CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA AL CÁTODO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA REDUCTORA DE CROMO HEXAVALENTE MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA 16S rRNA

LEIDY ALEJANDRA ORDOÑEZ ORDOÑEZ
LIZETH VANESSA PABON FIGUEROA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2014

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA AL CÁTODO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA REDUCTORA DE CROMO HEXAVALENTE MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA 16S rRNA

LEIDY ALEJANDRA ORDOÑEZ ORDOÑEZ
LIZETH VANESSA PABON FIGUEROA

Trabajo de grado presentado como requisito final para la asignatura Trabajo de Grado II

Asesora
DOLLY MARGOT REVELO ROMO
Bióloga M. Sc.
Universidad de Nariño

Co-asesor
NELSON HUMBERTO HURTADO
Químico M. Sc., Ph.D.
Universidad de Nariño

Co-asesor
JAIME ORLANDO RUIZ
Ingeniero electrónico M. Sc.
Universidad de Nariño

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2014

NOTA DE RESPONSABILIDAD

"Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva del autor"

Artículo 1° del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

_____
Dolly Margot Revelo Romo Msc.
Firma del director del trabajo de grado

_____
Milena Guerrero Florez Msc.
Firma del jurado del trabajo de grado

_____
Juan Manuel Anzola PhD.
Firma del jurado del trabajo de grado

San Juan de Pasto, Noviembre 30 de 2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser nuestra luz y guía, quien caminó con nosotras en esta etapa primordial de nuestras vidas y nos mantuvo siempre unidas y motivadas por nuestra formación científica.

A nuestras familias por todo su amor, comprensión, apoyo y sacrificios para educarnos. Porque siempre han sido ellos nuestro ejemplo a seguir y quienes han inspirado nuestras vidas.

A nuestra asesora de trabajo de grado, Dolly Revelo quien orientó nuestra investigación y fue un apoyo incondicional para culminar este gran proceso, por su motivación, regaños y consejos que nos permitieron mejorar nuestra formación académica y personal. Por su espíritu científico e investigador que nos hace verla como una gran persona y ejemplo a seguir.

A nuestro coasesor del grupo de investigación de Bioelectroquímica, el profesor Nelson Hurtado por todas sus valiosas correcciones y aportes a nuestra investigación y por permitirnos trabajar hasta altas horas de la noche en su Laboratorio de Química teórica LQT y en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica GIPIB.

A nuestro coasesor del grupo de investigación de Bioelectroquímica, el ingeniero Jaime Ruiz por todas sus valiosas correcciones, aportes a nuestra investigación y la buena energía que nos transmitió.

Al Dr. Juan Manuel Anzola y a la profesora Milena Guerrero, jurados de esta investigación; por sus valiosas observaciones y aportes fundamentales a este trabajo.

Al grupo de investigación GENPAT, por brindarnos el apoyo para el desarrollo de nuestra investigación y permitirnos el acceso a su Laboratorio de Biología Molecular.

A los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño por prestarnos los equipos necesarios y brindarnos su apoyo en la comprensión de los procesos químicos necesarios en esta investigación.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales VIPRI por la financiación de la investigación.

Al Laboratorio Molecular Research DNA, por sus servicios de Pirosecuenciación 454.

A Jose Ricardo Bustos, investigador de CorpoGen, quien nos colaboró muy amablemente en la comprensión de aspectos relacionados con la programación informática.

A todos nuestros Profesores del programa de Biología porque fueron ellos quienes nos formaron como Biólogas científicas y nos inculcaron la labor de ser siempre mejores en nuestro camino investigativo.

A nuestros queridos profesores Maria Elena Solarte y Alvaro Pazos por su amistad, su confianza, sus valiosos consejos y por motivarnos a fijarnos grandes metas, con la certeza de que es posible alcanzarlas.

A nuestros compañeros del grupo de investigación en Bioletroquímica, Daniela, Stephany, Mario, Jorge, Chucho y Uriel, por su apoyo, su compañía y sus buenas energías que fueron de fundamental importancia para culminar este gran logro.

A nuestros lindos compañeros y compañeras de lucha y futuros Biólogos por todas las vivencias compartidas, porque fue hermoso conocerlos y aprender de cada uno de ustedes, Alexandra, Ginna, Maira Q, Mayra P, Beltrán, Tefa, Aura A, Aura T, Robert, Chelo, Daniela, Jenny, Camila, Karen, Jhon, Fercho, Sara, Juan José, Javier, Camilo, Ricardo, Miguel y a todos aquellos que hicieron parte de esta gran expedición.

Dedico este logro a mi mamá Consuelo *"Coco"* quien sin duda alguna me ha brindando incondicionalmente todo su amor y me ha enseñado que con esfuerzo, sacrificio y amor es posible alcanzar todas mis metas sin importar cuan grandes o difíciles puedan parecer; a mi papá Carlos Iván por su apoyo, amor y por regalarme y transmitirme su alegría y tranquilidad; a mis hermanos Andrés y Carolina por sus regaños y consejos que me han ayudado a ser una mejor persona; a mis amados sobrinos Camila, Mathias y Felipe por endulzar mi vida y alegrarla con tantas locuras y travesuras; a mi amiga Vanessa *"Mona"* por regalarme su valiosísima amistad y porque ha sido todo un honor y una bendición coexistir con ella durante todos estos años y ante todo, quiero dedicar y agradecer este logro a Dios, que es mi refugio y mi fortaleza, el autor de mi felicidad y quien camina día a día conmigo, me bendice y me guía.

Alejandra Ordóñez

A Dios dedico este gran logro en mi vida profesional, porque siempre he sentido su presencia, protección y acompañamiento espiritual. A mi familia, mi padre Javier Pabón, mi madre Teresa Figueroa y mis hermanos Vicky y Jhonny, porque son la bendición más bonita que Dios me ha regalado, son ellos quienes inspiran y alegran mi vida. Sé que mis triunfos y alegría, siempre serán su mejor regalo. Gracias por educarme, por su apoyo incondicional, por su comprensión y confianza plena en mí, porque todo su amor y esfuerzo se ven reflejados en esta meta cumplida de ser Bióloga científica UDENAR. A mi gran amiga y colega Alejita Ordoñez por su valiosa amistad, porque logramos caminar juntas este primer escalón y serán muchos más los recorridos. Siempre ha sido y será un honor aprender de ti, gracias por los momentos compartidos, por soportarme y brindarme tu paz y tranquilidad. A Alejandra Jiménez, mi amiga de infancia y vejez por ser mi cómplice y apoyo en este recorrido por la vida.

Vanessa Pabón.

RESUMEN

Una Celda de Combustible Microbiana (CCM) de biocátodo reductora de Cr(VI) es un sistema que emplea microorganismos para oxidar materia orgánica, producir energía eléctrica y reducir contaminantes como el Cr(VI), por lo que son considerados sistemas atractivos y promisorios para el tratamiento de aguas residuales. Hasta el momento se desconocen varios aspectos de su funcionamiento, principalmente los relacionados con los microorganismos de la biopelícula del cátodo. En esta investigación se logró evaluar el desempeño de dos CCMs de biocátodo con diferente configuración (CCM-H y CCM-PS) y se caracterizó la microbiota bacteriana asociada al cátodo en cada celda mediante pirosecuenciación 454 de regiones hipervariables del gen 16S rRNA.

Se observó un eficiente desempeño de las celdas en las que se alcanzaron altos porcentajes de reducción de Cr(VI) (99,82% CCM-H y 97,83% CCM-PS) y considerables porcentajes de remoción de materia orgánica (69% CCM-H y76% CCM-PS), mientras que el desempeño eléctrico fue bajo obteniendo una eficiencia coulómbica de 0.04% en la CCM-H y de 0.002% en la CCM-PS. Se encontró que los phyla más abundantes presentes en las biopelículas de los cátodos de ambas CCMs fueron Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. Respecto a la composición de las microbiotas, se encontró una alta riqueza representada por 94 especies en la CCM-H y 124 especies en la CCM-PS y en relación a su estructura, se encontró un género dominante (*Pseudomonas* con abundancia relativa de 36,3% en la CCM-H y 34,9% en la CCM-PS), 15 géneros abundantes y 26 no abundantes, incluyendo los géneros *Shinella, Hydrogenophaga, Papillibacter, Fluvicola, Myroides, Megamonas, Epulopiscium, Sphingobacterium, Actinobaculum, Acidovorax, Aquamicrobium, Oscillibacter, Phenylobacterium, Arcobacter, Bradyrhizobium, Bosea* y *Alkaliflexus* cuya asociación a la reducción de Cr(VI) se reporta por primera vez en esta investigación.

