetato como sustrato y un cultivo mixto, la corriente aumentaba 3.63 veces más a comparación de los ánodos no modificados. En el caso de la modificación realizada por Mardiana et al. (2015), se vio que, al polimerizar el rojo neutro sobre la superficie de filtros de carbono, las densidades de corriente aumentaron en 9.36Am^{-2} con respecto al tratamiento que tenía el rojo neutro libre en la solución y no inmovilizado sobre la superficie del electrodo.

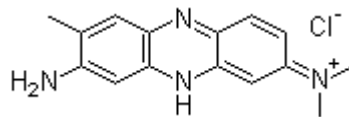


Figura 1. Fórmula estructural del rojo neutro.

En cambio, el azul de toluidina ha sido utilizado como mediador redox en estudios de oxidación de NADH aplicado a otro tipo de sistemas, mas no en celdas de combustible microbiano hasta la fecha (Thenmozhi & Narayanan, 2007). Su potencial redox es 0.03V y la única diferencia entre la molécula de azul de toluidina y el rojo neutro es el anillo central que contiene 2 átomos de nitrógeno en el caso del rojo neutro, mientras que en el caso del azul de toluidina hay un átomo de nitrógeno y otro de azufre (Figura 2).

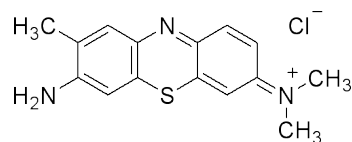


Figura 2. Fórmula estructural de azul de toluidina

2.2.3. *Microorganismos electrogénicos*

El término “microorganismos electrogénicos” es aplicado a aquellos que poseen la capacidad de utilizar la materia orgánica o sustratos, como donadores de electrones, y luego puedan transportar los electrones hacia un aceptor final extracelular sólido. Debido a esta característica pueden generar un flujo de electrones fuera de su célula y transferirlos a un electrodo (Kracke, Vassilev, & Krömer, 2015). Estos microorganismos dentro de la electroquímica microbiana también son denominados “exoelectrogénicos”, “bacterias electroquímicamente activas”, “anode respiring bacteria” y “electrogénicos”. Algunos géneros que han sido estudiados son *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Geobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, entre otras. En especial *Shewanella* y *Geobacter* han sido ampliamente empleados en las tecnologías electroquímicas microbianas por su capacidad de utilizar un amplio espectro de aceptores finales de electrones (Goswami & Mishra, 2018).

2.2.4. *Shewanella oneidensis* MR-1

Dentro de los microorganismos más estudiados está *Shewanella oneidensis* MR-1. Es una bacteria gram-negativa, anaerobio

facultativo, mesofílico, y pertenece a la clase *Gammaproteobacteria* (Scott & Nealson, 1994). Puede ser encontrada en ecosistemas marinos, aguas dulces, sedimentos y suelo (Fredrickson et al., 2008). Inicialmente su clasificación fue confusa (Venkateswaran et al., 2009), pasando a ser clasificada al inicio como *Alteromonas putrefaciens* (Myers & Nealson, 1988) o incluso como *Pseudomonas putrefaciens*, pero ya en 1999 es descrita por primera vez como una especie nueva y reconocida como tal (Venkateswaran et al., 2009). Como anaerobio facultativo, cuando se encuentra en aerobiosis puede utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo, en condiciones de anaerobiosis puede utilizar una serie de aceptores de electrones como fumarato, nitrato, dimetil-sulfóxido, tiosulfato, azufre elemental, y metales oxidados que incluyen Mn(III), Mn(IV), Fe(III), Cr(VI), U(VI) (Nealson, 2002). Debido a esta versatilidad ha sido un microorganismo modelo para una serie de investigaciones con aplicaciones diversas que incluyen la biorremediación.

La anotación de su genoma en el 2002 (Heidelberg et al., 2002) ha permitido dilucidar más acerca de los mecanismos que utiliza en la transferencia de electrones y las rutas metabólicas. Con respecto a las rutas metabólicas, se ha reportado que a distintas condiciones *Shewanella* es capaz de utilizar una serie de vías metabólicas que le permitirían sobrellevar cambios en el medio. Ante una condición de limitación de fuente de carbono, siendo lactato la principal fuente de

carbono, 61% del lactato entra al ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs mientras que alrededor de un 10% entra a la vía de oxidación de serina. Bajo estas condiciones también se vio que *Shewanella* utilizó la vía de las pentosas y Entner-Doudoroff para la producción de biomasa sin producción de acetato. En condiciones de microaerofilia, cerca del 35% del lactato es convertido en acetato (Tang, Hwang, Wemmer, & Keasling, 2007).

En cuanto a los mecanismos de transferencia de electrones, *Shewanella* es capaz de transferir los electrones al electrodo por mecanismos directos e indirectos. Para el mecanismo directo utiliza una serie de citocromos multiheme que se encuentran en su superficie, como en la superficie de apéndices denominados "nanocables" que le permiten entrar en contacto directo con el electrodo y transferir los electrones (Pirbadian et al., 2014). En el caso del mecanismo indirecto, *Shewanella* es capaz de producir flavina mononucleótido (FMN) y riboflavina (Von Canstein, Ogawa, Shimizu, & Lloyd, 2008) y sus citocromos poseen un sitio de unión para flavinas (Edwards et al., 2015).

2.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Para mejorar la eficiencia de las tecnologías microbianas, como las celdas de combustible microbiano, se necesita evaluar la interacción entre los componentes de cada uno de los compartimentos. Si bien es cierto que los mecanismos de transferencia de electrones directos dan mejores resultados siendo más eficientes, muy pocos microorganismos tienen esta capacidad (Pankratova & Gorton, 2017). En estos casos los mediadores redox cumplen una función importante para los microorganismos que no pueden realizar una transferencia directa al electrodo. En estudios anteriores se ha evidenciado que el uso de mediadores redox incrementa la densidad de corriente que se produce en estos sistemas (Mardiana et al., 2015). Mientras que el rojo neutro ha sido reportado como un mediador redox útil en celdas de combustible microbiano, no existe información del uso de azul de toluidina en celdas de combustible microbiano ni cómo los mediadores inmovilizados afectan al biofilm y al consumo de los sustratos administrados. Por lo tanto, se evaluarán los componentes del compartimento anódico en celdas electroquímicas de 3 electrodos para evaluar la interacción entre estos y cómo responden luego de pasar por un periodo sin la adición de sustrato.

Se utilizará lactato ya que favorece el crecimiento de *Shewanella oneidensis* MR-1. A otros tratamientos se les adicionará acetato para

no favorecer el crecimiento de *Shewanella* pero sí ver el efecto de la adición de otro sustrato que favorece normalmente el crecimiento de otros microorganismos electrogénicos. Además, como resultado del metabolismo de *Shewanella*, se ha reportado la acumulación de acetato, lo que nos podría dar una idea de lo que pasa con los microorganismos que aún persisten, a pesar de la posibilidad que *Shewanella* se convierta en el microorganismo predominante al agregar lactato.

2.4. HIPÓTESIS

La modificación de fieltros de carbono con mediadores redox permitirán el establecimiento de biofilms dominados por *Shewanella oneidensis* MR-1

2.5. OBJETIVOS

2.5.1. Objetivo general:

Evaluar los biofilms sobre los fieltros de carbono modificados con mediadores redox en un sistema electroquímico inoculado con *Shewanella oneidensis* MR-1

2.5.2. Objetivos específicos

- Modificar electroquímicamente fieltros de carbono con rojo neutro y azul de toluidina
- Comparar la generación de corriente entre los tratamientos con fieltros de carbono modificados y no modificados
- Analizar el consumo de lactato y acetato en los tratamientos con fieltros de carbono modificados y no modificados
- Evaluar la estabilidad de los electrodos de trabajo
- Evaluar la estructura de los biofilms en cada tratamiento

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio

Esta investigación fue de tipo experimental y su diseño consistió en tres fases:

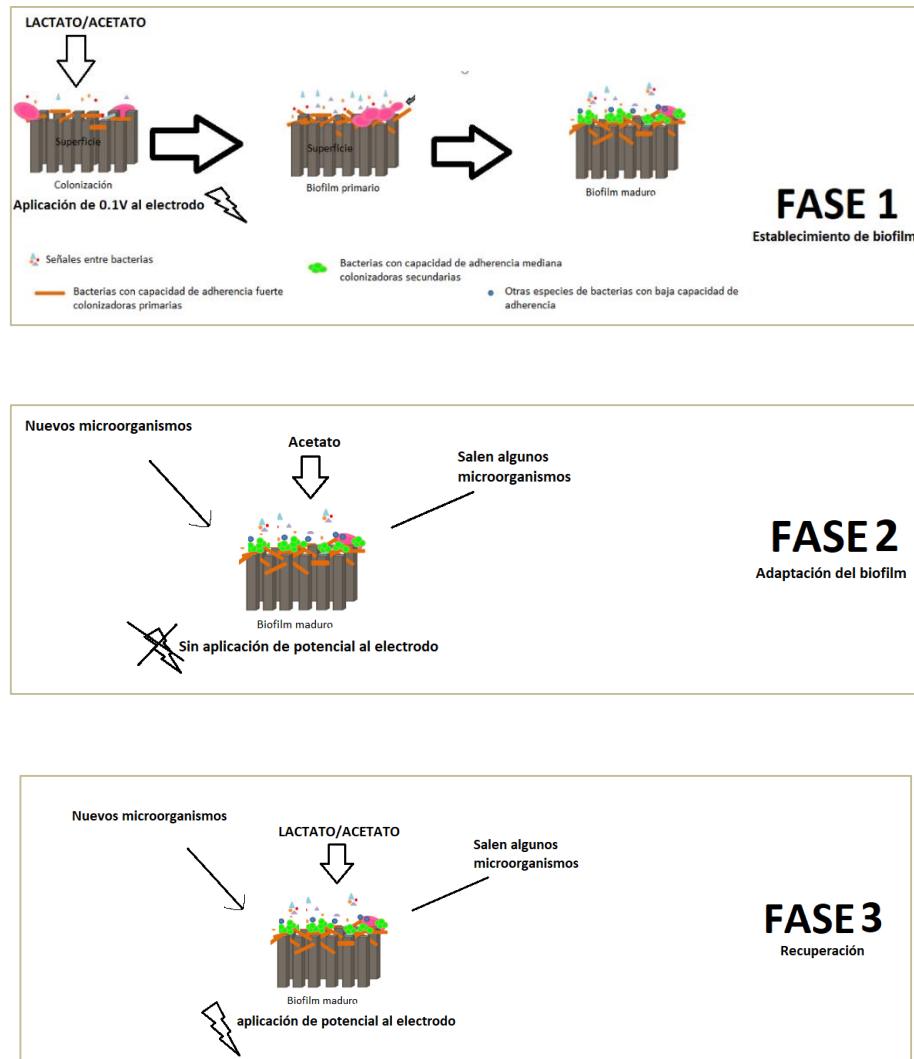


Figura 3. Esquema general de las fases del experimento.

1. Fase I: Establecimiento del biofilm

En esta fase se preparó cada uno de los componentes del sistema (electrodos, microorganismo y sustrato) y se ensamblaron los reactores o celdas electroquímicas. Los sistemas constaron de 3 electrodos, electrodo de trabajo (filtros de carbono modificados y no modificados), electrodo auxiliar (cable de platino) y de electrodo de referencia (Ag/AgCl)

Como se muestra en la figura 1. Se inoculó *Shewanella oneidensis MR-1*, para que forme el biofilm en presencia de microorganismos ambientales.

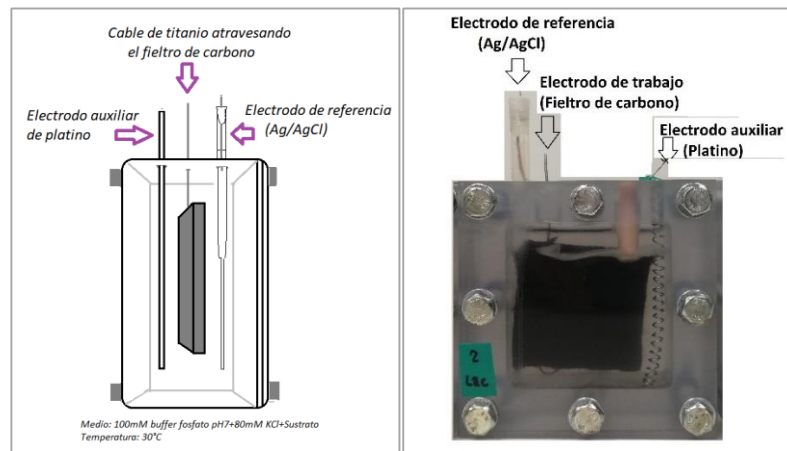


Figura 4. Esquema de la celda electroquímica utilizada y sus componentes (izquierda). El sistema constó de tres electrodos: electrodo auxiliar (Platino), electrodo de referencia (AgAgCl) y el electrodo de trabajo (filtro de carbono conectado a cable de titanio). La superficie de los filtros de carbono fue modificada electroquímicamente con rojo neutro o azul de toluidina. Como

tratamiento control se utilizaron filtros de carbono no modificados. El microorganismo fue el mismo en todos los tratamientos. Fotografía de la celda electroquímica (derecha).

2. Fase II: Consumo de acetato

En esta fase no se agregará sustrato alguno en el sistema, ni se aplicará potencial. Al final del periodo de estrés se recogerán muestras para medir la concentración de sustrato. Esta fase se llevó a cabo por un mes. Al no agregar ningún sustrato se evaluó principalmente el consumo del acetato en los tratamientos de lactato.

3. Fase III : Recuperación del sistema

Se agregó la misma concentración de sustrato que inicialmente se adicionó al sistema y se aplicó el mismo potencial que al inicio. Se monitoreó por cronoamperometría y voltametría cíclica. Además, se tomaron muestras para calcular la concentración de los sustratos. Al final se retiraron los electrodos de trabajo para realizar el análisis del gen 16S rRNA.

3.2. Tratamiento de los electrodos

Filtros de carbono (5cmx5cmx1cm) fueron tratados previamente para limpiar y preparar la superficie según como lo indica Mardiana et al. (2015). Cada filtro de carbono se sumergió en una solución de 1M HCl por al menos un minuto o hasta que la superficie se aprecie mojada. Se enjuagó con agua destilada y se sumergió en otra solución de 1:1 (v/v) etanol-agua. En este paso las burbujas empezaron a salir del interior del filtro de carbono y comenzó a sumergirse fácilmente hacia el fondo del vaso de precipitado. Con la ayuda de pinzas se removió el filtro de carbono y se enjuagó nuevamente con agua destilada. Se colocaron los filtros de carbono en otro vaso de precipitado con agua destilada y se llevó a sonicar por alrededor de 5 minutos a una frecuencia de oscilación de 42KHz. Los filtros de carbono se retiraron del vaso de precipitado con ayuda de pinzas y se dejaron sobre una superficie absorbente, para remover el exceso de agua. Luego de esto los filtros de carbono se utilizaron para su modificación electroquímica.