Las celdas empleadas en esta investigación permitieron el tratamiento simultáneo de aguas residuales contaminadas con materia orgánica (ánodo) y con Cr(VI) (cátodo), utilizando microorganismos provenientes de un ambiente propio de la región como es el río Pasto, demostrándose su potencial para futuros procesos de biorremediación de Cr(VI). Esta investigación es la primera a nivel regional en utilizar secuenciación de última generación para lograr caracterizar las microbiotas bacterianas asociadas al cátodo de CCMs reductoras de Cr(VI) y a nivel mundial quizá constituye un segundo estudio en reportar la composición de la microbiota bacteriana asociada a la reducción del Cr(VI) en CCMs.

ABSTRACT

A Cr(VI)-reducing biocathode-Microbial Fuel Cell (MFC) is a system that employs microbes for oxidizing organic matter, producing electric energy and reducing pollutants such as Cr(VI), so they are considered attractive and promissory systems for the treatment of waste water. Until now, various aspects of its operation, mainly those related to microbes of the cathode-biofilm are unknown. In this research we evaluated the performance of two biocathode-MFCs with different configuration (CCM-H y CCM-PS) and we characterized the bacterial microbiota associated to the cathode of each cell through pyrosequencing 454 of hypervariable regions of 16S rRNA gene.

We observed an efficient performance of the cells with high percentages of Cr(VI)-reduction (99,82% at CCM-H and 97,83% at CCM-PS) and considerable percentages of organic matter removal (69% at CCM-H and 76% at CCM-PS), while the electric performance was low obtaining a columbic efficience of 0,04% at CCM-H and 0,002% at CCM-PS. We found that the bacteria of the cathode-biofilm from the two MFCs mostly belong to the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. Respect to the composition of the microbiotas, we found a high richness represented by 94 species at CCM-H and 124 species at CCM-PS and regarding to the microbiota structure, we found a dominant genus (*Pseudomonas* whose relative abundance was 36,3% at CCM-H and 34,9% at CCM-PS), 15 abundant genus and 26 non-abundant genus, incluiding *Shinella, Hydrogenophaga, Papillibacter, Fluvicola, Myroides, Megamonas, Epulopiscium, Sphingobacterium, Actinobaculum, Acidovorax, Aquamicrobium, Oscillibacter, Phenylobacterium, Arcobacter, Bradyrhizobium, Bosea* and *Alkaliflexus* whose association with the Cr(VI) reduction is reported for first time in this research.

In the present research, the studied cells allowed the simultaneous treatment of waste water contaminated with organic matter (anode) and with Cr(VI) (cathode), besides we used microorganisms from an original environment of the region such as Pasto river and we demonstrated its potential for Cr(VI)-bioremediation processes. This study is the first at local level to use next generation sequencing to characterize the bacterial microbiota associated to the cathode of Cr(VI)-reducing MFCs and maybe it constitutes a second study worldwide in reporting bacteria that conforms this kind of biofilms.

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
1.	Introducción……..	1
2.	Objetivos. …….	4
2.1	Objetivo general. …….	4
2.2	Objetivos específicos. …….	4
3.	Marco teórico. …….	5
3.1	Generalidades y comportamiento ambiental del Cr…….	5
3.1.1	Problemática del cromo hexavalente Cr(VI)……	5
3.1.2	Usos industriales de Cr(VI)……..	6
3.1.3	Tratamiento de aguas residuales……..	6
3.2	Reducción biológica del Cr(VI)……	7
3.3	Celdas de Combustible Microbianas (CCMs)……..	8
3.3.1	Funcionamiento de una CCM de biocátodo…….	8
3.3.2	Aplicaciones de las CCMs de biocátodo……..	9
3.3.3	Evaluación del desempeño de una CCM de biocátodo…….	10
3.3.3.1	Demanda química de oxígeno – DQO……..	10
3.3.3.2	Determinación de Cr(VI)……..	11
3.3.3.3	Parámetros electroquímicos……..	11
3.4	Microorganismos de las CCMs…….	11
3.4.1	Microorganismos asociados al ánodo y transferencia de electrones……	11
3.4.2	Microorganismos asociados al cátodo y trasferencia de electrones…….	12
3.5	Biopelícula asociada a los electrodos de una CCM……..	12
3.6	Caracterización de comunidades microbianas…….	13
3.6.1	Métodos de secuenciación masiva……	14
4	Metodología……..	16
4.1	Configuración y operación de las CCMs……..	16
4.1.1	Configuración de las CCMs……..	16
4.1.2	Microorganismos empleados en las CCMs y aclimatación…….	17
4.1.3	Medios de cultivo para las cámaras anódica y catódica……...	18
4.1.4	Parámetros de evaluación del desempeño de las CCMs……...	18
4.1.4.1	Parámetros electroquímicos……	18
4.1.4.2	Parámetros analíticos de las CCMs……..	20
4.1.4.2.1	Demanda química de oxígeno DQO…….	20
4.1.4.2.2	Reducción de Cr(VI)……	20
4.2	Estandarización del protocolo de extracción de DNA de la biopelícula del cátodo	20
4.2.1	Obtención de la biopelícula……..	20
4.2.2	Ensayos de estandarización del protocolo de extracción de DNA……	20

4.2.3	Valoración y cuantificación de DNA……	22
4.2.4	Extracción del DNA total de la biopelícula del cátodo de las CCMs……...	22
4.3	Análisis bioinformático de secuencias parciales del gen 16S rRNA generadas por el sistema de secuenciación masiva…….	23
4.3.1	Amplificación y secuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA…….	23
4.3.2	Edición de secuencias y Operational Taxonomic Units OTU *picking*.……	23
5.	Resultados y discusión…….	23
5.1	Evaluación del desempeño de las CCMs reductoras de Cr(VI)……	24
5.1.1	Ensayos exploratorios de la CCM-H……	24
5.1.2	Evaluación del desempeño de las CCMs……..	24
5.1.3	Remoción de materia orgánica…….	26
5.1.4	Reducción biológica de Cr(VI) en las CCMs……	29
5.2	Estandarización del protocolo de extracción del DNA de la biopelícula del cátodo	30
5.2.1	Implementación del protocolo de extracción de DNA…….	32
5.2.2	DNA total de la biopelícula del cátodo de las CCMs reductoras de Cr(VI)…….	32
5.3	Análisis de la microbiota del biocátodo de las CCMs reductoras de Cr(VI)……	34
6.	Conclusiones…….	36
7.	Recomendaciones…….	49
8.	Bibliografía...……	51
9.	Anexos……..	53
		69

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Ensayos de estandarización del protocolo de extracción de DNA variando tiempo de centrifugación y vórtex empleando el kit PowerSoil DNA Isolation…… 22

Tabla 2. Condiciones bajo las cuales se operó la CCM-H…….…… 24

Tabla 3. Parámetros de evaluación del desempeño eléctrico de las CCMs operadas…… 28

Tabla 4. Porcentaje de remoción de materia orgánica en las CCMs operadas……..... 29

Tabla 5. Porcentaje de reducción de Cr(VI) en las celdas operadas……..... 31

Tabla 6. *Reads* obtenidos por pirosecuenciación 454 a partir de los biocátodos de las CCMs operadas…… 37

Tabla 7. Medidas de diversidad alfa para las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas……... 38

Tabla 8. Clasificación taxonómica de los OTUs más abundantes (abundancia relativa >2%) en las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas…… 41

Tabla 9. Clasificación taxonómica de los OTUs abundantes (abundancia relativa >0,5%) en las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas y reportes previos asociados a la reducción de Cr(VI)……. 46

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Reducción de Cr(VI) y mecanismo de protección por la cromato reductasa ChrR…… 7
Figura 2. Aplicaciones de una CCM de biocátodo: a. Remoción de materia orgánica; b. generación de energía; c. Reducción de Cr(VI)……. 10
Figura 3. Operación y configuración de las CCMs: a. Celda de combustible microbiana tipo H (CCM–H); b. Celda de combustible microbiano rectangular (CCM–PS); c. Sistema de Adquisición de Datos – SAD..……... 17
Figura 4. Recolección de muestras para inóculos de las CCMs: a. Laguna de igualación del Relleno Sanitario Antanas; b. Desague del río Pasto……... 18
Figura 5. Determinación del tiempo de operación de la CCM-H mediante la observación del cambio de color en la cámara catódica: a. Solución catódica al inicio del tiempo de operación; b. Solución catódica al final de tiempo de operación……... 19
Figura 6. Biopelícula del ánodo (izquierdo) y del cátodo (Derecho) de una Celda de Combustible Microbiana…… 25
Figura 7. Generación de voltaje en la CCM-H y CCM-PS…….. 27
Figura 8. DNA total extraído a partir de biopelícula catódica empleando el kit PowerSoil DNA Isolation según las instrucciones del fabricante…… 33
Figura 9. DNA total extraído a partir de biopelículas mediante tres ensayos del kit PowerSoil DNA Isolation, verificado en gel de agarosa al 0.8%..... 33
Figura 10. Verificación en gel de agarosa al 0.8% del DNA total extraído a partir de las biopelículas del biocátodo de las celdas usando el kit PowerSoil DNA Isolation: a. DNA de la biopelícula de la CCM-H; b. DNA de la biopelícula de la CCM-PS…… 35
Figura 11. Curva de rarefacción basada en pirosecuenciación de las microbiotas asociadas al cátodo de las CCM-H y CCH-PS. Los OTUs fueron definidos con una divergencia del 3%..... 37
Figura 12. Cantidad de OTUs encontrados para cada taxa presente en las CCMs operadas 39
Figura 13. Phyla presentes en la microbiota asociada al biocátodo de las CCMs operadas: a. CCM-H; b. CCM-PS……...40

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Parámetros biológicos, químicos y físicos probados en ensayos exploratorios para la operación de la CCM-H……. 69
Anexo 2. Generación de corriente en las dos celdas estudiadas: a. CCM-H; b. CCM-PS… 71
Anexo 3. Curva de calibración para análisis de DQO……... 72
Anexo 4. Curva de calibración para análisis de Cr(VI)……73
Anexo 5. Extracción de DNA utilizando el kit Soil DNA Isolation Norgen y Powersoil Isolation DNA…… 74
Anexo 6. Calidad de las secuencias generadas por pirosecuenciación 454…..……. 75
Anexo 7. Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las especies que conforman la biopelícula asociada al cátodo de CCMs reductoras de Cr(VI)……. 76

ABREVIATURAS

CCM - Celda de combustible microbiana

CCM-H - Celda de combustible microbiana tipo H

CCM-PS - Celda de combustible microbiana con puente salino

MIP - Membrana de intercambio protónico

Cr - Cromo

Cr(III) - Cromo trivalente

Cr(VI) - Cromo hexavalente

AFE - Aceptor final de electrones

EPS - Sustancias poliméricas extracelulares

DP – Densidad de potencia

EC – Eficiencia coulómbica

I – Corriente

V – Voltaje

SAD – Sistema de adquisición de datos

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

GLOSARIO

Aceptor final de electrones: Un aceptor final es el último elemento de una cadena de reacciones que recibe (acepta) electrones.

Agente oxidante: Es la especie química que un proceso redox acepta electrones y por tanto se reduce en dicho proceso.

Agente reductor: Es la especie química que un proceso redox pierde electrones y por tanto se oxida en dicho proceso.

Ánodo: Electrodo en el cual los electrones salen de la celda y ocurre la oxidación.

Biopelícula: Son organizaciones microbianas adheridas a superficies bióticas o abióticas gracias a la secreción de exopolisacáridos, estas conformaciones microbianas presentan características funcionales y estructuras complejas, como heterogeneidad de microambientes, diversidad, resistencia y capacidad de comunicación intercelular.

Biorremediación: Tecnología emergente que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto nocivo en suelo, agua y aire.

Cátodo: Electrodo en el cual los electrones entran a la celda y ocurre la reducción.

CCM: Celda de Combustible Microbiana, es un sistema biocatalizador electroquímico que puede convertir directamente la energía química de un sustrato orgánico a energía eléctrica a través de una cascada de reacciones redox.

Curtiembre: Proceso de someter las pieles de animales a una serie de tratamientos químicos y físicos con el fin de producir modificaciones en las pieles y convertirlas en cuero.

Electrodo: Conductor eléctrico, en una celda electroquímica, se refiere a cualquiera de los dos conceptos, sea ánodo o cátodo.

Microbiota bacteriana del cátodo de una CCM: Comunidad bacteriana que se establece en la biopelícula adherida a la superficie del cátodo, dependiente de las condiciones propias de las CCMs y que desempeña funciones cruciales en la reducción de Cr(VI).

Oxidación: Pérdida de electrones.

Reacciones redox: Toda reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre los reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación. Para que exista una reacción de oxidación-reducción en el sistema debe haber un agente reductor y un agente oxidante.

Reducción: Ganancia de electrones.

Sustrato: Fuente de carbono y energía importante para cualquier proceso biológico.

Transferencia de electrones: Es la transferencia de un electrón desde una sustancia de procedencia o donora que se oxida, a otra aceptora que se reduce.

1. INTRODUCCIÓN

El Cr(VI) es un metal empleado en diferentes industrias como la galvanoplastia, de textiles, pigmentos, metalurgia, elaboración de tintes y curtición de pieles (Tellez, Carvajal & Gaitán, 2004; Tandukar, Huber, Onoder & Pavlostathis, 2009). Estas industrias generan efluentes que contienen altas cantidades de Cr(VI) que son derramadas al ecosistema sin antes recibir un tratamiento adecuado para mitigar la contaminación con este metal (Tellez et al., 2004). La acumulación de Cr(VI) en el ambiente es un serio problema de salud pública y ambiental, puesto que es altamente tóxico y ha sido clasificado por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como sustancia carcinogénica del grupo I (Chang, Moon, Bretschger, Jang, Park, Nealson & Kim, 2006; Cuberos, Rodríguez & Prieto, 2009; Tandukar et al., 2009; Huang, Chai, Cheng & Chen, 2011).

En Colombia, la industria de cuero ha ido creciendo durante los últimos años ocupando el decimotercer puesto en la producción mundial de pieles (Rojas, 2010). Nariño ocupa el segundo lugar a nivel nacional en cuanto a concentración de industrias de cuero con un 9,6% de las curtiembres existentes a nivel nacional (Alzate et al., 2004; Rojas, 2010); estas descargan sus aguas residuales en el río Pasto con altas concentraciones de DBO (9267 kg), sólidos totales (31795.2 kg) y Cr (59 mg/L en cada descarga y 14,4 mg/L en el río Pasto) (Alzate et al., 2004; Prieto et al., 2008); pese a que algunos establecimientos tratan de mitigar la contaminación generada por la materia orgánica contenida en estos efluentes, la DQO sigue siendo alta; además es importante resaltar que no se aplican tratamientos para remoción de metales pesados como el Cromo (Cr) por lo cual este persiste en altas concentraciones (Alzáte, 2004). Adicionalmente, existe una problemática en la Universidad de Nariño relacionada con la producción de residuos contaminados con Cr(VI) que se generan por las actividades de investigación de la institución y permanecen almacenados sin recibir un tratamiento.