3.3. Modificación de electrodos por voltametría cíclica y evaluación por microbalanza de cristal de cuarzo

Filtros de carbono (5cmx5cmx1cm) se utilizaron como electrodos de trabajo y se modificaron en un sistema de 3 electrodos por voltametría cíclica. La voltametría cíclica es una de las técnicas utilizadas dentro de la electroquímica para la modificación de ciertas superficies con grupos

funcionales pero también ha sido muy utilizada en la electroquímica microbiana para estudiar la transferencia de electrones que ocurre entre los microorganismos/biofilms y el ánodo dentro de las celdas de combustible microbianas (Fricke, Harnisch, & Schröder, 2008; Labelle & Bond, 2005; López Zavala, González Peña, Cabral Ruelas, Delgado Mena, & Guizani, 2019). El contacto eléctrico en estos fieltros de carbono se consiguió pasando un cable de titanio en medio del grosor (1cm) del fieltro, sosteniéndose en el cable gracias a la forma de gancho en el extremo inferior (ver figura 5). Como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl y como electrodo auxiliar una malla de titanio (Ti) enrollada. El electrolito utilizado fue una solución con 100mM KCl, 5mM de rojo neutro o azul de toluidina.

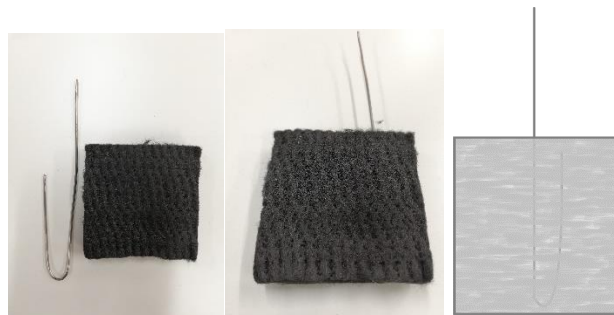


Figura 5. Fotografía del fieltro de carbono utilizado y el cable de titanio (izquierda) y esquema del fieltro con el cable de titanio insertado (derecha)

Los parámetros para la ejecución de la voltametría cíclica son las que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la modificación y caracterización con rojo neutro o azul de toluidina.

	Modificación	Caracterización
Potencial inicial	0.5 V	0.4 V
Potencial alto	1.2 V	-0.8 V
Potencial bajo	0.5 V	0.4 V
Velocidad de escaneo	0.02 V/s	0.1 V/s
Ciclos	5	3

Se realizó adicionalmente una evaluación de la modificación utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo QCA922A (Seiko EG&G Co., Ltd., Japan). Con ello se utilizaron láminas de cristal de cuarzo 9-MHz AT recubiertas con carbono (Seiko EG&G), siendo el área proyectada del electrodo de 0.196 cm². Se utilizaron los mismos parámetros para la modificación y se utilizó principalmente el cambio de la frecuencia para analizar la modificación con ambos monómeros. La ecuación de Sauerbrey (Mecea, 2006) fue utilizada para convertir el cambio de frecuencia en masa adsorbida y finalmente en nmol.

3.4. Diseño e Instalación de celdas electroquímicas o reactores

Los reactores que se utilizaron fueron de una sola cámara y fueron adaptados para funcionar como celdas electroquímicas de 3 electrodos, en donde los fieltros de carbono funcionaron como electrodos de trabajo, como electrodo auxiliar se utilizó 30cm de cable de platino (Pt) enrollado, y como electrodo

de referencia se utilizó Ag/AgCl. Todas las partes que componen cada reactor se limpiaron con alcohol al 70%, y se colocaron dentro de una cabina de flujo laminar. Las partes se dejaron bajo luz UV por al menos 20 minutos. Se ensambló cada reactor completamente dentro de la cabina de flujo laminar. Una vez ensamblados, los reactores se llenaron con 100mL de solución buffer estéril conteniendo 100mM buffer fosfato pH7 y 80mM KCl con la ayuda de una jeringa de capacidad de 50mL. Este medio se utilizó para poder diferenciar las reacciones de oxidación que ocurran sobre el sustrato. Luego, el inóculo de *Shewanella oneidensis* MR-1 se adicionó a cada reactor. Se colocaron tapones de goma para sellar el sistema y sostener el cable de titanio que conecta el electrodo de trabajo; y para permitir el escape de gases se colocó tapones estériles Silicosen® que a su vez protegieron para que no entren contaminantes al sistema. El sustrato se adicionó luego de 6 horas de que se adicionó el microorganismo. Se calculó la cantidad necesaria para obtener cerca de 10mM de sustrato en cada reactor.

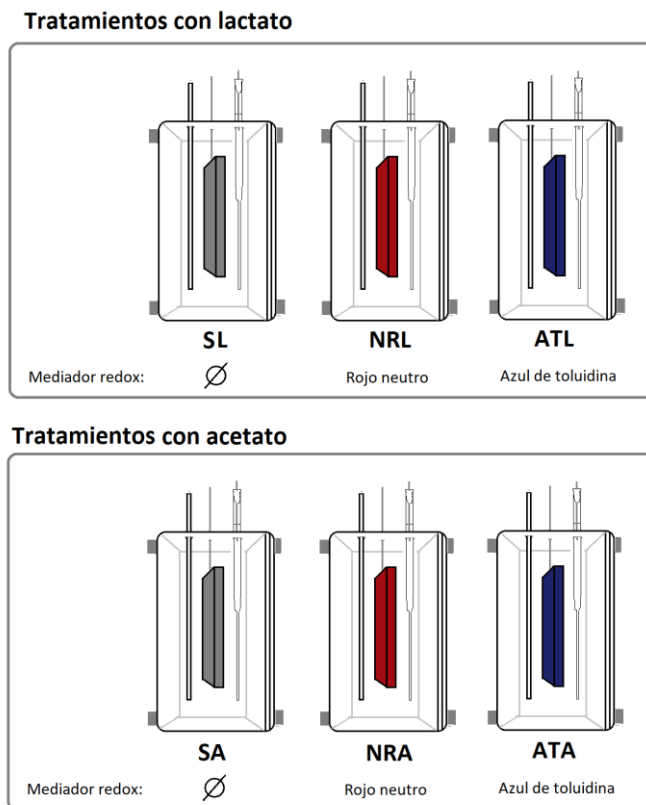


Figura 6. Esquema de los tratamientos realizados con lactato o acetato como sustrato y con filtros de carbono no modificados con mediador redox (SL, SA) y modificados con 2 mediadores redox distintos: rojo neutro (NRL NRA) y azul de toluidina (ATL, ATA).

3.5. Cultivo y cosecha de *Shewanella oneidensis* MR-1

Se utilizó una cepa de *Shewanella oneidensis* MR-1 (Riken BioResource Research Center JCM, Japón) para la evaluación de los sistemas bioelectroquímicos. De acuerdo con el proveedor se rehidrató el pellet con 1mL de caldo nutritivo utilizando una pipeta Pasteur estéril y luego se transfirió la suspensión a una placa TSA (tryptic-soy-agar), y el excedente a tubos con caldo Lura-Bertani (LB). A partir de esta placa se recogió una

colonia y se repicó en tubos con caldo Luria Bertani (LB). Una vez que se detectó turbidez en el tubo con el cultivo se evaluó la densidad óptica (DO) de estas muestras utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm. Una vez que se obtuvo una DO alrededor de 0.5 se transfirió 1mL a un matraz Erlenmeyer con 100mL de caldo LB. Se dejó incubando por 20h este cultivo a 30°C. Luego se distribuyeron los 100mL en dos tubos cónicos para centrifuga de 50mL de capacidad y se centrifugó a 3000rpm por 15-20 minutos. Se lavó el cultivo resuspendiéndolo en buffer fosfato salino y se llevó a centrifugar nuevamente. Este paso se repitió dos veces. Finalmente, se resuspendieron las células y se juntaron en un solo tubo llevándolo a un volumen final de 40mL del mismo medio que se colocó en los reactores (100mM buffer fosfato pH7 y 80mM KCl). Esto sirvió como inóculo concentrado para los reactores.

3.6. *Conteo celular*

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-14} en buffer fosfato salino. Las últimas cuatro diluciones se utilizaron tomando 100 μ L y sembrándolo en placas con agar LB con ayuda de un asa de drigalski. Luego de días de incubación a 30°C se realizó el conteo de las colonias para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (UFC/mL).

3.7. Monitoreo de las celdas electroquímicas por cronoamperometría y voltametría cíclica

Una vez que las celdas electroquímicas estuvieron listas (con medio en un principio) en donde como electrodo de trabajo se utilizó los fieltros de carbono (modificados y no modificados), como electrodo de referencia Ag/AgCl, y como electrodo auxiliar un cable de platino (Pt), se configuraron los parámetros principales. El potencial aplicado fue de 0.1V y se mantuvo constante durante la cronoamperometría. Los parámetros para la evaluación de los fieltros de carbono (electrodo de trabajo) por voltametría cíclica fueron un -0.8 a 0.4V a una velocidad de escaneo de 0.1V/s por 3 ciclos. El monitoreo de estos sistemas fue diario y también se tomaron muestras para estimar la concentración de lactato, acetato y el valor de pH. Luego que se agotó el sustrato, los sistemas se dejaron por un periodo sin adicionar más sustrato para evaluar el stress en el biofilm y su adaptación. Luego de este periodo de stress por falta de sustrato, se adicionó el volumen necesario para obtener 5mM de sustrato en el sistema y se continuó monitoreando de la misma manera.

A partir de los datos obtenidos por cronoamperometría se calculó la eficiencia coulombica de acuerdo a Watson & Logan (2010). La eficiencia coulombica (%) es definida como el total de coulombs calculados integrando la corriente a lo largo de un tiempo (C_{exp}) dividida por la cantidad teórica de coulombs que pueden ser producidos por acetato o por lactato (C_{th}).

$$CE (\%) = C_{\text{exp}}/C_{\text{th}} \times 100$$

En donde el valor teórico está definido por:

$$C_{\text{th}} = FvbiM_i$$

donde F es la constante de Faraday (96 485 C/mol,electrons), bi es el número de electrones producidos por mol de sustrato (acetato=8; lactato=4 para MR-1, y 12 mol e-/mol para cultivos mixtos). “Mi” es la concentración del sustrato (mol/L), y “v” el volumen del líquido en la cámara anódica (L).

3.8. Medición de la concentración de sustrato

Se utilizaron kits enzimáticos para calcular la concentración de lactato y acetato. Para medir la concentración de lactato se utilizó el kit “Lactate Assay Kit-WST” (Dojindo Laboratories, Japan). Al inicio, se preparó una curva de calibración utilizando el standard del kit a una concentración de 10mM, y se realizaron diluciones seriadas para llegar a las siguientes concentraciones: at 1mM, 0.5mM, 0.25mM, 0.125mM, 0.0625mM, 0.0313mM, and 0.0157mM. Las muestras fueron diluidas a 10^{-1} para que el valor esté dentro del rango de la curva de calibración. Finalmente, 80 μ L de la solución de trabajo del kit se mezclaron con 20 μ L de muestra o de los estándares preparados, en microplacas de 96 pozos. Se dejó incubando por 30 minutos a 37°C.

El kit utilizado para estimar la concentración de acetato es EnzyChrom™ Acetate Assay Kit EOAC-100 (BioAssay Systems, USA). La solución estándar del kit a 200mM fue utilizada para preparar la curva de calibración. Se diluyó este estándar a 4mM, 8mM, 12mM, 16mM, and 20mM. Para preparar la solución de trabajo en este kit se tomaron para cada reacción 90µL de buffer de ensayo, 5µL enzima A, 1µL Enzima B, 1µL reactivo colorante, 1µL solución de ATP (todos incluidos en el kit). 90µL de esta solución de trabajo se mezclará con 10µL de muestra en microplacas de 96 pozos y darán lugar a un cambio de color luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

3.9. *Análisis del biofilm basado en el gen 16S rRNA*

El análisis del biofilm se basó en el análisis del gen 16S rRNA, el cual se secuenció por secuenciamiento de siguiente generación (NGS, next generation sequencing). Las muestras se recogieron en 2 momentos distintos del experimento. Las primeras muestras que se tomaron fueron 1.5mL del medio al final de la fase 2, luego del periodo de estrés provocado por falta de sustrato, antes de adicionar nuevamente más sustrato a cada uno de los sistemas. El resto de las muestras se tomaron al finalizar la fase 3, considerando fieltros de carbono (FC) y 45mL del medio (M). Los 45mL del medio se centrifugaron a 3000rpm por 20 minutos y se resuspendieron en solución salina. Los fieltros de carbono fueron divididos en dos tipos: muestras para secuenciamiento (un trozo de fieltro de carbono cortado 0.5x0.5cm) y muestras para cultivo y conteo en placa (fibras de fieltro de

carbono tomadas con pinza de toda la superficie hasta recolectar en un tubo para centrífuga de 1.5mL de capacidad un 10% del peso original del fieltro).

Para el análisis del gen 16S rRNA, al inicio se extrajo el ADN total de las muestras colectadas de fieltro de carbono. Para ello, se utilizó el kit Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 y se siguió el protocolo indicado por el productor. La concentración de ADN obtenida luego de la extracción se midió por el kit PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Estas muestras de ADN se enviaron a los laboratorios de la división de Investigación Ambiental de una empresa localizada en Japón para el análisis por QP-PCR, una aproximación basada en qPCR utilizando sondas TaqMan. El sistema de análisis fue Rotor-Gene Q(QIAGEN) con el software de análisis Rotor Gene Software. Los primers utilizados fueron los mismos reportados por Ritalahti et al. (2006). Como forward primer se utilizó Bac1055YF y reverse fue Bac1392R, y la sonda Bac1115Probe (Ritalahti et al., 2006). Las secuencias fueron analizadas y se utilizó RDP (Ribosomal Database Project) Classifier que clasifica las secuencias del gen 16S rRNA de acuerdo a la taxonomía propuesta por Bergey en “Taxonomic Outline of the Prokaryotes” (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007). Se utilizó a su vez la base de datos “Greengenes” (McDonald et al., 2012) y “Silva living tree” (Yilmaz et al., 2014) para el análisis de homología y Blast a nivel de género.

4. RESULTADOS

4.1. *Modificación por voltametría cíclica*

Se evaluó la modificación con ambos mediadores utilizando una balanza de cristal de cuarzo y los resultados se muestran en la figura 7. La inmovilización del azul de toluidina sobre la superficie del electrodo ocurrió de manera homogénea en cada ciclo (figura 7A) que se demuestra en la caída de la frecuencia (F) con un ΔF final de 72.89Hz (Figura 7C). En el caso de la inmovilización de rojo neutro, la frecuencia disminuye hasta la culminación del primer ciclo y empieza a aumentar en el segundo ciclo (figura 7D). Este aumento en la frecuencia denota una desorción de las moléculas de la superficie del electrodo que se detiene hacia el final del ciclo 3. Nuevamente se ve que en el ciclo 4 y 5 la frecuencia disminuye dando un ΔF final de 51.28Hz. De acuerdo con la ecuación de Sauerbrey se calculó que se depositó 192nmol de rojo neutro y 257.7nmol de azul de toluidina.