Existen métodos fisicoquímicos para el tratamiento de estos efluentes contaminados con Cr sin embargo, son costosos, generan contaminantes secundarios y su ejecución a gran escala es difícil (Tandukar et al., 2009). Por lo tanto, a nivel mundial se investiga sobre nuevas alternativas de biorremediación como las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) de biocátodo en las cuales se emplean microorganismos para la reducción de un aceptor final de electrones (AFE) (cámara catódica) como el Cr(VI), que se reduce a Cr(III), su forma menos tóxica (Du, Li & Gu, 2007; Tandukar et al., 2009; Huang, Chai, Chen & Logan, 2011b; 2011c). Estos sistemas son valiosos porque además permiten emplear microorganismos simultáneamente para la generación de energía eléctrica a partir de la remoción de materia orgánica (ánodo) (Du et al., 2007). No obstante, existen aspectos sobre las CCMs de biocátodo que aún no han sido bien explorados como los microorganismos, su diversidad y sus procesos de sinergia, lo cual es uno de los factores que puede determinar el rendimiento de la CCM y con ello la posibilidad de utilizarlas

como alternativas en la biorremediación de metales pesados (Tandukar et al, 2009; Sun, Wei, Liang & Huang, 2012).

Con relación a las CCMs de biocátodo reductoras de Cr(VI) se conoce solo un reporte en la literatura científica en el cual se identificaron dos especies bacterianas presentes en el biocátodo de la celda (Tandukar et al., 2009); se debe profundizar en este tipo de estudios porque la diversidad de las microbiotas presentes en los biocátodos es dependiente del inóculo, del tipo de sustratos y otras condiciones aplicadas a la celda (Falcón, Lozano & Juárez, 2009; Tandukar et al., 2009; Sun et al., 2012). Estos factores implican que cada microbiota tenga atributos particulares que influyan sobre el desempeño de una CCM, como es la diversidad, definida por su composición o número de especies (riqueza) y su estructura, entendida como la abundancia relativa de cada especie (Moreno, 2001). Esto hace que su estudio e identificación mediante técnicas tradicionales de cultivo se vea limitado por lo que se recurre a metodologías moleculares como la amplificación del gen 16S rRNA y su análisis por secuenciación de última generación que provee información a cerca de las bacterias que componen una comunidad (Cabrera, 2005; Acinas, 2008; Oueriaghli, Martinez, Quesada & Béjar, 2010).

En este sentido, el Grupo de Investigación en Bioelectroquímica (BEQ - Multidisciplinario) de la Universidad de Nariño, ha venido adelantando investigaciones relacionadas con CCMs reductoras de Cr(VI), en las que ha encontrado importantes resultados cuya interpretación y análisis requiere la ampliación del conocimiento de la diversidad bacteriana asociada a la biopelícula del cátodo. De esta manera, en esta investigación se caracterizó la microbiota bacteriana del biocátodo de CCMs reductoras de Cr(VI); este tipo de estudios contribuyen al conocimiento de las bacterias asociadas a estos sistemas y a futuro permitirán evaluar sus parámetros de crecimiento con el fin de incidir en la eficiencia de las CCMs´, además permitirán incursionar en la bioprosepección de genes relacionados con la reducción de Cr(VI) y bacterias procedentes de fuentes ambientales como las aguas del río Pasto contaminadas con Cr(VI) para aprovechar su capacidad genética y metabólica en procesos biorremediación o de interés ambiental.

Teniendo en cuenta este panorama, la presente investigación tuvo por objetivo general caracterizar la microbiota bacteriana asociada al cátodo de una CCM reductora de Cr(VI) mediante secuenciación masiva 16S rRNA para lo cual se evaluó el desempeño de la celda mediante la medición simultánea de la remoción de materia orgánica, reducción de Cr(VI) y generación de energía; se estandarizó un protocolo de extracción de DNA total de la biopelícula asociada al cátodo y se analizaron secuencias parciales del gen 16S rRNA por pirosecuenciación; estos objetivos permitieron responder a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la microbiota bacteriana asociada al cátodo de una CCM reductora de Cr(VI) caracterizada mediante secuenciación masiva 16S rRNA? que se formuló partiendo de la siguiente hipótesis:

La microbiota bacteriana asociada al cátodo de una celda de combustible microbiana reductora de Cr(VI) está compuesta por diferentes taxa bacterianos.

Esta investigación constituye a nivel regional la primera investigación en hacer uso de herramientas moleculares de última generación para la caracterización bacteriana y por lo tanto es un primer aporte al conocimiento de las bacterias asociadas al biocátodo de CCMs reductoras de Cr(VI), provenientes de un ambiente propio de la región y con potencial biotecnológico para procesos de biorremediación de estos ambientes. Es importante destacar también que a nivel mundial, este estudio es el segundo en su clase, de acuerdo a la literatura revisada hasta el momento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar la microbiota bacteriana asociada al cátodo de una celda de combustible microbiana reductora de Cr(VI) mediante secuenciación masiva 16S rRNA.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Evaluar el desempeño de una CCM reductora de Cr(VI).

2.2.2 Estandarizar un protocolo de extracción de DNA total de una biopelícula asociada al cátodo de una CCM reductora de Cr(VI).

2.2.3 Analizar secuencias parciales del gen 16S rRNA generadas por un sistema de secuenciación masiva.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades y comportamiento ambiental del Cr.

El Cr es un metal de peso molecular 51,996 g/mol y número atómico 24 que pertenece al grupo VIB de la tabla periódica, físicamente es de color blanco plateado, brillante, duro, quebradizo y resistente a la corrosión (Tellez et al., 2004; Cuberos et al., 2009). Se encuentra en estados de oxidación -2 a +6, de los cuales las especies trivalente y hexavalente son las de mayor interés (Cuberos et al., 2009). El proceso de acumulación del Cr en la naturaleza inicia a partir de fuentes naturales o antropogénicas, una vez en el ambiente, el Cr se transfiere entre todo el ecosistema: aire, suelos, aguas superficiales, sedimentos y organismos (Arauzo, Rivera, Valladolid, Noreña & Cedenilla, 2003).

En estos sistemas el Cr experimenta una serie de reacciones químicas y biológicas que conllevan a procesos de especiación dependientes de factores ambientales como pH, contenido de materia orgánica, temperatura, presencia de otros iones acuosos en el medio y potencial redox (Marino, 2006; Pazos, 2007). Los compuestos más abundantes en el ambiente se derivan del Cr(III) y del Cr(VI), el Cr(III) tiende a formar diversos tipos de óxidos e hidróxidos insolubles que hacen que se precipiten y sean menos nocivos para el ambiente (Arauzo et al., 2007; Cuberos et al., 2009), pero aquellos complejos de Cr(III) solubles y móviles, tales como los que forma con el citrato, pueden oxidarse en presencia de MnO_2 formando Cr(VI) (Pazos, 2006).

Los compuestos de Cr(VI), por el contrario, son solubles y móviles en un rango mayor de condiciones ambientales dependientes del pH; tal que a pH ligeramente ácidos (6 a 6,2) pueden existir como hidrocromatos; a pH ácidos como dicromatos y a pH básico y neutro como cromatos (Arauzo et al., 2003; Prieto& Zeikus, 2008; Cuberos et al., 2009; Ramírez, Riveros, Campos & Cervantes, 2009). En medio ácido los compuestos de Cr(VI) se comportan como fuertes agentes oxidantes y son rápidamente reducidos a Cr(III) por medio de donantes inorgánicos de electrones como Fe^{2+} y S^{2-} (Pazos, 2006). La gran movilidad del Cr(VI) y su inestabilidad en el ambiente hacen que su presencia por encima de los niveles permitidos sea un riesgo para la salud pública y ambiental (Pazos, 2006; Arauzo et al., 2007; Cuberos et al., 2009).

3.1.1 Problemática del cromo hexavalente Cr(VI). Los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación, así, los derivados del Cr(III) son relativamente inocuos por su incapacidad de atravesar las membranas celulares, contrario a lo que ocurre con los derivados del Cr(VI) que pueden entrar al organismo por ingestión, inhalación o absorción cutánea (Tellez et al., 2004; Ramírez, Campos, Vargas & Cervantes, 2006). El Cr(VI) puede ingresar a la célula utilizando la vía general de los canales proteicos transportadores de aniones y puesto que es un agente con alto poder oxidativo, puede reducirse intracelularmente a nivel de mitocondrias y de núcleo generando intermediarios reactivos como el Cr(V), Cr(IV), Cr(III) y radicales libres (Tellez et al., 2004). Esto genera una fuerza oxidativa capaz de producir efectos genotóxicos ya

que estas especies son capaces de unirse a los grupos fosfato, carboxilo y sulfhidrilo de las proteínas (Ramírez et al., 2006; Prieto, León, Quijano, Fernandez, Polo, Vallejo & Sánchez, 2008). Por ello la IARC ha clasificado al Cr(VI) dentro del grupo I de sustancias cancerígenas (Tellez et al., 2004; Chang et al., 2006; Cuberos et al., 2009).

3.1.2 Usos industriales de Cr(VI). Con el crecimiento de las actividades industriales, las fuentes de contaminación del medio ambiente por Cr y otros metales han aumentado considerablemente. El Cr(VI) usualmente se deriva de industrias como metalurgia, galvanoplastia, de materiales refractarios, cromado, manufactura de pigmentos, colorantes, preparación de antisépticos, limpieza de material de vidrio de laboratorio, agente valorante y en la curtición de cueros (Molokwane, Meli & Nkhalambayausi, 2008; Prieto et al., 2008; Tandukar et al., 2009; Tellez et al., 2014). En estas industrias una fuente importante de Cr(VI) lo constituyen los dicromatos de potasio y de sodio.

Colombia no está ajena a este problema, la gravedad del mismo es mayor puesto que a nivel nacional son diversas las industrias que utilizan este metal en sus procesos y lo disponen de forma incorrecta; entre estas, la industria de cuero ha ido creciendo durante los últimos años debido a la amplia existencia de fuentes de materia prima, por lo que constituye un gran aporte al sector económico del país ocupando el decimotercer puesto en la producción mundial de pieles (Rojas, 2010). Durante el proceso de curtiembre, se utilizan sales de Cr como curtientes en las fases de curtido y terminado, las cuales introducen en la piel y reaccionan con las proteínas formando compuestos muy estables (Corredor, 2006; INE, 2007). En Nariño se concentra un 9,6% de las curtiembres existentes a nivel nacional (Alzate et al., 2004; Rojas, 2010); la mayoría de las curtiembres de la ciudad Pasto descargan sus aguas residuales en el río Pasto, con lo que aportan altas concentraciones de contaminantes de DBO, sólidos totales y metales pesados como el Cr (Alzate et al., 2004; Prieto et al., 2008), esto plantea un problema de difícil solución debido a alta solubilidad del Cr en el agua (Prieto et al., 2008).

3.1.3 Tratamiento de aguas residuales. Las metodologías convencionales para el tratamiento de residuos que contengan Cr(VI) incluyen su reducción a Cr(III) y posterior precipitación como $Cr(OH)_3$ o su remoción por intercambio iónico y adsorción (Ferro et al, 2009; Tandukar et al., 2009). Estos métodos presentan desventajas como la generación de barros químicos durante la precipitación alcalina o los altos costos del intercambio iónico y la adsorción, ya que implican el ajuste del pH y la adición de agentes reductores que producen contaminantes secundarios y muchas veces resultan ser poco específicos para remover Cr(VI) en presencia de otros iones (Ferro, Contreras &Zaritzky., 2009).

En la actualidad el uso de métodos biológicos o de biorremediación para la descontaminación de aguas residuales contaminadas con Cr(VI) es un campo emergente (Ferro et al., 2009). Se han encontrado varios géneros bacterianos con capacidad de reducir el Cr(VI) a

Cr(III), por ejemplo, del *filum Proteobacteria, Pseudomonas dechromaticans*, *Escherichia coli*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Shewanella oneidensis*, *Aeronomas dechromatica* y *Enterobacter cloacae*, además de muchas otras especies de los géneros *Bacillus y Clostridium*, que también son utilizadas como catalizadores activos electroquímicamente en sistemas de lodos activados o CCMs (Tandukar et al., 2009).

3.2 Reducción biológica del Cr(VI). La reducción del Cr(VI) a Cr(III) se ha catalogado como un mecanismo de resistencia al Cr que puede ocurrir bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas y que puede estar asociada con la membrana celular o con el citoplasma (Ramírez et al., 2006). Este proceso es llevado a cabo por diversas especies bacterianas que tienen enzimas asociadas al proceso de reducción del Cr(VI), sin embargo, sólo se han caracterizado algunas de estas. Una de las más estudiadas es la cromo reductasa ChrR de *Pseudomonas putida* que es dependiente de NADH y presenta actividad quinona reductasa (Park & Zeikus, 2000; Ramírez et al., 2006).

Hasta el momento no se ha esclarecido completamente la ruta metabólica de la reducción biológica del Cr, sin embargo, una posible ruta de reducción del cromato fue reportada por Ramírez et al. (2006) (Figura 1), donde el Cr(VI) es reducido a Cr(V) por la enzima ChrR previamente reducida por el NADH; posteriormente el Cr(V) es transformado a Cr(III) por acción de diversas biomoléculas generando especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO pueden ser eliminadas mediante mecanismos alternos tales como catalasas o peroxidasas, o por una función adicional de ChrR que consiste en que dicha enzima en estado reducido puede reducir a las quinonas (como la vitamina E o la coenzima Q10) las cuales pueden a su vez destoxificar las ERO previamente formadas.

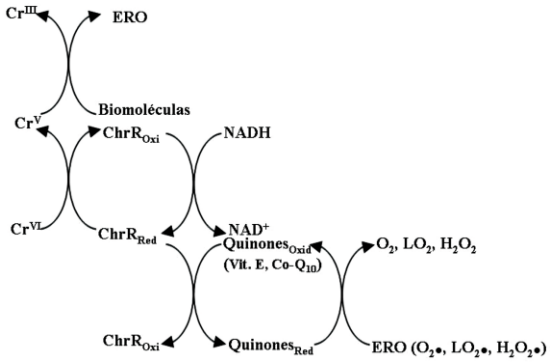


Figura 1. Reducción de Cr(VI) y mecanismo de protección por la cromato reductasa ChrR (Ramírez et al., 2006).

Son de gran interés las bacterias con capacidad de catalizar la reducción del Cr(VI) para ser utilizadas en procesos de biorremediación y descontaminar ambientes con metales pesados (Ramírez et al., 2006; Tandukar et al., 2009).

3.3 Celdas de Combustible Microbianas (CCMs). Una CCM es un biorreactor que convierte la energía química de compuestos orgánicos a energía eléctrica a través de reacciones catalíticas de microorganismos bajo condiciones anaeróbicas (Chang et al., 2006; Du et al., 2007). Las CCMs se operan únicamente a escala de laboratorio y generalmente en modo Batch, con un medio químicamente definido y suplementado con una única fuente de carbono, como glucosa o acetato en la cámara anódica (Du et al., 2007). Existen dos tipos de CCMs, de compartimento único y de doble compartimento. Las CCMs de único compartimento sólo poseen una cámara anódica conectada a través de un circuito externo a un electrodo expuesto directamente al aire donde el oxígeno actúa como AFE (Park & Zeikus, 2002).

Las CCMs de doble cámara se componen de cámaras anódica y catódica las cuales están conectadas a través de un circuito externo que permiten el flujo de electrones desde el ánodo hacia el cátodo y se encuentran aisladas a través de un separador (Chang et al., 2006). Entre las CCMs de doble compartimiento están las CCMs de cátodo abiótico que utilizan la catálisis química para la reducción del AFE que puede ser el oxígeno o un compuesto químico diferente y las CCMs de cátodo biótico o biocátodo que utilizan microorganismos como catalizadores estables electroquímicamente para la reducción de AFE (Du et al., 2007).

3.3.1 Funcionamiento de una CCM de biocátodo. La cámara anódica de la CCM contiene un electrodo, denominado ánodo, al cual se adhieren microorganismos electrogénicos activos que son capaces de oxidar un sustrato (Chang et al., 2006; Du et al., 2007; Falcón et al., 2009; Lovley & Nevin, 2011). En este proceso se generan electrones y protones, los protones son transferidos a la cámara catódica a través del separador mientras que los electrones fluyen desde el ánodo hacia el cátodo a través de un circuito externo para reducir un AFE mediante microorganismos electrótrofos que se encuentran adheridos al cátodo de la cámara catódica (Chang et al., 2006; Du et al., 2007). A continuación se presentan las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en los electrodos de una CCM usando como sustrato al acetato y como AFE al Cr(VI) (Du et al., 2007; Wang, Huang & Zhang, 2008).