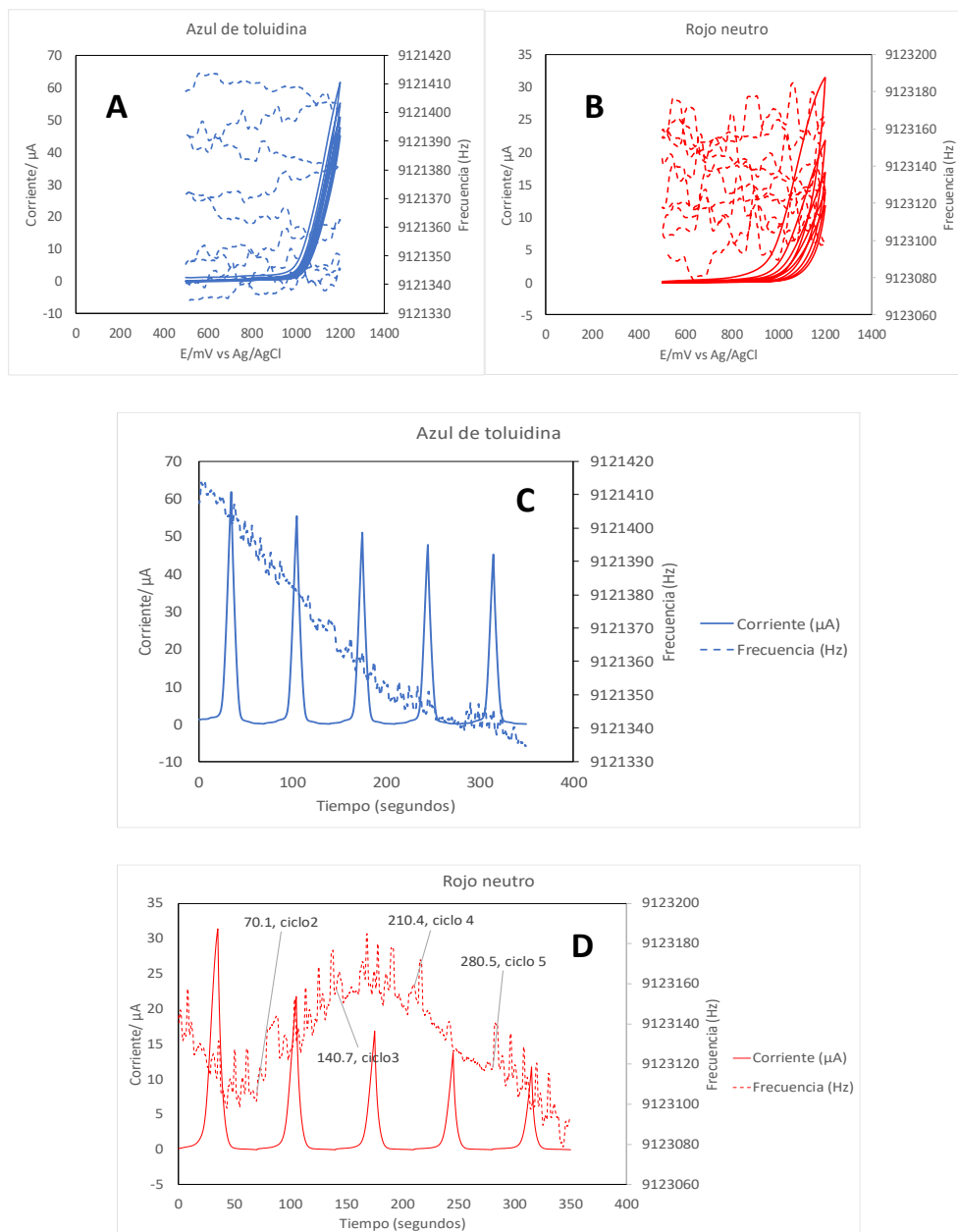


Figura 7. Voltamogramas de la modificación con azul de toluidina (A) y rojo neutro (B) utilizando una placa de cristal de cuarzo recubierta con carbono como electrodo (sección 3.3). Frecuencia (Hz) vs. tiempo (segundos) como eje secundario durante la modificación con azul de toluidina (C) y rojo neutro (D).

En la modificación sobre la superficie del fieltro de carbono las corrientes de oxidación fueron más altas en la modificación con rojo neutro. En el caso de la modificación con azul de toluidina también se observaron corrientes de oxidación, pero con valores más bajos (Figura 8). La diferencia con respecto al voltamograma mostrado en la figura 7 se debe a la configuración de los electrodos. La superficie del fieltro de carbono no es homogénea, el grosor de éste es de aproximadamente 1cm y no necesariamente los mediadores redox van a reaccionar en cada fibra ya que también depende del contacto con el cable de titanio que atraviesa el fieltro.

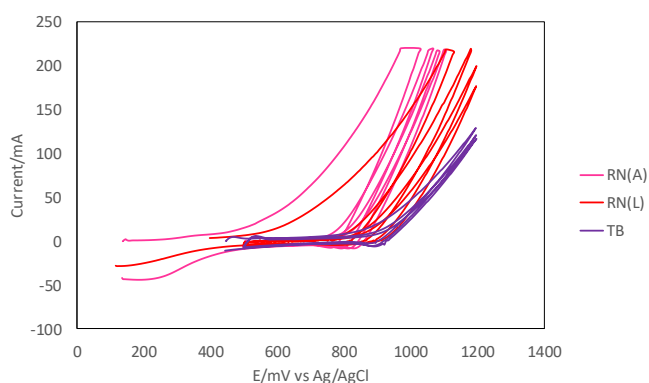


Figura 8. Voltamograma durante la modificación electroquímica con rojo neutro NR(A) o NR(L), y azul de toluidina en el fieltro de carbono.

Luego de la modificación se evaluaron los fieltros de carbono modificados en buffer fosfato (pH7) y se pudo identificar picos de corriente característicos del mediador utilizado. La modificación con rojo neutro mostró picos a potenciales

cercanos a -400mV y -600mV, mientras que en el caso de la modificación con azul de toluidina fue de alrededor de 35mV y -200mV.

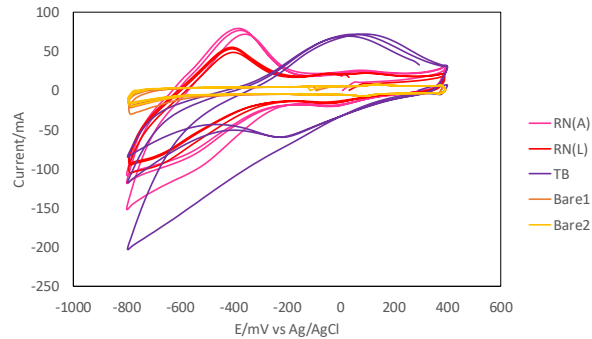


Figura 9. Voltamogramas luego de la modificación de la superficie del fieltro de carbono. TB corresponde al electrodo modificado con azul de toluidina, RNA y RNL con rojo neutro, y Bare1 y Bare 2 sin modificación.

4.2. *Cronoamperometría y eficiencia Coulúmbica*

En la figura 10 se muestra la primera fase en la que la corriente aumenta inmediatamente después que se adiciona el sustrato, evidenciando la oxidación de éste. Los tratamientos con lactato generaron corrientes de oxidación más altas y por un tiempo más prolongado que los tratamientos con acetato. Dentro de los tratamientos con lactato, el tratamiento ATL fue el que tuvo el pico de oxidación más alto al día 23 (0.1527mA) y disminuyó al día 28 (0.0223mA). El tratamiento RNL tuvo un pico de oxidación al día 17 (0.07437mA) y disminuyó antes que el tratamiento ATL. En cambio, el tratamiento SL tuvo las corrientes más bajas entre los tratamientos con lactato, pero no se dio una caída en la corriente como en los otros tratamientos llegando al día 30 a 0.05059mA.

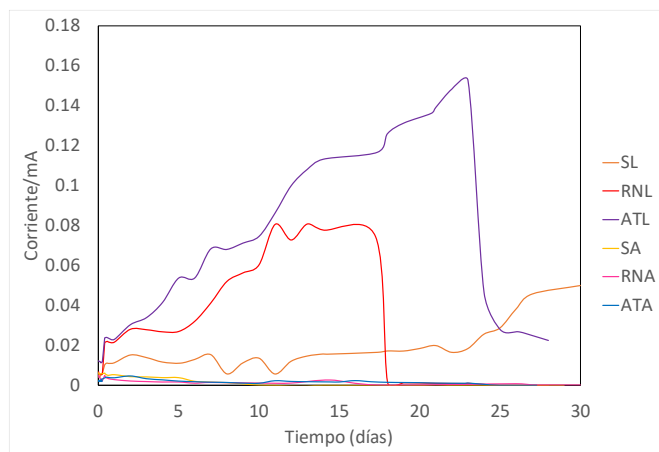


Figura 10. Corriente durante la primera fase, en miliamperios, producida en los tratamientos con lactato (SL, RNL, ATL) y acetato (SA, RNA, ATA) en donde las reacciones de oxidación se producen en los electrodos no modificados (SL, SA) y modificados con rojo neutro (RNL y RNA), y azul de toluidina (ATL, ATA).

En la figura 11 se muestra el aumento de la corriente luego que se adicionó el sustrato para iniciar la tercera fase de "recuperación del sistema". En esta fase los tratamientos con lactato mostraron las corrientes con los valores más altos, especialmente el tratamiento ATL que mostró un pico de oxidación de 0.01498mA al día 74. Los tratamientos SL y RNL alcanzaron valores alrededor de 0.00316mA al día 74, disminuyendo antes que el tratamiento ATL, el cual al día 76 tuvo una caída abrupta en la corriente. Luego de esa caída abrupta, todos los tratamientos disminuyeron sus corrientes hasta llegar alrededor de 0mA al día 84-86.

En cambio, los tratamientos con acetato no lograron generar corrientes de oxidación tan altas como los tratamientos con lactato y el tiempo fue más corto. Para el día 65 el tratamiento ATA tuvo una corriente de oxidación máxima de $0.63\mu\text{A}$ y continuó disminuyendo hasta el día 66. Por otro lado, los tratamientos SA y RNA tuvieron picos de oxidación al día 67 ($1.037\mu\text{A}$ y $0.969\mu\text{A}$, respectivamente) y la corriente disminuyó al día 68.

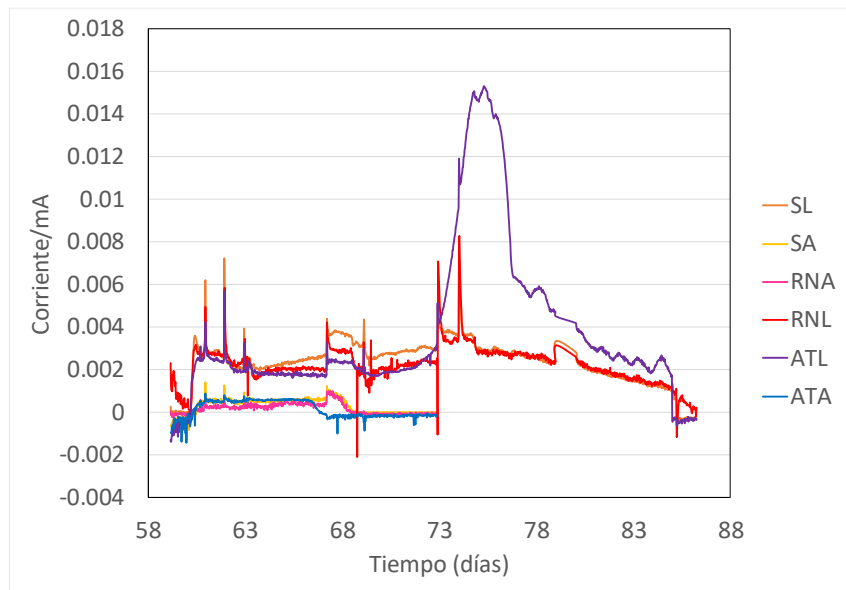


Figura 11. Corriente durante la tercera fase, en miliamperios.

La eficiencia coulúmbica en la fase 1 y fase 3 se muestra en la figura 12. Se puede ver que el tratamiento ATL tuvo una eficiencia total de 102.7%, la más alta de los tratamientos con lactato. El fieltro de carbono sin modificación alguna obtuvo la menor eficiencia coulúmbica, pero en la fase 3 todos los tratamientos disminuyeron.

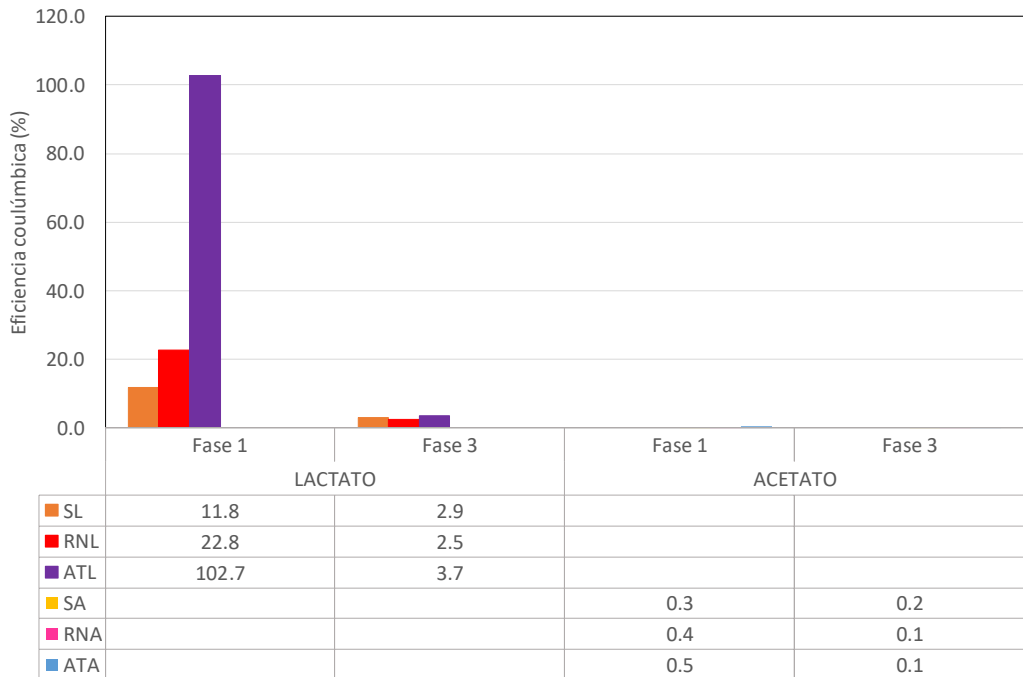


Figura 12. Eficiencia coulúmbica en porcentaje (%)

4.3. Consumo de lactato y acetato

La figura 13A y 13B muestran la concentración de los sustratos en el medio (líneas enteras) a lo largo del tiempo en la fase 1 y 3, respectivamente. El lactato en los tratamientos SL RNL y ATL llegó a consumirse totalmente alrededor del día 22 y acumuló concentraciones de acetato de más de 20mM. En cambio, en los tratamientos en donde se adicionó acetato, la concentración de este sustrato se mantuvo alta al día 22, alrededor de 7mM en los tres tratamientos (SA, RNA, ATA). Estos resultados tienen coherencia con las curvas de corriente ya mostradas (figura 10 y 12, líneas punteadas) en donde las corrientes de oxidación fueron mayores en los tratamientos con lactato que los tratamientos con acetato, demostrando una mayor oxidación de lactato. No obstante, el

consumo de lactato en el tratamiento SL fue muy similar al tratamiento ATL, sin haber presentado valores de corriente tan altos como ATL.