Reacción Ánodo: $CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 7H^+ + 8e^-$

Reacción Cátodo: $Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O$

Los materiales con los que se construyen los electrodos deben ser conductivos, biocompatibles y químicamente estables en el medio acuoso del reactor (Sacco, Bonetto & Cortón, 2008). El material más versátil es el carbón, disponible como placas de grafito compacto, barras, gránulos o fibra, sin embargo, los más utilizados son las placas y las barras de grafito ya que son relativamente baratas, fáciles de manejar y tienen un área de contacto definida donde se adhieren fácilmente los microorganismos (Lovley, 2008; Sacco et al., 2008). Las dos cámaras deben mantenerse en condiciones anaerobias de manera que sea posible asegurar la transferencia

de electrones desde los microorganismos al ánodo en la cámara anódica y del cátodo hacia los microorganismos en la cámara catódica y no hacia otro AFE (Du et al., 2007).

Tanto el ánodo como el cátodo son introducidos en las cámaras respectivas de la CCM, y estas se encuentran separadas físicamente a través de un separador que previene que las soluciones anódica y catódica se mezclen y que permite la transferencia de ciertos iones como protones, aniones o cationes desde la cámara anódica hacia la cámara catódica (Yu, Park & Li, 2014). La ausencia del separador podría incrementar la difusión de oxígeno y sustrato entre las dos cámaras y disminuir la eficiencia coulómbica y la actividad bioelectrocatalítica de los microorganismos del ánodo (Li, Sheng, Liu & Yu, 2010).

Los separadores pueden clasificarse de acuerdo con sus características de filtración en: membranas de intercambio de iones, separadores selectivos de tamaño y puente salino (Li et al., 2010). Los más utilizados son la membrana de intercambio protónico (MIP) y el puente salino (Min, Cheng & Logan, 2005; Li et al., 2010). La MIP es una membrana de ácido perfluorosulfónico que únicamente transfiere protones; la más común es la Nafion que presenta alta conductividad de diversos cationes debido a la presencia de grupos hidrofílicos sulfonatos (SO^{3-}) cargados negativamente y a su estructura molecular que permite la absorción de agua y la conducción selectiva de iones de carga positiva (Li et al, 2010). Por su parte, el puente salino que contiene una solución de electrolitos inertes, tales como KCl o buffer fosfato, permiten la conducción de iones y una matriz de agar al 10% que evita la mezcla de las soluciones anódica y catódica (Min et al., 2005). Comparado con la membrana Nafion, el puente salino es más simple y barato, pero presenta mayor resistencia interna R_i (Li et al., 2010).

3.3.2 Aplicaciones de las CCMs de biocátodo. La CCMs son sistemas aplicables al tratamiento de aguas residuales con altas cargas de materia orgánica que pueden ser oxidadas por los microorganismos del bioánodo para la producción de energía renovable (Oh & Logan, 2005; Du et al., 2007; Falcón et al., 2009; Oliveira, Simoes, Melo & Pinto, 2013) (Figura 2). El biocátodo de las CCMs se ha considerado una alternativa de biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados y productos industriales como ferrocianuro, NO^{3-}, cloroetanos, 2-clorofenol, ClO^{4-}, U(VI), CO_2 y Cr(VI) (Bullen, Arnot & Lakeman, 2006; Falcón et al., 2009; Tandukar et al., 2009; Huang et al., 2011b, 2011c), debido a que estos pueden actuar como AFEs en el metabolismo microbiano y reducirse a compuestos menos tóxicos (He & Angenent, 2006; Du et al., 2007). La aplicación de estas técnicas ha sido probada en numerosos sistemas, pero la viabilidad y actividad metabólica de los microorganismos todavía sigue siendo un factor limitante para su escalamiento (Cheung & Gu, 2007).

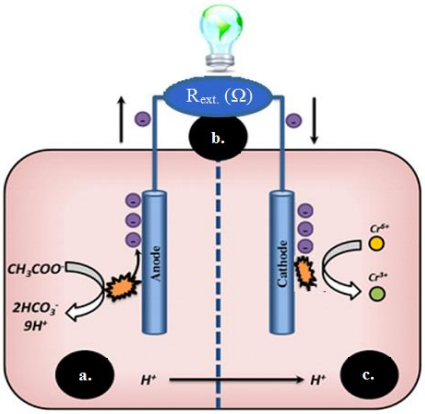


Figura 2. Aplicaciones de una CCM de biocátodo: a. Remoción de materia orgánica; b. generación de energía; c. Reducción de Cr(VI). Modificada de Xafenias et al. (2014).

Las CCMs de biocátodo con un AFE diferente del oxígeno resultan ser más ventajosas que las CCMs de cátodo abiótico ya que no requieren catalizadores metálicos o artificiales, lo que hace que el costo de construcción y operación se reduzca (He & Angenent, 2006). Además los biocátodos son sistemas sostenibles puesto que evitan problemas de contaminación con metales como el platino que suele ser utilizado como electrodo (Du et al., 2007; Jeremiass, Hamelers & Buisman, 2009; Huang et al., 2011a). Pese a ello, el escalamiento de estos sistemas se ha visto limitado por el desconocimiento de la viabilidad y actividad metabólica de los microorganismos (Cheung & Gu, 2007).

3.3.3 Evaluación del desempeño de una CCM de biocátodo. Teniendo en cuenta las diferentes aplicaciones de una CCM de biocátodo (Du et al., 2007; Revelo, Hurtado & Ruiz, 2013), es pertinente evaluar su desempeño con base en su eficiencia eléctrica, capacidad de remover materia orgánica y de biorremediar contaminación por metales pesados como el Cr(VI) (Figura 2). Para ello se han aplicado metodologías estándar como las que se describen a continuación:

3.3.3.1 Demanda química de oxígeno - DQO. La DQO, expresada en mgO_2/L, es la cantidad de oxígeno necesario para descomponer químicamente la materia orgánica de una muestra (Burgos, 2012). Este es un método que se basa en la tendencia de las sustancias orgánicas a oxidarse en presencia de oxidantes fuertes (Chang, Jang, Gil, Kima, Cho & Kim, 2003; Sánchez, Herzing, Peters, Márquez & Zambrano., 2007; Burgos, 2012). El método colorimétrico del dicromato es uno de los más aceptados para el análisis de muestras ya que ofrece resultados más precisos y confiables. En este, el dicromato oxida la materia orgánica, por lo que el Cr(VI) se reduce a Cr(III) y la cantidad de este último es proporcional a la cantidad de materia orgánica oxidada. La concentración de DQO se calcula determinando la absorbancia del Cr(III) a 600 nm e interpolándola en una curva de calibración estándar (O'Dell, 1993; León, 2009; Burgos, 2012).

3.3.3.2 Determinación de Cr(VI). Una de las técnicas más aplicadas en la determinación de la concentración de Cr(VI) es la espectrofotometría UV-VIS debido a su alta sensibilidad. Esta se basa en la ley de Beer que explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y su concentración. El fundamento del método se centra en la reacción redox que ocurre entre el Cr(VI) con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido en la que el Cr(VI) se reduce a Cr(III) y la difenilcarbazida se oxida a difenilcarbazona. Este compuesto presenta una coloración rojo-violeta que absorbe a una longitud de onda máxima de 543 nm a partir de la cual se puede determinar la concentración de Cr(VI) (Severiche & Gonzáles, 2013).

3.3.3.3 Parámetros electroquimicos. El desempeño eléctrico de una CCM se evalúa a través de la densidad de potencia (DP) y la eficiencia coulómbica (EC) que se calculan a partir del voltaje (V) que se mide en la resistencia externa (Alzate, Fuentes & Álvarez, 2008). La DP es la potencia generada por unidad de área del electrodo (Alzate et al., 2008). La EC relaciona la producción teórica de carga que se da en la CCM con respecto a la producción real de la misma, la se cual puede calcular a través de la DQO en la cámara anódica (Alzate et al., 2008; Luo et al., 2010).

Cabe resaltar que la DP y la EC dependen de la R_i de la CCM; en un circuito eléctrico, la resistencia es la oposición al flujo de electrones, por lo tanto, la R_i de la CCM hace referencia a todos los factores y fenómenos que impiden que los electrones alcancen el ánodo; entre los factores se puede mencionar el tipo de separador, si este es eficiente facilita la conducción de iones de la cámara anódica a la catódica dejando electrones libres que pueden ser captados por el ánodo, de igual manera otros factores incidentes son el área del electrodo o la distancia entre electrodos, mientras que entre los fenómenos que afectan la Ri están la presencia de AFEs en la cámara anódica lo cual impedirá que los electrones lleguen al ánodo o rutas metabólicas que no aportan directamente electrones.

3.4 Microorganismos de las CCMs.

3.4.1 Microorganismos asociados al ánodo y transferencia de electrones. Los microorganismos son el núcleo de las CCMs (Sun et al., 2012). En la cámara anódica los microorganismos electrogénicos transfieren electrones hacia el ánodo, proceso en el que influyen factores como las vías metabólicas, sustrato y potencial del ánodo (Revelo et al., 2013). Un avance importante en la comprensión de este aspecto fue el hallazgo de que sustratos no fermentables como el acetato son oxidados a CO_2 y generan electrones, los cuales se transfieren al ánodo, que actúa como AFE en una variante del proceso de respiración celular (Lovley, 2011).

La transferencia de electrones en el cátodo puede ocurrir directamente o a través de mediadores (Huang et al., 2011a; Lovley & Nevin, 2011). La transferencia directa requiere contacto entre la membrana celular y el ánodo; este mecanismo se ha estudiado ampliamente en géneros como *Geobacter, Shewanella y Rhodoferax* (Chang et al., 2006; Du et al., 2007;

Debabov, 2008; Falcón et al., 2009; Lovley et al., 2011). Por otra parte, la transferencia de electrones a través de mediadores no requiere contacto físico entre la membrana celular y el ánodo (Huang et al., 2011a). Los mediadores son compuestos de alto coeficiente de difusión, con capacidad para realizar repetidos ciclos redox y transferir electrones; pueden ser producidos por los microorganismos (mediadores endógenos) como se han reportado en *Pseudomonas aeruginosa* o pueden ser exógenos, es decir agregados al medio, como se ha reportado para *Desulfovibrio desulfuricans, E. coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris* y *Pseudomonas fluorescens* (Bullen et al., 2006; Du et al., 2007).

3.4.2 Microorganismos asociados al cátodo y transferencia de electrones. En la cámara catódica, la transferencia de electrones ocurre desde el cátodo hacia los microorganismos; estos son denominados electrótrofos por su capacidad para recibir electrones desde el electrodo (Lovley & Nevin, 2011; Hensley, Vargas & Franks, 2012). Al igual que en la cámara anódica, la transferencia puede ser directa e indirecta. En la transferencia directa los citocromos u otras moléculas de la membrana externa reciben los electrones provenientes del cátodo, como por ejemplo en *Geobacter* y *Shewanella* para reducir compuestos como fumarato, nitrato, U(VI) o Cr(VI) (Du et al., 2007; Lovley, 2008; Huang et al., 2011a; Lovley, 2011).

La transferencia indirecta también se lleva a cabo con mediadores (Lovley, 2011) que pueden ser endógenos en el caso de *Acinetobacter calcoaceticus* (Keller, 2008; Rabaey, Clauwaert, Freguia, Bond, Blackall, 2008) o exógenos como en el caso de *Dechloromonas agitata, D. aromatica* y *Azospira suillum* (Huang et al., 2011a). El estudio de los mecanismos de transferencia es importante ya que este permitiría aclarar el funcionamiento de las CCMs para mejorar su eficiencia (Falcón et al., 2009).

3.5 Biopelícula asociada a los electrodos de una CCM.

Las biopelículas son agregados de una serie de microorganismos (10-25%) que se encuentran conectadas a superficies bióticas o abióticas por medio de exopolisacáridos (EPS) (75-90%); una biopelícula madura puede contener del orden de 10^{16} células por m^3, su diversidad microbiológica va desde los virus hasta complejos organismos multicelulares con orgánulos especializados, siendo las bacterias los organismos más dominantes en la mayoría de las biopelículas (Rodriguez, 2013). La biopelícula se conforma por los microorganismos presentes en el inóculo empelado y está influenciada por la disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH (Bond, Holmes, Tender & Lovley, 2002; Rabaey et al., 2008; Rodriguez, 2013). Este proceso es una estrategia adaptativa de los microorganismos que les permite incrementar sus posibilidades de supervivencia, puesto que les brinda protección, comunicación y cooperación (Betancourth, Botero & Rivera, 2004; Rodriguez, 2013). El crecimiento de la biopelícula es un proceso con varias etapas que involucran la unión celular a una superficie sólida seguida por la adhesión a la

superficie mediante EPS, proliferación, maduración y finalmente la dispersión de las células (Ahmed & Kim, 2011).

Estos sistemas biológicos han sido utilizados para la biorremediación de efluentes contaminados con metales pesados (Vilchez, 2005; Rodriguez, 2013), sin embargo, las biopelículas que se asocian a los electrodos de una CCM han sido poco estudiadas (Huang et al., 2011b). En relación a esto se conoce que el espesor y el grado de formación y adaptación de la biopelícula afectan la eficiencia del sistema, siendo que una biopelícula poco desarrollada generada por cultivos puros produce valores bajos de corriente, mientras que biopelículas generadas a partir de cultivos mixtos producen mejores resultados (Rabaey & Verstraete, 2005; Rabaey et al., 2008; Erable et al., 2010; Huang et al., 2011a). Esto puede explicarse porque en los cultivos mixtos ocurren procesos sinérgicos que aumentan el desempeño de la CCM (Erable et al., 2010).

La sinergia es la asociación o dependencia de dos o más tipos diferentes de organismos que combinan sus capacidades metabólicas para catabolizar un sustrato que no puede ser catabolizado de manera independiente (Rabaey & Verstraete, 2005; Chang et al., 2006; Lovley & Nevin, 2011). El uso de consorcios microbianos, donde ocurren procesos sinérgicos, es importante para procesos a escala industrial de las CCMs puesto que en estas se utilizan sustratos complejos que deben ser degradados a través de la cooperación de varios organismos (Chang et al., 2006; Lovley & Nevin, 2011).

Es importante identificar las especies de la comunidad bacteriana que intervienen en la conversión de sustratos a corriente eléctrica ya que esto permitiría la selección de consorcios bacterianos adecuados y adaptados a las condiciones del sistema, la optimización biológica de la CCM, mayores tasas de transferencia de electrones y un mejor desempeño del sistema (2005; Chang et al., 2006; Erable et al., 2010; Kiely, Rega & Logan, 2011; Huang et al., 2011a; Lovley et al., 2011; Rabaey & Verstraete, 2005). Por tanto, profundizar en el conocimiento de la ecología microbiana de diferentes comunidades es de gran utilidad e importancia para la potencial aplicación de las CCMs (Bond et al., 2002, Du et al., 2007).

3.6 Caracterización de comunidades microbianas

En los procesos de biorremediación de aguas residuales es posible explotar el potencial genético y metabólico de agentes biológicos como microorganismos; no obstante, muchos estudios se han realizado con microorganismos aislados y cultivados en el laboratorio, pese a que sólo una porción muy pequeña (menor al 1%) es cultivable (Cabrera, 2005). Para estudiar comunidades microbianas, se han aplicado técnicas moleculares basadas en la amplificación por PCR y la secuenciación de marcadores moleculares a partir del DNA metagenómico (Acinas, 2008; Oueriaghli et al., 2010).

El gen 16S rRNA de la subunidad menor del ribosoma bacteriano se ha utilizado ampliamente como marcador para la caracterización microbiana (Acinas, 2008; Oueriaghli et al., 2010). Este gen contiene aproximadamente 1500 pb y nueve regiones variables intercaladas con regiones conservadas, las cuales se han empleado para estudiar la diversidad bacteriana (Bibby, Viau & Peccia, 2010). El uso de este gen como marcador molecular resulta ventajoso porque está presente en todos los organismos procariotas y tiene la misma función en todos ellos, la longitud de su secuencia tiene el tamaño adecuado para proporcionar suficiente información, su análisis permite realizar reconstrucciones filogenéticas y al poseer varias regiones con distinto grado de variabilidad, permite realizar estudios a diferente nivel de resolución (Gaona, Garza, Rodríguez & Martínez, 2013); las regiones hipervariable V1 – V3, por ejemplo, han permitido realizar estudios con alta resolución taxonómica, según lo reporta Lu et al. (2012); Zhang et al. (2012); Wang et al. (2013).