El mismo comportamiento se ve en la figura 13B, en donde los tratamientos con lactato consumen el sustrato totalmente al día 87 y coincide con la caída en la corriente. Sin embargo, este consumo fue más lento que en la primera fase. Adicionalmente al consumo de lactato, se pudo ver un consumo de acetato, el cual no se detectó en los tratamientos SL, RNA y ATL ya que al final del día 22 todos estos tratamientos acumularon concentraciones mayores a 20mM de acetato, que no necesariamente fueron consumidos durante la segunda fase del experimento.

Cabe resaltar que en la primera fase del experimento (figura 13A) no se pudo obtener en muchos casos mediciones por duplicado debido a un error en la conservación de la muestra. En la fase 3 de “recuperación del sistema” (figura 13B) este problema no se repitió.

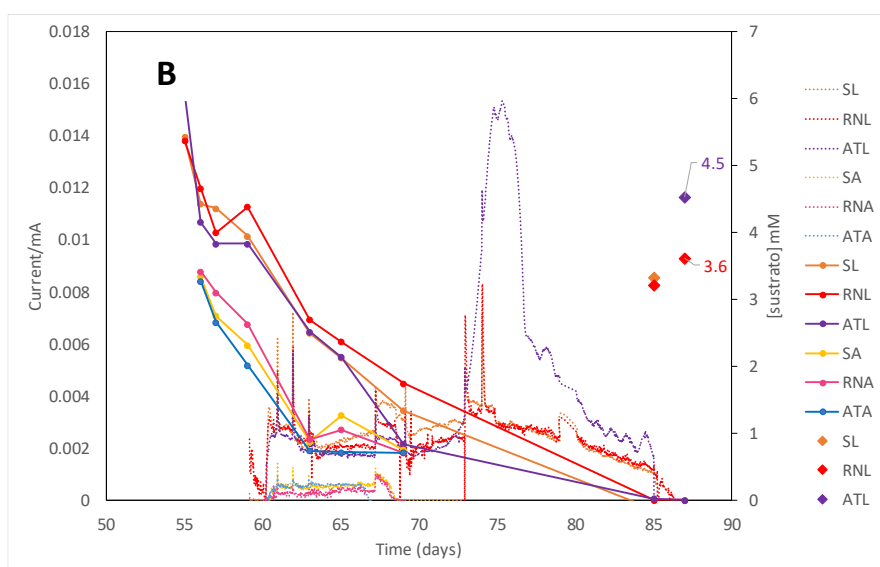
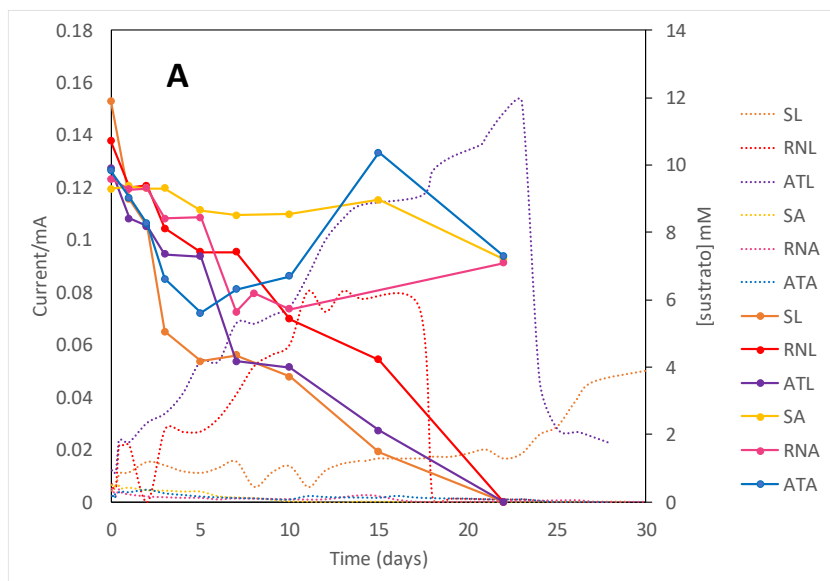


Figura 13. Concentración de acetato (SA, RNA, ATA) y lactato (SL, RNL, ATL) en las muestras colectadas del medio de cada tratamiento durante la fase 1 (figura 13A) y fase 3 “recuperación del sistema” (Figura 13B). Las líneas punteadas representan la corriente ya mostrada en la figura 10 y 11. La figura 13B muestra adicionalmente la concentración de acetato remanente en los tratamientos SL (◆),

RNL (◆) y ATL (◆). Solo se incluyeron las concentraciones menores y cercanas a 20mM de acetato.

4.4. Estabilidad de la modificación por voltametría cíclica

En la figura 14 se muestran los voltamogramas tomados en los días en los que se vieron cambios en las corrientes de la figura 10 y se pueden ver los cambios que los electrodos demostraron a lo largo de la duración de los tratamientos. Las curvas con los tonos más claros son aquellas tomadas más cerca al inicio de los tratamientos, y los tonos más oscuros los más cercanos al final del experimento. La corriente en todos los casos disminuyó a lo largo del experimento. En cuanto a la forma de las curvas, en ninguno de los casos se detectaron picos de oxidación o reducción a la velocidad de escaneo que se aplicó (100mV/sec).

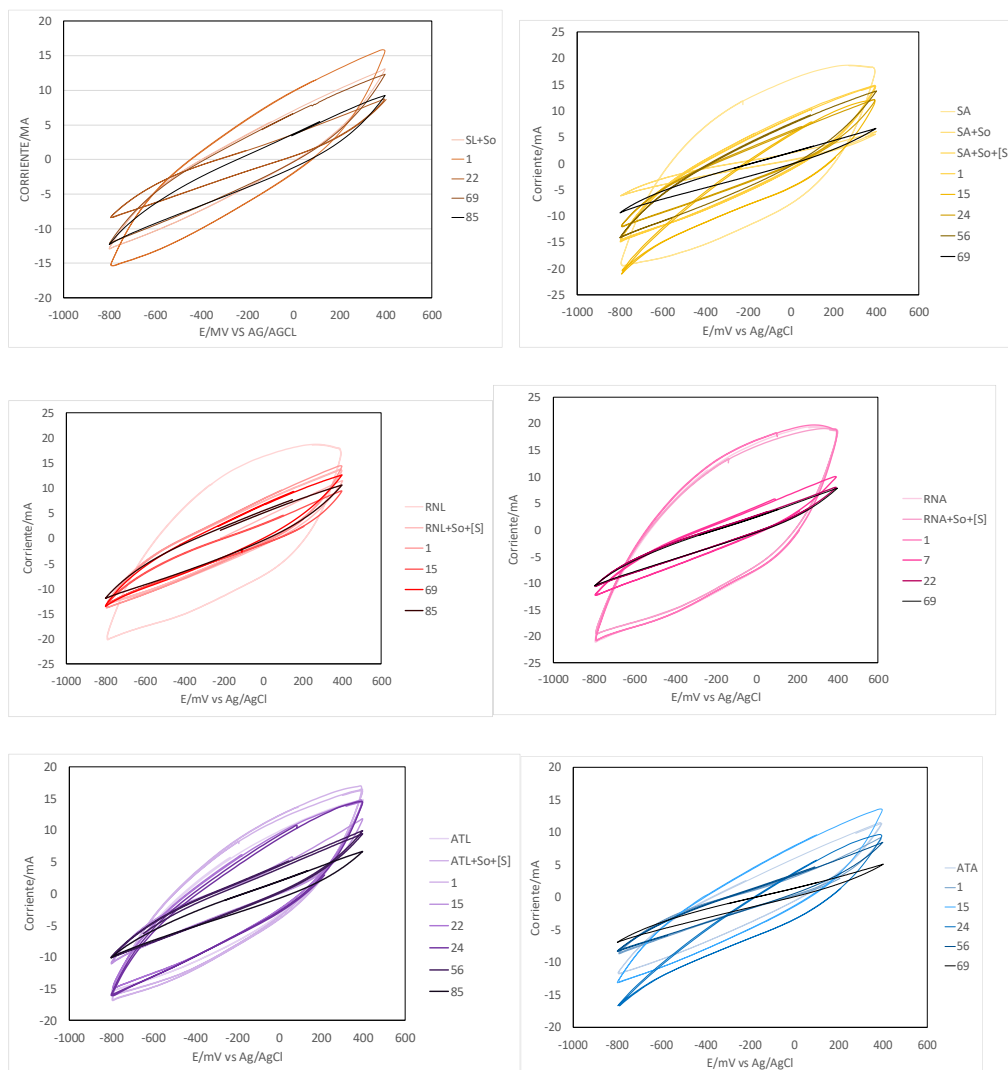


Figura 14. Voltamogramas de los tratamientos realizados a lo largo del tiempo.

Solo se muestran las curvas en donde se detectó un cambio en su corriente. La última medición en los tratamientos con acetato ocurrió el día 69, mientras que en los tratamientos con lactato se realizó el día 89.

4.5. Estructura del biofilm

Para este análisis se consideraron dos tipos de muestra: fibras de los filtros de carbono y medio (solución) de los reactores. Los microorganismos presentes en todas las muestras analizadas pertenecen al phylum Proteobacteria (>97%

de reads en cada tratamiento), con una baja representación del phylum Actinobacteria (<3% de reads), Bacteroidetes (< 1%), entre otros. En la figura 16 y 17 se muestran los resultados del secuenciamiento del gen 16S rRNA a nivel de familia y de género, respectivamente.



Figura 15. Resultados del secuenciamiento del gen 16S rRNA. Dentro de todos los tratamientos se incluyen los resultados del análisis de muestras de medio (M) o filtros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3.

El análisis a nivel de género con la base de datos “Silva Living Tree” o “Silva” permitió identificar 80 OTUs distintos. En todos los tratamientos se ve la presencia de *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Variovorax*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus*, y *Delftia* (figura 16). Las especies de *Pseudomonas* identificadas fueron *Pseudomonas*

veronii, *Pseudomonas geniculata*, y *Pseudomonas hibiscicola*. En el caso de *Shewanella*, se identificó *Shewanella oneidensis* y su porcentaje es mayor en las muestras de fieltro de carbono (3.FC), pero no llega a ser el microorganismo predominante en ningún caso, contrario a lo que se esperaba, especialmente en los tratamientos con lactato.

El género *Variovorax* tiene mayor presencia en los tratamientos alimentados con lactato.

El género *Cupriavidus* estuvo representado principalmente por la especie *Cupriavidus basilensis*.

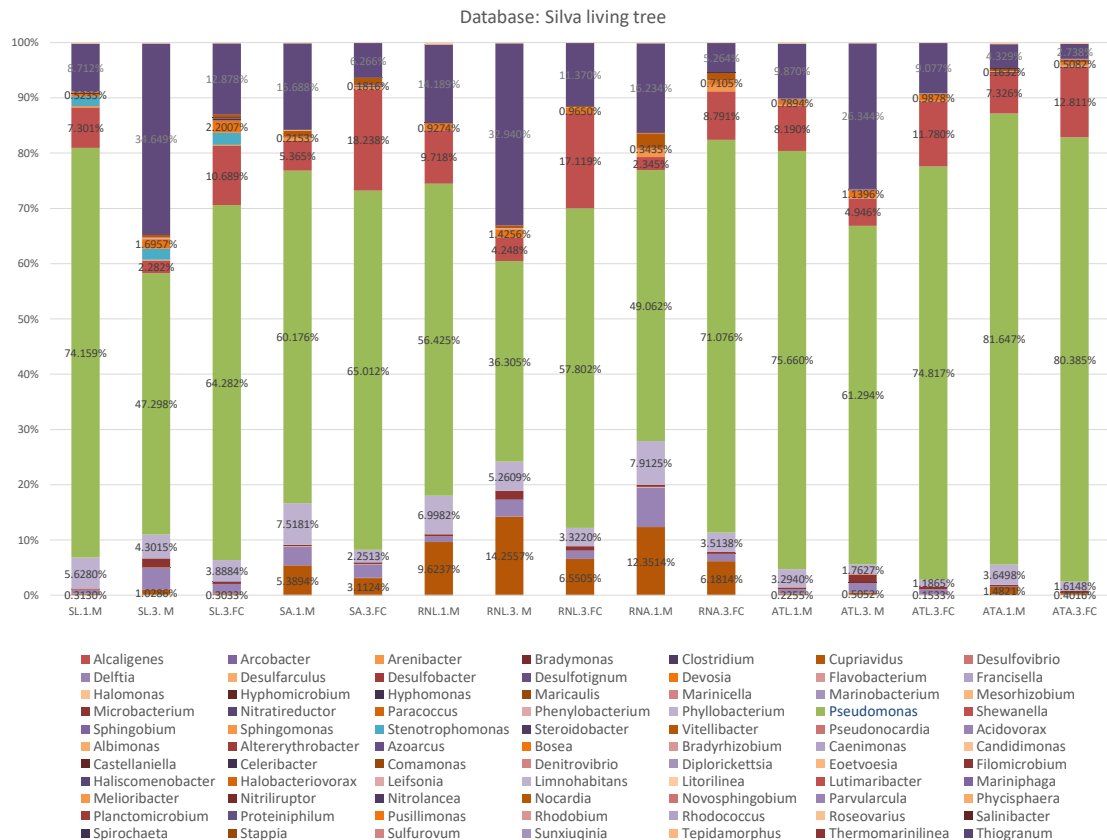


Figura 16. Resultados del análisis del gen 16S rRNA a nivel de familia utilizando la base de datos “SILVA”. Dentro de todos los tratamientos se incluyen los

resultados del análisis de muestras de medio (M) o fieltros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3.

En las tablas 2 al 4 se detallan los géneros que estuvieron presentes exclusivamente en los fieltros de carbono modificados con azul de toluidina (tabla 2), rojo neutro (tabla 3), o sin modificación (tabla 4). Los fieltros modificados no presentaron la misma cantidad de géneros que los fieltros de carbono no modificados.

Tabla 2. Géneros identificados solo en los tratamientos con los fieltros de carbono modificados con azul de toluidina y el porcentaje que cada OTU representó dentro del biofilm de cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	%OTU
Solo en ATL	Rhodococcus	Rhodococcus cercidiphylli	ATL.3. CF	0.0284%
	Nitrolancea	Nitrolancea hollandica	ATL.3. CF	0.0057%
Solo en ATA	Desulfotignum	Desulfotignum toluenicum	ATA.3.FC	0.0082%
	Sulfurovum	Sulfurovum lithotrophicum	ATA.3.FC	0.0082%
	Pseudonocardia	Pseudonocardia ammonioxydans	ATA.3.FC	0.0082%

Tabla 3. Géneros identificados solo en los tratamientos con los filtros de carbono modificados con rojo neutro y el porcentaje que cada OTU representó en cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	%OTU
Solo en RNL	Eoetvoesia	Eoetvoesia caeni	RNL.3.FC	0.0058%
	Sphingobium	Sphingobium jiangsuense	RNL3.FC	0.0058%
Solo en RNA	Desulfobacter	Desulfobacter vibrioformis	RNA.3.FC	0.0065%
	Spirochaeta	Spirochaeta smaragdinae	RNA.3.FC	0.0065%

Tabla 4. Géneros identificados solo en los tratamientos con los filtros de carbono no modificados y el porcentaje que cada OTU representó en cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	%OTU
Solo en SL	Desulfarculus	Desulfarculus baarsii	SL.3.FC	0.0055%
	Halomonas	Halomonas shengliensis	SL.3.FC	0.0055%
	Nitratireductor	Nitratireductor aquimarinus	SL.3.FC	0.0110%
	Xenophilus	Xenophilus aerolatus	SL.3.FC	0.0055%
	Stappia		SL.3.FC	0.0331%
	Nitriliruptor	Nitriliruptor alkaliphilus	SL.3.FC	0.0055%
Solo en SA	Arenibacter	Arenibacter troitsensis	SA.3.FC	0.0052%
	Sunxiuqinia	Sunxiuqinia elliptica	SA.3.FC	0.0052%
	Stappia		SA.3.FC	0.0052%
	Mariniphaga	Mariniphaga anaerophila	SA.3.FC	0.0052%
	Azoarcus		SA.3.FC	0.0052%
Ambos	Alcaligenes		SA.3.FC	0.0104%
	Stappia	Stappia taiwanensis	SA.3.FC	0.0052%
	Alcaligenes		SL.3.FC	0.0386%
	Stappia	Stappia taiwanensis	SL.3.FC	0.0331%

5. DISCUSIÓN

5.1. *Modificación por voltametría cíclica y su estabilidad*

Durante la modificación de la superficie de los electrodos (figura 7A, 7B y 8) se obtuvieron picos de oxidación más altos alrededor de potenciales de 1000mV (figura 7 y 8). Sin embargo, estas corrientes pueden estar muy probablemente relacionadas a la oxidación del agua para formar gas oxígeno ya que sucedieron a potenciales muy cercanos a esta reacción (1.23 vs. SHE= -1.033V Ag/AgCl) (López Zavala et al., 2019). Esta reacción podría afectar a la inmovilización del mediador redox en la superficie del electrodo, como se vio especialmente en el caso del rojo neutro (figura 6D), que tuvo ciclos de desorción que generó al final que solo 192nmoles fueran inmovilizados en el electrodo del QCM, alrededor de 65nmoles menos que en el caso de la modificación con azul de toluidina. Por otro lado, la caracterización luego de la modificación mostró corrientes con valores negativos alrededor de -800mV dentro de los voltamogramas de la figura 9. Estas corrientes podrían estar relacionadas a la reducción del agua y a la generación de gas hidrógeno (0 vs. SHE= -0.197V Ag/AgCl).

No se detectaron los picos de oxidación de la figura 9 en la figura 14 ya que las condiciones de las mediciones fueron distintas en ambos casos. Las mediciones de la figura 14 se realizaron en presencia de *Shewanella* y del sustrato, en donde la oxidación de este último genera corrientes más altas. Hay muchos factores a tomar en cuenta al tratar de explicar las diferencias de los voltamogramas obtenidos con respecto a otros estudios, como el tipo de material del electrodo,

la velocidad de escaneo aplicado, el tipo de sustrato y la conductividad de la solución en el ánodo (López Zavala et al., 2019). En el estudio de Carmona et al. (2011) tampoco fue posible interpretar los resultados de la voltametría cíclica con facilidad. En tal estudio aplicaron una velocidad de escaneo de 1mVs^{-1} utilizando colonias de *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type y mutadas, en presencia y ausencia de sustrato. En presencia de sustrato el incremento en la densidad de corriente ocurrió en menos de un orden de magnitud. Este resultado fue interpretado como una baja actividad bioelectrocatalítica de *S. oneidensis*. Sin embargo, explican que la alta corriente de fondo en los resultados fue consecuencia de la matriz de exo-polisacáridos y de restos microbianos aún activos (Carmona-Martinez et al., 2011). Esto también podría explicar en parte los resultados obtenidos ya que se obtuvo una capacitancia alta al inicio (día 1) y la corriente de fondo posiblemente no permitió reconocer los picos esperados. La alta capacitancia inicial podría ser explicada por la alta concentración de iones, como H^+ , en la superficie del electrodo (López Zavala et al., 2019) que luego fue disminuyendo con el tiempo por la formación del biofilm sobre los filtros de carbono. López et al. (2019) por el contrario, utilizaron la voltametría cíclica para explicar el comportamiento de una celda microbiana de cámara alimentada con agua residual. Los voltamogramas fueron muy similares a este estudio, y aplicaron velocidades de escaneo de 25mVs^{-1} y 50mVs^{-1} ya que velocidades menores a las mencionadas ocasionaría ruidos en las mediciones y también el sistema podría cambiar tanto que sería difícil analizar las reacciones que ocurren (López Zavala et al., 2019). El estudio de Fricke et al., (2008), por el contrario,

muestra voltamogramas con picos de oxidación bien definidos que representan cuatro sistemas redox en *Geobacter sulfurreducens*. Esto lo consigue con velocidades de escaneo de 1mVs^{-1} (Fricke et al., 2008).

5.2. Evaluación de los sistemas

Los tratamientos con lactato tuvieron una mejor generación de corriente que los tratamientos con acetato, como se esperaba, ya que *Shewanella oneidensis* MR-1 es capaz de metabolizar lactato (Pinchuk et al., 2011; Tang et al., 2007), y fue el microorganismo predominante al inicio. A pesar que la oxidación de acetato a CO_2 libera 8 electrones, 2 electrones más versus a la oxidación de lactato a acetato que libera 4 electrones (Watson & Logan, 2010), en los tratamientos con acetato la corriente fue muy baja, evidenciando que el acetato no se estaba oxidando completamente. Estos resultados son coherentes con los resultados de la concentración de acetato al final de la fase 1 y 3.

La oxidación completa de lactato a CO_2 , sin acumulación de acetato, se puede obtener en cultivos mixtos (Watson & Logan, 2010) en donde el acetato producido por *Shewanella* es consumido por otro(s) microorganismo(s). En los resultados del presente estudio, a pesar de la presencia de otros microorganismos ambientales junto con *Shewanella*, se evidenció la acumulación de acetato al final de la fase 1. Al final de la fase 3 se ve una acumulación de acetato, pero las concentraciones no son tan altas como al final de la fase 1. Esto puede explicarse en parte a la menor concentración de lactato añadido a los reactores en la fase 3. Además, la fase 2 sirvió como una fase de adaptación del biofilm para consumir el acetato acumulado, y se perdió un poco

la capacidad de oxidar lactato, por ello en la fase 3 se consiguió consumir casi la mitad de la concentración inicial de la fase 1 en 10 días más (comparar figura 13 y figura 14).

A pesar de esta diferencia, en la figura 16, se puede ver que en los tratamientos donde no se adicionó lactato, sino solo acetato (SA, RNA, ATA), *Shewanella* fue capaz de permanecer en la superficie de los fieltros de carbono al igual que en los tratamientos SL, RNL y ATL. Esto quiere decir, que *Shewanella* desde el principio pudo establecerse sobre la superficie y permanecer en los tratamientos alimentados con acetato.

La modificación de la superficie del electrodo tuvo un efecto positivo, incrementando la corriente y eficiencia coulúmbica en los tratamientos con lactato en la fase 1. Este incremento a lo largo de los días es consecuencia de la formación de un biofilm electroactivo (Dulon, Parot, Delia, & Bergel, 2007) y que no necesariamente denota la actividad de todos los microorganismos componiendo el biofilm, sino solo de los que pueden transferir electrones hacia el electrodo. La modificación con azul de toluidina dio los mejores resultados, posiblemente por una mejor reversibilidad de éste. En la figura 9 la curva morada "TB" posee un pico de oxidación y reducción que demuestra esta reversibilidad.

En la fase 3 no se lograron eficiencias coulúmbicas tan altas en ninguno de los fieltros de carbono modificados o no. No se puede determinar si los mediadores redox aún se encontraban inmovilizados al final de la fase 3 ya que no se pudieron evaluar los picos en los voltamogramas de la figura 14.

5.3. Estructura del biofilm

Cuando se realizó el análisis a nivel de familia y género, se utilizaron dos bases de datos, “Greengenes” y “Silva living tree” (o “Silva”). Al utilizar “Greengenes” se pudo identificar 53 géneros distintos, mientras que con “Silva” se identificaron 80 géneros distintos. Esta diferencia se puede explicar a que cada base de datos cuenta con un número distinto de secuencias. Al 2018, Park & Won (2018) reporta que “Greengenes” contiene alrededor de 99,000 secuencias y que no ha sido actualizada desde el 2013. En el caso de Silva, la actualización de la base de datos es constante, y para 2018 contaba con 190,000 secuencias. En su estudio comparativo Park & Mon (2018) determinaron que, si bien “Greengenes” predecía un menor número de géneros que el real, “Silva” por su parte daba más falsos negativos. Sin embargo, Silva está en constante actualización y revisión, por lo que fue considerado para el análisis de los datos en esta investigación. Un criterio adicional fue la precisión en la identificación de *Shewanella oneidensis*. Mientras que en el análisis a nivel de especie bajo “Silva” se logró identificar *Shewanella oneidensis*. En cambio, con “Greengenes” solo se logró identificar a nivel de género *Shewanella*.

Una de las diferencias más resaltantes entre los tratamientos fue el mayor porcentaje de *Cupriavidus basilensis* en los tratamientos que tenían los electrodos modificados con rojo neutro. Esta especie ha sido utilizada en celdas de combustible microbiano dando buenos resultados al utilizar acetato y fenol como sustratos (Friman, Schechter, Ioffe, Nitzan, & Cahan, 2013). Fue más

abundante en las muestras de medio líquido, posiblemente por su característica de aerobio (Friman et al., 2013).

Por otro lado, *Stenotrophomonas* estuvo en mayor porcentaje en el tratamiento SL. Un estudio genómico comparativo entre especies del género *Stenotrophomonas* (Xanthomonadaceae) encontró miembros con genes relacionados al sistema *rpf*/DSF para quorum sensing, a la biosíntesis de polisacáridos y lipopolisacáridos involucrados en la formación de biofilms y de cápsula, y bloques de genes codificantes para flagelo y algunos para fimbriae (Alavi et al., 2014). A pesar que todas estas características le permitirían desarrollarse en un biofilm, solo en el tratamiento SL pudo desarrollarse mejor. Fueron muy pocos los géneros identificados como exclusivos de los biofilms en los fieltros de carbono modificados (tablas 2-4). En el caso de los tratamientos con azul de toluidina, el número de géneros “exclusivos” incrementa si se consideran las muestras del medio líquido, sin embargo, en el biofilm el número disminuye considerablemente (ver anexo 6). Cabe la posibilidad que el medio líquido de los tratamientos ATL y ATA hayan contenido también cierta concentración de azul de toluidina, producto de la desorción del mediador redox y que esto haya contribuido a las corrientes altas registradas.

La presencia de *Shewanella* no sigue una tendencia en especial entre los tratamientos. A pesar de que se ha reportado que *Shewanella oneidensis* MR-1 no es capaz de utilizar acetato como sustrato y fuente de energía, se puede ver que en los tratamientos que se iniciaron solo con acetato como único sustrato,

Shewanella permaneció en el biofilm. Esto podría deberse en principio a la capacidad de Shewanella para formar biofilms, la capacidad protectora de toda la matriz del biofilm, y la interacción con otras especies.

Shewanella ha sido descrita como un colonizador primario, junto con Pseudomonas y Acinetobacter debido a sus valores altos en adherencia y efectividad en colonizar superficies (Liébana et al., 2016). Incluso en condiciones dinámicas, Shewanella sp. IV3014 fue capaz de formar biofilms gruesos, con fibras horizontales características (Doghri et al., 2015). Esto sucede en parte por su habilidad de producir moléculas involucradas en procesos de Quorum sensing, como N-Acyl-L-homoserin lactona (AHLs), la cual es producida por muchas otras bacterias gram-negativas (Liébana et al., 2016). En el caso de Pseudomonas, también posee sistemas de quorum sensing basados en Acyl-homoserin lactona (AHL) (Masák, Alena, Schreiberová, & Rezanka, 2014), lo que podría explicar el alto porcentaje de Pseudomonas en un sistema inoculado con Shewanella.

Se debe tomar en cuenta que las comparaciones entre el porcentaje de Pseudomonas y Shewanella dentro de una misma muestra no necesariamente reflejan la abundancia de cada género ya que los resultados no están normalizados con el número de copias del gen 16S rRNA por genoma en un género o especie. Dependiendo de la especie y grupos filogenéticos en un mismo género, el número de copias del gen 16S rRNA puede ser variable, como se vio en el estudio de Bodilis, Nsigue-Meilo, Besaury, & Quillet, (2012). Incluso se vio que las regiones hipervariables V1 y V3 en Pseudomonas están

más propensas a transferencias laterales, lo que ocasionaría también un sesgo en la estimación de la abundancia relativa. En todo caso, para este trabajo solo se tomaron en cuenta las comparaciones entre tratamientos, pero tomando en cuenta el mismo género, y no comparaciones entre géneros dentro de un mismo tratamiento.

Otra posible razón por la que *Shewanella* permaneció en todos los biofilms es el potencial de 0.1V aplicado al fieltro de carbono. Se ha reportado un incremento en la motilidad de microorganismos electrogénicos cuando se aplican ciertos potenciales a los electrodos. Este incremento en la velocidad y en las distancias de “nado” se denomina “electrokinesis”, ya que es exclusivo de microorganismos que tienen la capacidad de transferir electrones hacia óxidos de metal en estado sólido (Harris et al., 2010). Posiblemente todas estas características de *Shewanella* le permitieron permanecer dentro de los biofilms y no en el medio (figura 16, barras 1.M y 3M en cada tratamiento).

El valor de este trabajo radica en ser uno de los pocos que se concentra en el efecto del uso de mediadores redox sobre la composición final del biofilm en una celda electroquímica. Se pudo comprobar que, a largo plazo, el uso de mediadores redox en los electrodos producen ciertas diferencias en la composición del biofilm y que depende del mediador redox, como también del sustrato utilizado. Especialmente, hubo varios géneros que se encontraron exclusivamente en ciertos electrodos modificados.

Adicionalmente, sirve como un sustento más al uso de mediadores redox para la mejora del funcionamiento de las celdas de combustible microbianas.

Shewanella no fue el género predominante en el medio, ni en el biofilm, no obstante, hubo una respuesta diferenciada en los tratamientos que contaban con los electrodos modificados con mediadores redox, y que fueron alimentados con lactato.

Este tipo de estudio puede servir a futuro para un mejor manejo del desarrollo de biofilms por adición de mediadores redox, e incluso, recolectando más datos de las variables, poder dirigir el crecimiento de ciertos microorganismos y así construir biofilms más eficientes.

6. CONCLUSIONES

- Los parámetros aplicados para la modificación electroquímica de los fieltros de carbono permiten inmovilizar el rojo neutro y el azul de toluidina sobre fieltros de carbono.
- La modificación de los fieltros de carbono con mediadores redox permitió la generación de corrientes más altas que los fieltros de carbono sin modificación. La modificación con azul de toluidina, bajo los parámetros considerados en este trabajo, generó las corrientes más altas seguido por la modificación con rojo neutro.
- En los tratamientos SL, RNL, ATL se consumió el lactato totalmente alrededor del día 22. En cambio, los tratamientos con acetato no llegaron a consumirse por completo al mismo día. Igual ocurrió en la tercera fase del experimento, en la cual el consumo del lactato fue total.
- La estabilidad de los electrodos no fue fácil de determinar ya que no se lograron detectar los picos característicos de los mediadores redox inmovilizados en los fieltros de carbono.
- El análisis basado en el gen 16S rRNA mostró que los biofilms no estuvieron dominados por *Shewanella oneidensis* en ninguno de los tratamientos, sin embargo, fue detectado incluso en los tratamientos con acetato, a pesar de ser el sustrato no específico para esta especie. Géneros como *Pseudomona*, *Variovorax*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus*, y *Delftia* estuvieron presentes en todos los tratamientos, pero solo *Cupriavidus* estuvo en porcentajes particularmente más altos en los tratamientos con rojo neutro. Hubo diferencias entre los tratamientos, pero los electrodos

modificados presentaron menor número de OTUs “exclusivos”, es decir, que no se repitieron en otros tratamientos.

6.1. Recomendaciones

- Se recomienda en un futuro evaluar el rol de los microorganismos ambientales.
- Se recomienda hacer un análisis durante los picos de corriente.
- Para las mediciones bajo voltametría cíclica se recomienda aplicar distintas velocidades de escaneo para permitir la elucidación de los picos representativos a los mediadores redox utilizados.

6.2. Limitaciones

Los resultados de esta investigación solo aplican a las condiciones específicas del sistema.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria, 1–15.
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D. P. B. T. B., Sarma, P. M., & Pant, D. (2016). An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renewable Energy*, 98, 153–170.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., & Quillet, L. (2012). Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS ONE*, 7(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035647>
- Carmona-Martinez, A. A., Harnisch, F., Fitzgerald, L. A., Biffinger, J. C., Ringeisen, B. R., & Schröder, U. (2011). Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry*, 81(2), 74–80.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.02.006>
- Doghri, I., Rodrigues, S., Bazire, A., Dufour, A., Akbar, D., Sopena, V., ... Lanneluc, I. (2015). Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D

architectures. *BMC Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0568-4>

Dulon, S., Parot, S., Delia, M., & Bergel, A. (2007). Electroactive biofilms : new means for electrochemistry. *Journal of Applied Electrochemistry* (2007), 37, 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10800-006-9250-8>

Edwards, M. J., White, G. F., Norman, M., Tome-fernandez, A., Ainsworth, E., Shi, L., ... Clarke, T. A. (2015). Redox Linked Flavin Sites in Extracellular Decaheme Proteins Involved in Microbe-Mineral Electron Transfer . *Nature Publishing Group*, (December 2014), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11677>

Fan, L., & Xue, S. (2016). Overview on Electricigens for Microbial Fuel Cell, 398–406. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010398>

Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., ... Tiedje, J. M. (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>

Fricke, K., Harnisch, F., & Schröder, U. (2008). On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*, 1(May 2014), 144–147. <https://doi.org/10.1039/B802363H>

Friman, H., Schechter, A., Ioffe, Y., Nitzan, Y., & Cahan, R. (2013). Current production in a microbial fuel cell using a pure culture of *Cupriavidus*

- basilensis growing in acetate or phenol as a carbon source. *Microbial Biotechnology*, 6(4), 425–434. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12026>
- Goswami, R., & Mishra, V. K. (2018). A review of design, operational conditions and applications of microbial fuel cells. *Biofuels*, 9(2), 203–220. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1302682>
- Guo, K., Chen, X., Freguia, S., & Donose, B. C. (2013). Spontaneous modification of carbon surface with neutral red from its diazonium salts for bioelectrochemical systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.051>
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P. G., Chen, X., Donose, B. C., Keller, J., ... Rabaey, K. (2013). Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- Guo, K., PrévotEAU, A., Patil, S. A., & Rabaey, K. (2015). Engineering electrodes for microbial electrocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.014>
- Harris, H. W., El-naggar, M. Y., Bretschger, O., Ward, M. J., Romine, M. F., Obraztsova, A. Y., & Nealson, K. H. (2010). Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport. *PNAS*, 107(1), 326–331. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907468107>
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., ... Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal

- ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology*, 20(11), 1118–1123. <https://doi.org/10.1038/nbt749>
- Hiegemann, H., Herzer, D., Nettmann, E., Lübken, M., Schulte, P., Schmelz, K. G., ... Wichern, M. (2016). An integrated 45 L pilot microbial fuel cell system at a full-scale wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 218, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.052>
- 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>
- Labelle, E., & Bond, D. R. (2005). Cyclic voltammetry for the study of microbial electron transfer at electrodes.
- Li, H., Tian, Y., Qu, Y., Qiu, Y., Liu, J., & Feng, Y. (2017). A Pilot-scale Benthic Microbial Electrochemical System (BMES) for Enhanced Organic Removal in Sediment Restoration. *Scientific Reports*, 7(73), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep39802>
- Liébana, R., Arregui, L., Santos, A., Murciano, A., Marquina, D., & Serrano, S. (2016). Unravelling the interactions among microbial populations found in activated sludge during biofilm. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(9), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw134>
- Linares, R. V., Domínguez-Maldonado, J., Rodríguez-Leal, E., Patrón, G., Castillo-Hernández, A., Miranda, A., ... Alzate-Gaviria, L. (2019). Scale up of microbial fuel cell stack system for residential wastewater treatment in

continuous mode operation. *Water (Switzerland)*, 11(2), 1–16.

<https://doi.org/10.3390/w11020217>

Liu, X., Shi, L., & Gu, J. (2018). Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer. *Biotechnology Advances*, 36(7), 1815–1827. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.07.001>

López Zavala, M. Á., González Peña, O. I., Cabral Ruelas, H., Delgado Mena, C., & Guizani, M. (2019). Use of Cyclic Voltammetry to Describe the Electrochemical Behavior of a Dual-Chamber Microbial Fuel Cell. *Energies*, 12(3532;), 1–15.

Mardiana, U., Innocent, C., Jarrar, H., Cretin, M., Buchari, & Gandasasmita, S. (2015). Electropolymerized neutral red as redox mediator for yeast fuel cell. *International Journal of Electrochemical Science*, 10(11), 8886–8898.

Martinez, C. M., & Alvarez, L. H. (2018a). Application of redox mediators in bioelectrochemical systems. *Biotechnology Advances*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.005>

Martinez, C. M., & Alvarez, L. H. (2018b). Application of redox mediators in bioelectrochemical systems. *Biotechnology Advances*, 36(5), 1412–1423. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.005>

Masák, J., Alena, C., Schreiberová, O., & Rezanka, T. (2014). Pseudomonas biofilms: possibilities of their control. *Federation of European Microbiological Societies*, 89, 1–14. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12344>

- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., ... Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*, 6(3), 610–618.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- Mecea, V. M. (2006). Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? *Sensors and Actuators, A: Physical*, 128, 270–277.
<https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.01.023>
- Myers, C. R., & Nealson, K. H. (1988). Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1701057> REFERENCES Linked references are available on J. *Science*, 240(4857), 1319–1321.
- Nealson, K. H. (2002). Iron and Manganese in Anaerobic Respiration: Environmental Significance, Physiology, and Regulation. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 311–343.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.48.1.311>
- Pankratova, G., & Gorton, L. (2017). Electrochemical communication between living cells and conductive surfaces. *Current Opinion in Electrochemistry*, 5(1), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.013>
- Park, D. H., Laivenieks, M., Guettler, M. V., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1999). Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron

donor for growth and metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2912–2917.

Park, D. H., & Zeikus, J. G. (1999). Utilization of Electrically Reduced Neutral Red by *Actinobacillus succinogenes* : Physiological Function of Neutral Red in Membrane-Driven Fumarate Reduction and Energy Conservation. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2403–2410.

Park, Doo Hyun, Kim, S. K., Shin, I. H., & Jeong, Y. J. (2000). Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode. *Biotechnology Letters*, 22(16), 1301–1304.

Park, Doo Hyun, & Zeikus, J. G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 27 , 2017 by INDIAN INST OF TECHNOLOGY Kharagpur. *Applied Environmental Microbiology*, 66(4), 1292–1297. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1292-1297.2000>. Updated

Pinchuk, G. E., Geydebekht, O. V, Hill, E. A., Reed, J. L., Konopka, A. E., Beliaev, A. S., & Fredrickson, J. K. (2011). Pyruvate and Lactate Metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under Fermentation , Oxygen Limitation , and Fumarate Respiration Conditions □ †, 77(23), 8234–8240. <https://doi.org/10.1128/AEM.05382-11>

Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., ... El-Naggar, M. Y. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron

- transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
- Potter, M. C. (1911). Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 84(571), 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Ritalahti, K. M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S. S., & Lo, F. E. (2006). Quantitative PCR Targeting 16S rRNA and Reductive Dehalogenase Genes Simultaneously Monitors Multiple Dehalococcoides Strains, 72(4), 2765–2774. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2765>
- Roller, S. D., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Stirling, J. L., & Thurston, C. F. (1984). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 348(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/jctb.280340103>
- Scott, J. H., & Neelson, K. H. (1994). A Biochemical-Study of the Intermediary Carbon Metabolism of *Shewanella-Putrefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 176(11), 3408–3411. <https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3408-3411.1994>
- Shah, S., Venkatramanan, V., & Prasad, R. (2019). Microbial Fuel Cell: Sustainable Green Technology for Bioelectricity Generation and Wastewater Treatment. In S. Shah, V. Venkatramanan, & R. Prasad (Eds.), *Sustainable*

- Green Technologies for Environmental Management* (1st ed. 20, pp. 199–218). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_10
- Tang, Y. J., Hwang, J. S., Wemmer, D. E., & Keasling, J. D. (2007). *Shewanella oneidensis* MR-1 fluxome under various oxygen conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 718–729. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-06>
- Thenmozhi, K., & Narayanan, S. S. (2007). Amperometric hydrogen peroxide sensor based on a sol-gel-derived ceramic carbon composite electrode with toluidine blue covalently immobilized using 3-aminopropyltrimethoxysilane. *Anal Bioanal Chem*, 387, 1075–1082. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0992-2>
- Thung, W. E., Ong, S. A., Ho, L. N., Wong, Y. S., Ridwan, F. M., Oon, Y. L., ... Lehl, H. K. (2017). Pilot scale single chamber up-flow membrane-less microbial fuel cell for wastewater treatment and electricity generation. *AIP Conference Proceedings*, 1828. <https://doi.org/10.1063/1.4979404>
- Tota-Maharaj, K., & Paul, P. (2015). Performance of pilot-scale microbial fuel cells treating wastewater with associated bioenergy production in the Caribbean context. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 6(3), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s40095-015-0169-x>
- Trapero, J. R., Horcajada, L., Linares, J. J., & Lobato, J. (2017). Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization. *Applied Energy*, 185, 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.109>

- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., ... Neelson, K. H. (2009). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(2), 705–724.
<https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-705>
- Vetrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., & Lloyd, J. R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(3), 615–623.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>
- Walter, X. A., Merino-jiménez, I., Greenman, J., & Ieropoulos, I. (2018). PEE POWER ® urinal II – Urinal scale-up with microbial fuel cell scale-down for improved lighting. *Journal of Power Sources*, *392*(May), 150–158.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.02.047>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *73*(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Watson, V. J., & Logan, B. E. (2010). Power Production in MFCs Inoculated With *Shewanella oneidensis* MR-1 or Mixed Cultures, *105*(3), 489–498.
<https://doi.org/10.1002/bit.22556>

- West, E. A., Jain, A., & Gralnick, J. A. (2017). Engineering a Native Inducible Expression System in *Shewanella oneidensis* to Control Extracellular Electron Transfer. *ACS Synthetic Biology*, 6(9), 1627–1634. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00349>
- Wu, S., Li, H., Zhou, X., Liang, P., Zhang, X., Jiang, Y., & Huang, X. (2016). A novel pilot-scale stacked microbial fuel cell for efficient electricity generation and wastewater treatment. *Water Research*, 98, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.043>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., ... Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., & Jin, T. (2011). An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(10), 4427–4435. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.012>

ANEXO 1: Curva de calibración para medición de lactato

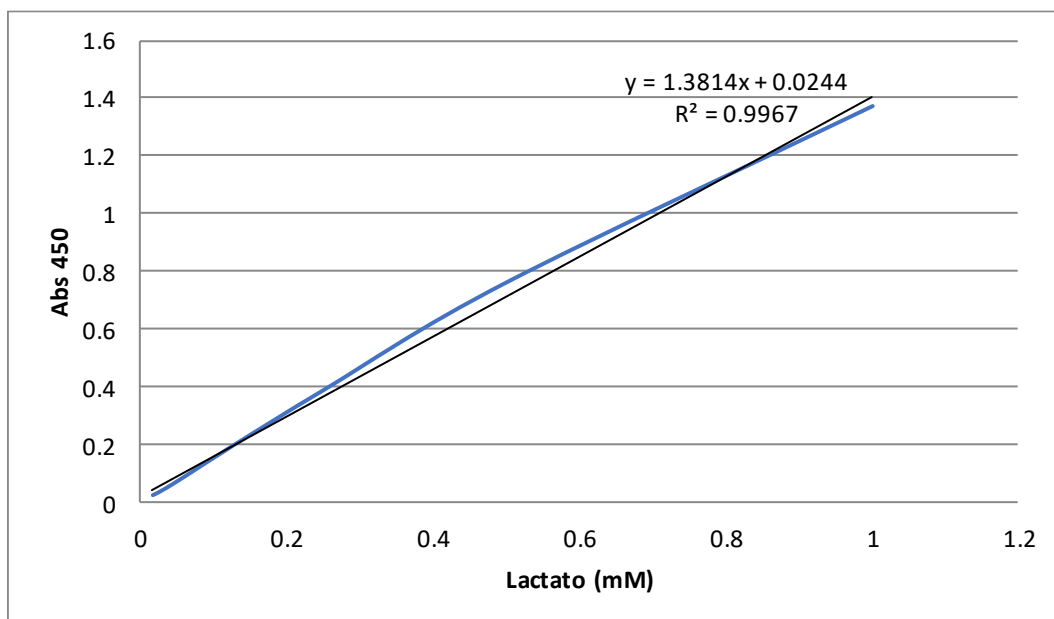


Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de lactato calculadas para la muestra SL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	1.605	1.731		1.668	1.190	11.898
1	1.265			1.265	0.898	8.981
2	1.157			1.157	0.820	8.199
3	0.734	0.711		0.723	0.505	5.054
5	0.597	0.606		0.602	0.418	4.178
7	0.622	0.628		0.625	0.435	4.348
10	0.539	0.535		0.537	0.371	3.711
15	0.228	0.231		0.230	0.148	1.485
22	0.01	0.004		0.007	-0.013	0.000
54	0.754	0.772	0.794	0.773	0.542	5.422
55	0.612	0.659		0.636	0.442	4.424
56	0.615	0.645	0.62	0.627	0.436	4.360
57	0.576	0.581	0.551	0.569	0.394	3.945
59	0.37	0.368		0.369	0.249	2.495
63	0.327	0.308		0.318	0.212	2.122
65	0.212	0.206		0.209	0.134	1.336
69	0.001	0.008		0.004	-0.014	-0.144
85	0.011	0.014	0.017	0.014	-0.008	-0.075

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de lactato calculadas para la muestra RNL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	1.504	0.521		1.50	1.07	10.71
1	1.314	0.115		1.31	0.93	9.34
2	1.322	0.362		1.32	0.94	9.39
3	1.146	0.281		1.15	0.81	8.12
5	1.049	0.468		1.05	0.74	7.42
7	1.048	0.015		1.05	0.74	7.41
10	0.793	0.753		0.77	0.54	5.42
15	0.599	0.616		0.61	0.42	4.22
22	0.013	0.01	0	0.01	-0.01	0.00
54	0.764	0.748	0.788	0.77	0.54	5.37
55	0.69	0.657	0.679	0.67	0.47	4.66
56	0.587	0.564	0.578	0.58	0.40	4.00
57	0.613	0.671	0.604	0.63	0.44	4.38
59	0.396	0.398		0.40	0.27	2.70
63	0.355	0.348		0.35	0.24	2.37
65	0.265	0.266		0.27	0.17	1.75
69	0.026	0.025		0.03	0.00	0.00
85	0.006	0.014	0.012	0.01	-0.01	0.00

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de lactato calculadas para la muestra ATL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	1.391			1.391	0.98928623	9.89286231
1	1.187			1.187	0.84160996	8.41609961
2	1.155			1.155	0.81844506	8.18445056
3	1.039			1.039	0.73447227	7.34472275
5	1.031			1.031	0.72868105	7.28681048
7	0.086	0.078		0.082	0.04169683	4.16968293
10	0.078	0.081		0.0795	0.03988707	3.98870711
15	0.333	0.337	0.283	0.31766667	0.2122967	2.12296704
22	0.003	0.004		0.0035	-0.0151296	0
54	0.823	0.816	0.963	0.86733333	0.61020221	6.1020221
55	0.635	0.562		0.5985	0.41559288	4.15592877
56	0.54	0.568	0.553	0.55366667	0.38313788	3.83137879
57	0.537	0.534	0.591	0.554	0.38337918	3.83379181
59	0.37	0.373		0.3715	0.25126683	2.51266831
63	0.326	0.313		0.3195	0.21362386	2.1362386
65	0.14	0.14		0.14	0.08368322	0.8368322
69	0.026	0.029		0.0275	0.0022441	0.022441
85	0.005	0.017	0.02	0.014	-0.0075286	0

ANEXO 2: Curva de calibración para medición de Acetato

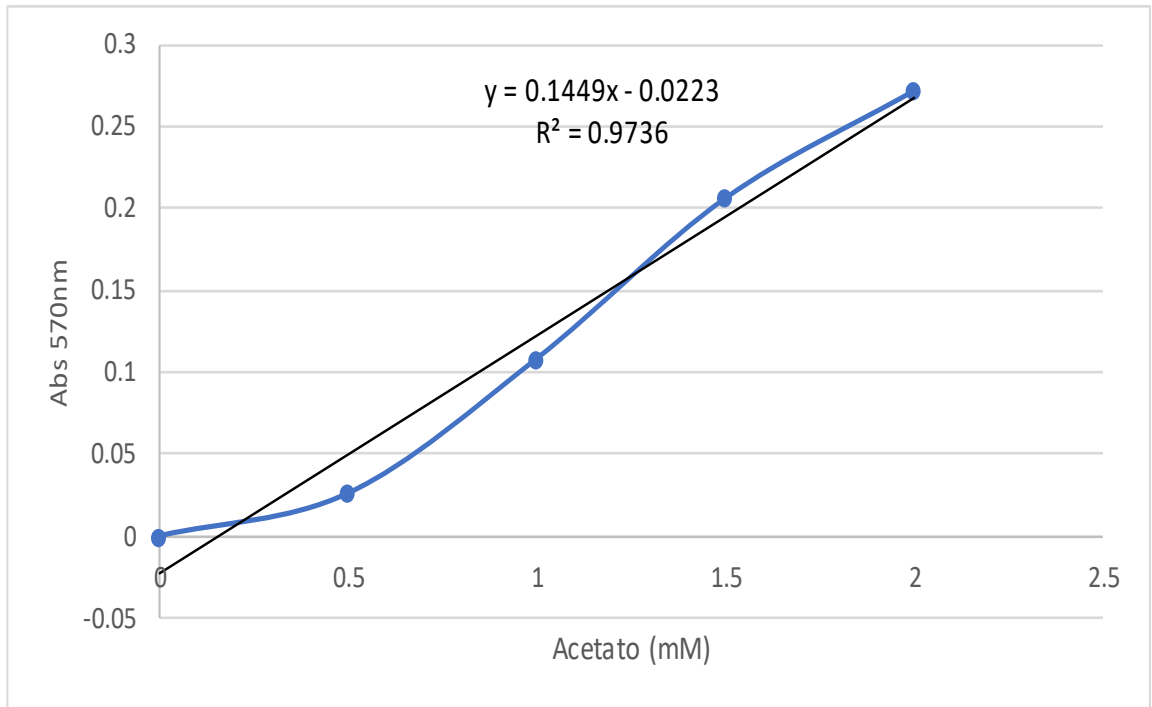


Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra SA

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado	Concentración (mM)
0	0.111	0.115	0.111	0.112	0.929	9.291
1	0.111	0.116		0.114	0.937	9.372
2	0.112	0.113		0.113	0.930	9.303
3	0.121	0.104		0.113	0.930	9.303
5	0.108	0.098		0.103	0.865	8.647
7	0.103	0.099		0.101	0.851	8.509
10	0.098	0.105		0.102	0.854	8.544
22	0.084	0.081	0.081	0.082	0.720	7.198
56	0.46	0.461	0.462	0.461		3.335
57	0.373	0.383	0.373	0.376		2.751
59	0.321	0.289	0.33	0.313		2.316
63	0.081	0.082	0.149	0.104		0.872
65	0.156	0.166		0.161		1.265
69	0.087	0.086		0.087		0.751

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra RNA

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	0.128	0.116	0.106	0.117	0.959	9.591
1	0.105	0.119		0.112	0.927	9.268
2	0.117	0.108		0.113	0.930	9.303
3	0.107	0.092		0.100	0.841	8.406
5	0.1	0.1		0.100	0.844	8.440
7	0.061	0.058		0.060	0.565	5.645
8	0.068	0.067		0.068	0.620	6.197
10	0.058	0.064	0.06	0.061	0.573	5.726
22	0.08	0.081		0.081	0.709	7.095
56	0.475	0.471		0.473		3.418
57	0.406	0.423	0.451	0.427		3.098
59	0.355	0.362	0.359	0.359		2.629
63	0.079	0.081	0.169	0.110		0.911
65	0.177	0.082		0.130		1.048
69	0.085	0.074	0.083	0.081		0.711

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra ATA

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0.00	0.12	0.12		0.12	0.98	9.82
1.00	0.11	0.11		0.11	0.90	9.03
2.00	0.10	0.09		0.10	0.83	8.27
3.00	0.07	0.08	0.08	0.07	0.66	6.62
5.00	0.06	0.06	0.06	0.06	0.56	5.61
7.00	0.07		0.07	0.07	0.63	6.30
10.00	0.07	0.08	0.07	0.07	0.67	6.69
22.00	0.08	0.08		0.08	0.73	7.30
56.00	0.44	0.45	0.46	0.45		3.27
57.00	0.37	0.37	0.35	0.36		2.66
59.00	0.26	0.27	0.27	0.27		2.01
63.00	0.08	0.09	0.09	0.08		0.74
65.00	0.08	0.08	0.09	0.08		0.72
69.00	0.08	0.08	0.08	0.08		0.71

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra SL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	0.085	0.085	0.085	0.034	0.389	3.885
22	0.344	0.357	0.363	0.304	2.250	22.496
59	0.502	0.482	0.512	0.448	3.243	32.434
85	0.076	0.078	0.077	0.026	0.333	3.333
87	0.770	0.810	0.801	0.743	5.279	52.793

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra RNL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	0.72	0.71	0.72	0.67	4.75	47.48
22	0.34	0.37	0.38	0.31	2.31	23.07
59	0.83	0.88	0.90	0.82	5.79	57.88
85	0.08	0.08	0.08	0.02	0.32	3.22
87	0.08	0.08	0.08	0.03	0.36	3.61

Tabla detallada de las mediciones y concentraciones de acetato calculadas para la muestra SL

Día	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Resultado de la dilución	Concentración (mM)
0	0.874	0.904	0.883	0.836	5.923	59.234
22	0.746	0.544	0.685	0.607	4.345	43.453
59	0.560	0.576	0.571	0.518	3.729	37.288
85	0.348	0.321	0.339	0.285	2.121	21.208
87	0.096	0.093	0.094	0.043	0.453	4.530

ANEXO 3: Resultados obtenidos durante el análisis del gen 16S rRNA

Resultados luego de la extracción y purificación de ADN

Muestra	Volumen o peso de muestra original (g or mL)	Volumen (μ L)	Concentración de ADN (ng/ μ L)
1.SL.CF	0.34 g	100	29.5
1.SA.CF	0.41 g	100	16.3
1.RNA.CF	0.48 g	100	17.6
1.RNL.CF	0.43 g	100	46.8
1.ATA.CF	0.49 g	100	14.7
1.ATL.CF	0.35 g	100	20.4
1.ATL.P	0.5 mL ※	100	66.4
1.RNL.P	0.5 mL ※	100	89.5
1.SL.P	0.5 mL ※	100	71.9
3.SL	0.5 mL ※	100	0.8
3.SA	0.5 mL ※	100	0.6
3.RNA	0.5 mL ※	100	0.5
3.RNL	0.5 mL ※	100	1.1
3.ATA	0.5 mL ※	100	1.0
3.ATL	0.5 mL ※	100	1.2

El límite de cuantificación de la concentración de ADN es de 0.1 ng / uL, y el límite de detección es de aproximadamente 0.05 ng / uL.

※ El sedimento se suspendió en 1 ml de solución salina fisiológica, de los cuales 0,5 ml se usaron para extracción.

Resultados luego de qPCR

El número de genes eubacterianos se cuantificó por PCR en tiempo real.

試料名	Muestra utilizada (g or mL)	ADN purificado		número de reacción	ADN diluido equivalente (copias / μ L de ADN diluido)			Solución stock de ADN equivalente (copias / μ L-solución stock de ADN)			Conversión de muestra (copias / g o ml)					Desviación estándar	Error estándar
		Factor de dilución (veces)	volumen utilizado (μ L)		Valor	división	Límite inferior	Valor	división	Límite inferior	Valor	división	Media	división	Límite inferior		
1.SL.CF	0.3	10	2	1	4.9E+05	(O)	1.0.E+02	4.9E+06	(O)	1.0.E+03	2.7E+09	(O)	3.0E+09	(O)	5.5E+05	15%	11%
				2	6.1E+05	(O)		6.1E+06	(O)		3.3E+09	(O)					
1.SA.CF	0.4	10	2	1	4.9E+05	(O)	1.0.E+02	4.9E+06	(O)	1.0.E+03	2.2E+09	(O)	2.0E+09	(O)	4.6E+05	13%	9%
				2	4.1E+05	(O)		4.1E+06	(O)		1.9E+09	(O)					
1.RNA.CF	0.5	10	2	1	5.2E+05	(O)	1.0.E+02	5.2E+06	(O)	1.0.E+03	2.0E+09	(O)	2.1E+09	(O)	3.9E+05	2%	2%
				2	5.4E+05	(O)		5.4E+06	(O)		2.1E+09	(O)					
1.RNL.CF	0.4	10	2	1	1.2E+06	(O)	1.0.E+02	1.2E+07	(O)	1.0.E+03	5.0E+09	(O)	4.8E+09	(O)	4.4E+05	6%	5%
				2	1.1E+06	(O)		1.1E+07	(O)		4.6E+09	(O)					
1.ATA.CF	0.5	10	2	1	5.4E+05	(O)	1.0.E+02	5.4E+06	(O)	1.0.E+03	2.0E+09	(O)	2.0E+09	(O)	3.8E+05	4%	3%
				2	5.0E+05	(O)		5.0E+06	(O)		1.9E+09	(O)					
1.ATL.CF	0.4	10	2	1	5.5E+05	(O)	1.0.E+02	5.5E+06	(O)	1.0.E+03	3.0E+09	(O)	2.8E+09	(O)	5.4E+05	7%	5%
				2	5.0E+05	(O)		5.0E+06	(O)		2.7E+09	(O)					
1.ATL.P	0.5	10	2	1	1.4E+06	(O)	1.0.E+02	1.4E+07	(O)	1.0.E+03	5.4E+09	(O)	5.1E+09	(O)	3.8E+05	8%	6%
				2	1.3E+06	(O)		1.3E+07	(O)		4.8E+09	(O)					
1.RNLP	0.5	10	2	1	1.8E+06	(O)	1.0.E+02	1.8E+07	(O)	1.0.E+03	6.7E+09	(O)	6.3E+09	(O)	3.8E+05	9%	6%
				2	1.6E+06	(O)		1.6E+07	(O)		5.9E+09	(O)					
1.SLP	0.5	10	2	1	9.3E+05	(O)	1.0.E+02	9.3E+06	(O)	1.0.E+03	3.5E+09	(O)	3.7E+09	(O)	3.8E+05	8%	6%
				2	1.1E+06	(O)		1.1E+07	(O)		3.9E+09	(O)					
3.SL	0.5	10	2	1	2.1E+04	(O)	1.0.E+02	2.1E+05	(O)	1.0.E+03	7.9E+07	(O)	8.0E+07	(O)	3.8E+05	2%	1%
				2	2.2E+04	(O)		2.2E+05	(O)		8.1E+07	(O)					
3.SA	0.5	10	2	1	1.4E+04	(O)	1.0.E+02	1.4E+05	(O)	1.0.E+03	5.3E+07	(O)	5.1E+07	(O)	3.8E+05	4%	3%
				2	1.3E+04	(O)		1.3E+05	(O)		5.0E+07	(O)					
3.RNA	0.5	10	2	1	1.3E+04	(O)	1.0.E+02	1.3E+05	(O)	1.0.E+03	4.7E+07	(O)	4.4E+07	(O)	3.8E+05	9%	6%
				2	1.1E+04	(O)		1.1E+05	(O)		4.1E+07	(O)					
3.RNL	0.5	10	2	1	2.6E+04	(O)	1.0.E+02	2.6E+05	(O)	1.0.E+03	9.8E+07	(O)	9.8E+07	(O)	3.8E+05	0%	0%
				2	2.6E+04	(O)		2.6E+05	(O)		9.8E+07	(O)					
3.ATA	0.5	10	2	1	2.8E+04	(O)	1.0.E+02	2.8E+05	(O)	1.0.E+03	1.0E+08	(O)	9.8E+07	(O)	3.8E+05	9%	6%
				2	2.5E+04	(O)		2.5E+05	(O)		9.2E+07	(O)					
3.ATL	0.5	10	2	1	2.8E+04	(O)	1.0.E+02	2.8E+05	(O)	1.0.E+03	1.0E+08	(O)	1.0E+08	(O)	3.8E+05	0%	0%
				2	2.8E+04	(O)		2.8E+05	(O)		1.0E+08	(O)					

Resumen

Muestra	(copies/g or mL)	
	Bacterias totales	
1.SL.CF	3.0E+09	(○)
1.SA.CF	2.0E+09	(○)
1.RNA.CF	2.1E+09	(○)
1.RNL.CF	4.8E+09	(○)
1.ATA.CF	2.0E+09	(○)
1.ATL.CF	2.8E+09	(○)
1.ATL.P	506250000	(○)
1.RNL.P	6281250000	(○)
1.SL.P	3714375000	(○)
3.SL	8.0E+07	(○)
3.SA	5.1E+07	(○)
3.RNA	44062500	(○)
3.RNL	98250000	(○)
3.ATA	98250000	(○)
3.ATL	104250000	(○)

ANEXO 4: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias

aisladas

Colonia	Diámetro (mm)	Color	Forma	Elevación	Margen	tinción gran	Forma	pH in M9 lactate *	pH in M9 acetate *
1	más de 5	Blanco	Filamentosa	umbonate	filamentoso	(-)	bacilos	7 (+)	7 (+)
2	4	Amarillo	circular	umbonate	entero	(-)	bacilos cortos	6.9 (+)	7
3	2	melón	circular	convexa	entero	(+)	bacilos	6.9 (+)	7 (++)
4	1	Blanco	circular	convexa	entero	-	-	-	-
5	1	Blanco	circular	convexa	entero	-	-	6.9	6.9
6	3	Amarillo	circular	convexa	entero	(-)	bacilos	7 (+)	6.9
7	1.5	Blanco	circular	convexa	entero	(-)	bacilos, hifa	7 (+)	7 (++)
8	4	melón	circular	plana	entero	(-)	bacilos	7 (+++)	7 (+)
9	4	Blanco	circular	convexa	entero	-	-	-	-
10	4	Amarillo	circular	umbonada	entero	(-)	bacilos, hifa	7 (+)	7
11	6	Blanco	circular	crateriforme	undulate	(-)	bacilos	6.9	7
12	3	melón	circular	convexa	entero	(+)	bacilos	7 (+++)	7 (+)
13	5	Marrón	circular	plana	entero	(-)	bacilos	7 (+++)	7 (++)
14	2	Amarillo	irregular	plana	ondulada	-	-	-	-
15	5	melón	irregular	plana	ondulada	-	-	-	-

ANEXO 5: Análisis con Greengenes

En general se encontraron 11 familias con “Greengenes” distintas en donde destacan 4 familias: Xanthomonadaceae, Pseudomonadaceae, Shewanellaceae, y Comamonadaceae. Se agruparon las familias que representaban menos del 0.1% de reads de cada muestra en “OTROS”

La familia Xanthomonadaceae obtuvo más de 50% en porcentaje de reads en casi todos los tratamientos. La familia Cellulomonadaceae no fue detectada en el tratamiento SA, ni en las muestras de filtros de carbono de ATA y ATL. La familia Shewanellaceae estuvo más representada en las muestras de filtros de carbono que en las del medio. La familia Comamonadaceae se encuentra principalmente en el medio (barras 1.M y 3.M) que conformando el biofilm en los filtros de carbono y la familia Oxalobacteraceae particularmente se encuentra en los tratamientos RNA, RNL y SA.

Especialmente la familia Xanthomonadaceae estuvo representada en los tratamientos con los ánodos modificados con azul de toluidina (ATL, ATA). La presencia de las familias Xanthomonadaceae y Pseudomonadaceae se podrían explicar a que éstas agrupan a miembros con estrategias que les permiten formar biofilms.

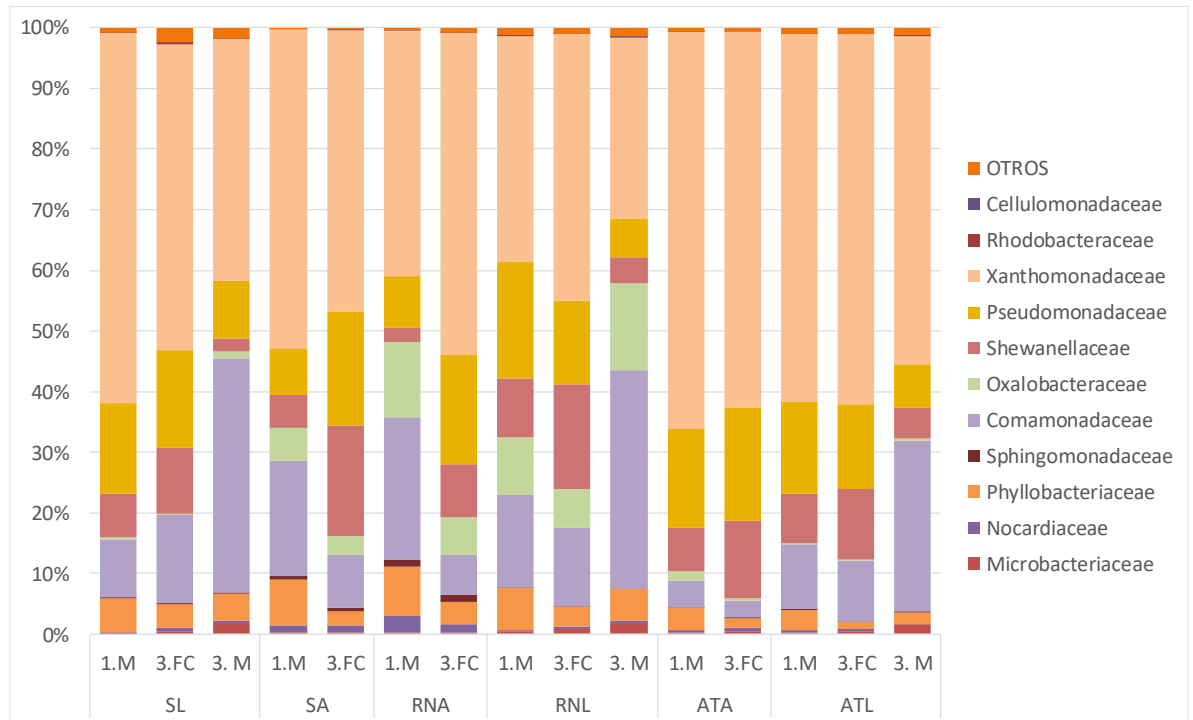


Figura a. Resultados del secuenciamiento del gen 16S rRNA. Se detectaron 11 familias distintas en cada tratamiento basado en el porcentaje de reads presentes en cada muestra. Dentro de todos los tratamientos se incluyen los resultados del análisis de muestras de medio (M) o filtros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3.

En el análisis a nivel de género se utilizaron dos bases de datos distintas y mostraron diferencias en el número de familias identificadas y en la estimación del género *Stenotrophomonas* (Xanthomonadaceae) y *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae). Utilizando la base de datos “greengenes” (figura b) se identificaron 53 géneros distintos, en los que resaltan *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Variovorax*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus*, y *Delftia*.

Análisis utilizando la base de datos Greengenes

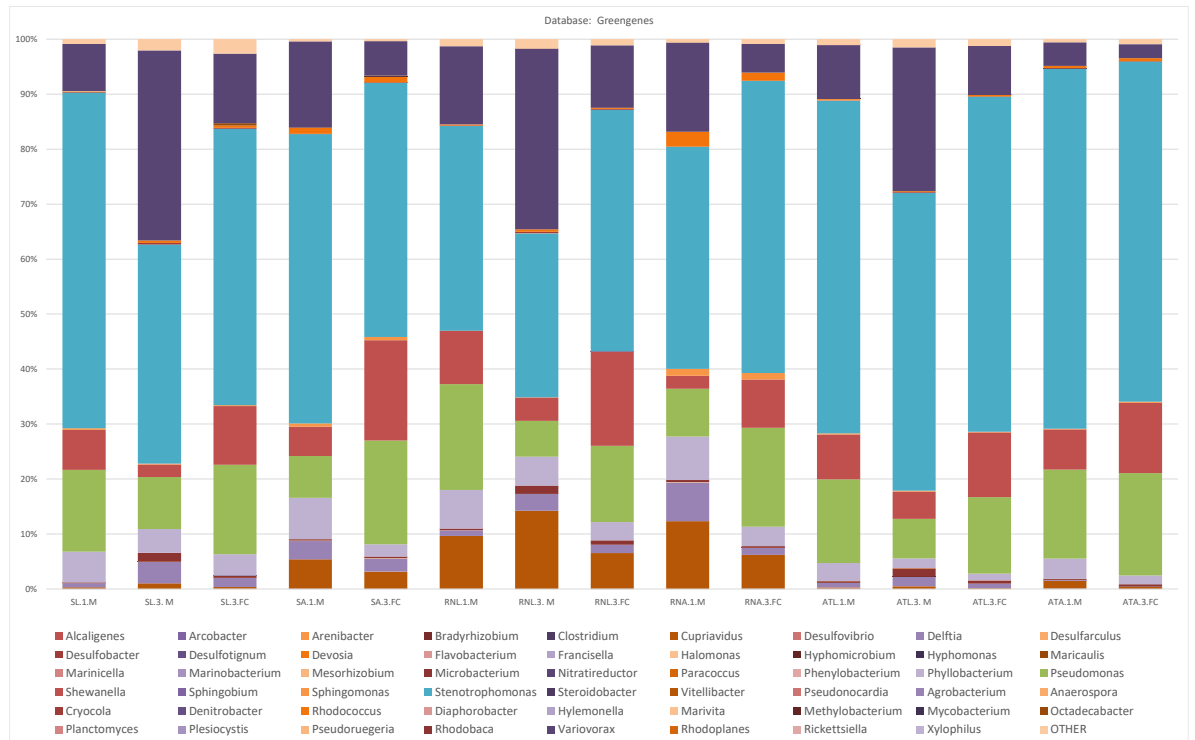


Figura b. Resultados del análisis del gen 16S rRNA a nivel de género utilizando la base de datos “Greengenes”. Dentro de todos los tratamientos se incluyen los resultados del análisis de muestras de medio (M) o fieltros de carbono (FC) colectadas al final de la fase 2 o fase 3.

ANEXO 6: Tablas sobre OTUs “exclusivos” de cada muestra

Tabla a. Géneros identificados solo en los tratamientos con azul de toluidina y el porcentaje que cada OTU representó dentro de cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	%OTU
Solo en ATL	Rhodococcus	Rhodococcus cercidiphylli	ATL.1.M	0.0119%
	Denitrovibrio	Denitrovibrio acetiphilus	ATL.1.M	0.0059%
	Diplorickettsia	Diplorickettsia massiliensis	ATL.1.M	0.0059%
	Rhodococcus	Rhodococcus cercidiphylli	ATL.3. CF	0.0284%
	Nitrolancea	Nitrolancea hollandica	ATL.3. CF	0.0057%
	Hyphomicrobium	Hyphomicrobium nitrativorans	ATL.3. M	0.0056%
	Tepidamorphus	Tepidamorphus gemmatus	ATL.3. M	0.0056%
	Rhodococcus	Rhodococcus cercidiphylli	ATL.3. M	0.0056%
	Proteiniphilum	Proteiniphilum acetatigenes	ATL.3. M	0.0056%
	Nitrolancea	Nitrolancea hollandica	ATL.3. M	0.0112%
	Albimonas	Albimonas pacifica	ATL.3. M	0.0057%
	Caenimonas	Caenimonas koreensis	ATL.3. M	0.0056%
Solo en ATA	Francisella	Francisella philomiragia	ATA.1.M	0.0065%
	Salinibacter		ATA.1.M	0.0065%
	Comamonas		ATA.1.M	0.0065%
	Steroidobacter	Steroidobacter denitrificans	ATA.1.M	0.0065%
	Desulfotignum	Desulfotignum toluenicum	ATA.3.FC	0.0082%
	Sulfurovum	Sulfurovum lithotrophicum	ATA.3.FC	0.0082%
Ambos	Clostridium	Clostridium acidisoli	ATA.1.M	0.0261%
	Pseudonocardia	Pseudonocardia ammonioxydans	ATA.3.FC	0.0082%
	Clostridium	Clostridium papyrosolvans	ATL.1.M	0.0059%
	Pseudonocardia	Pseudonocardia ammonioxydans	ATL.3. M	0.0056%

Tabla b. Géneros identificados solo en los tratamientos con rojo neutro y el porcentaje que cada OTU representó dentro de cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	%OTU
Solo en RNL	Wandonia	Wandonia haliotis	RNL.1.M	0.0045%
	Thermomarinilinea	Thermomarinilinea lacunifontana	RNL.1.M	0.0045%
	Halobacteriovorax	Halobacteriovorax marinus	RNL.1.M	0.0045%
	Eoetvoesia	Eoetvoesia caeni	RNL.3.FC	0.0058%
	Sphingobium	Sphingobium jiangsuense	RNL3.FC	0.0058%
Solo en RNA	Desulfobacter	Desulfobacter vibrioformis	RNA.3.FC	0.0065%
	Spirochaeta	Spirochaeta smaragdinae	RNA.3.FC	0.0065%

Tabla c. Géneros identificados solo en los tratamientos sin mediador redox y el porcentaje que cada OTU representó dentro de cada muestra.

Tratamiento	Género	Especie	Muestra	% OTU
Solo en SL	Devosia		SL.1.M	0.0057%
	Flavobacterium		SL.1.M	0.0057%
	Litorilinea	Litorilinea aerophila	SL.1.M	0.0057%
	Castellaniella		SL.1.M	0.0057%
	Maricaulis	Maricaulis parjimensis	SL.3. M	0.0062%
	Xenophilus	Xenophilus aerolatus	SL.3. M	0.0125%
	Desulfarculus	Desulfarculus baarsii	SL.3.FC	0.0055%
	Halomonas	Halomonas shengliensis	SL.3.FC	0.0055%
	Nitratireductor	Nitratireductor aquimarinus	SL.3.FC	0.0110%
	Xenophilus	Xenophilus aerolatus	SL.3.FC	0.0055%
	Stappia		SL.3.FC	0.0331%
	Nitriliruptor	Nitriliruptor alkaliphilus	SL.3.FC	0.0055%
Solo en SA	Phycisphaera	Phycisphaera mikurensis	SA.1.M	0.0062%
	Arenibacter	Arenibacter troitsensis	SA.2.FC	0.0052%
	Sunxiuqinia	Sunxiuqinia elíptica	SA.3.FC	0.0052%
	Stappia		SA.3.FC	0.0052%
	Mariniphaga	Mariniphaga anaerophila	SA.3.FC	0.0052%
	Azoarcus		SA.3.FC	0.0052%
Ambos	Alcaligenes		SA.3.FC	0.0104%
	Stappia	Stappia taiwanensis	SA.3.FC	0.0052%
	Alcaligenes		SL.3.FC	0.0386%
	Stappia	Stappia taiwanensis	SL.3.FC	0.0331%