3.6.1 Métodos de secuenciación masiva. Se han desarrollado técnicas, denominadas tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), que permiten la obtención masiva de secuencias de marcadores moleculares para el estudio de comunidades microbianas, una de ellas es la pirosecuenciación y en los últimos años ha sido ampliamente utilizada para estudiar la composición de comunidades bacterianas de diferentes muestras (Acinas, 2008). Las ventajas que ofrece esta técnica es su aplicabilidad a gran escala en genomas completos y que a diferencia del sistema de Sanger que es capaz de resolver 67.000 bases cada hora, el método de pirosecuenciación puede determinar la secuencia de 20 millones de bases en 4,5 horas, lo cual reduce considerablemente el coste del proceso (Acinas, 2008).

La pirosecuenciación comienza con productos de PCR correspondientes a fragmentos de DNA a los cuales se les ha adicionado un adaptador y un código de barras en los extremos. Estos fragmentos se mezclan con esferas de agarosa, cuya superficie tiene adheridos oligonucleótidos complementarios al adaptador para que los fragmentos puedan unirse a las esferas. Cada complejo fragmento-esfera es aislado en micelas individuales de agua y aceite que contienen los reactivos necesarios para llevar a cabo una PCR en emulsión, luego estos se colocan en una placa de picotitulación para monitorear la reacción de secuenciación. Después se adicionan esferas que contienen el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. La placa actúa como una celda de flujo dentro de la cual cada una de las soluciones de los nucleótidos puros es adicionada y se proyecta una imagen después de la incorporación de cada nucleótido (Zorro, 2011).

Las reacciones dentro de la placa inician con la adición de un dNTP catalizada por la DNA-polimerasa, lo que libera pirofosfato en una cantidad equimolar a la del de nucleótido incorporado, luego la ATP-sulfurilasa convierte al pirofosfato en ATP y este media la transformación de la luciferina en oxiluciferina, reacción catalizada por la luciferasa; la oxiluciferasa genera luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP que es

detectada por un dispositivo de carga que genera un picograma. Finalmente, la apirasa degrada los nucleótidos no incorporados y el ATP, cuando la degradación es completa se adiciona otro nucleótido (Zorro, 2011).

4. METODOLOGÍA

4.1 Configuración y operación de las CCMs.

4.1.1 Configuración de las CCMs. Se emplearon dos CCMs, una comercial fabricada por WALTER VELASCO ABAD que se operó por primera vez en este estudio (CCM-H) y otra diseñada en el grupo BEQ y empleada en previas investigaciones (CCM-PS). En estas dos celdas se evaluó el desempeño en relación a la reducción del Cr(VI), la remoción de materia orgánica y la generación de energía.

La CCM-H (Figura 3a) consistió en una celda de doble cámara conformada por dos frascos de vidrio de 0,3 L de capacidad, unidos por un flanche central en el que se ubicó un separadorque consiste en una MIP Nafion® 117 de espesor 0,007 pulgadas, previamente preparada según instrucciones del fabricante. En cada cámara se ubicaron los electrodos de barras de grafito de 11,5 cm de largo y 0,7 cm de diámetro y un lecho de 3 cm por 4,5 cm para un área total de superficie de electrodo de 46 cm^2. La distancia entre el ánodo y el cátodo fue de 13 cm y estos se conectaron a través de un circuito externo utilizando una resistencia de 500 Ω conectada a un Sistema electrónico de Adquisición de Datos (SAD) (Figura 3c) diseñado por el Grupo de Investigación en Bioelectroquímica. Para determinar las condiciones de operación de esta celda se realizaron ensayos exploratorios en los que se probaron diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos de acuerdo a lo indicado en el Anexo 1.

La CCM-PS (Figura 3b) consistió en una celda rectangular de acrílico dividida en dos compartimentos con volumen de trabajo de 0,3 L cada uno, separados mediante un puente salino (agar al 1,5% y solución de electrolitos de KCl 0,25 M). Como electrodos se usaron barras de grafito granular de 7 cm de largo y 0,7 cm de diámetro y un lecho de grafito de 6,6 cm de largo y 6 cm de ancho. El área de los electrodos junto con el lecho de grafito para cada cámara fue 45 cm^2. La distancia entre el ánodo y el cátodo fue de 5 cm y estos se conectaron a través un circuito externo usando una resistencia de 500 Ω (Figura 3c). Esta celda fue operada bajo condiciones similares a la CCM-H.



Figura 3. Operación y configuración de las CCMs: a. Celda de combustible microbiana tipo H (CCM–H); b. Celda de combustible microbiano rectangular (CCM–PS); c. Sistema de Adquisición de Datos – SAD.

4.1.2 Microorganismos empleados en las CCMs y aclimatación. El inóculo de la cámara anódica proviene de lodos anaerobios recolectados de la laguna de igualación del relleno sanitario Antanas del municipio de Pasto (RSA) ubicado a 13 kilómetros de la ciudad de Pasto, sobre la variante Daza - Buesaco, en la vereda de Josefina corregimiento de Morasurco (Figura 4a). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante el tiempo de ejecución de los ensayos exploratorios de este estudio.

El inóculo de la cámara catódica fue agua del río Pasto donde son derramados los efluentes de la zona de curtiembres de la ciudad de Pasto (N 01° 13’ 55,3”; W 077° 17’ 23,8’’; 2428 msnm) (Figura 4b). Se recolectó una muestra de 2 L mediante un muestreo simple y se almacenó

en recipientes plásticos a temperatura ambiente. Tanto la cámara anódica como la catódica fueron inoculadas al 10% en un volumen total de 300 mL.



Figura 4. Recolección de muestras para inóculos de las CCMs: a. Laguna de igualación del Relleno Sanitario Antanas; b. Desague del río Pasto.

La aclimatación de los microorganismos del ánodo y del cátodo se realizó en un medio de aguas residuales sintéticas propuesto por Huang et al. (2011) y Cha et al. (2010) respectivamente. Una vez se formó la biopelícula en cada electrodo, se transfirió a su respectiva cámara en la celda para iniciar el proceso de aclimatación y esta se selló herméticamente para asegurar condiciones estrictas de anaerobiosis.

4.1.3 Medios de cultivo para las cámaras anódica y catódica. El medio de cultivo para las cámaras catódicas se preparó de acuerdo a lo propuesto por Huang et al. (2010) cuya composición de macronutrientes fue (g/L): KH_2PO_4, 4,4; K_2HPO_4, 3,4; $NaHCO_3$, 1,0; NH_4Cl, 1,3; KCl, 0,78; $CaCl_2$, 0,0146; NaCl, 0,5 y 1,0 mL de la solución de elementos traza propuesta por Rabaey et al. (2005) con la siguiente composición por litro: $FeSO_4.7H_2O$ 1g; $ZnCl_2$ 70 mg; $MnCl_2.4H_2O$ 100 mg; H_3BO_3 6 mg; $CaCl_2.6H_2O$ 130 mg; $CuCl_2.2H_2O$ 2 mg; $NiCl_2.6H_2O$ 24 mg; $Na_2Mo_4.2H_2O$ 36 mg; $CoCl_2.6H_2O$ 238 mg. Se utilizó Cr(VI) como AFE, el cual se suplementó en el medio con 61,3 ppm de $K_2Cr_2O_7$. El medio utilizado en las cámaras anódicas fue el propuesto por Cha et al. (2010) cuya composición fue (g/L): KH_2PO_4, 8,2; K_2HPO_4, 7,0; NH_4Cl, 0,1; $NaHCO_3$, 0,2; $MgSO_4$; 0,01 y acetato 0,1M como fuente de carbono. Cabe mencionar que el lodo anaerobio utilizado como inóculo, aportó un 8% de materia orgánica a la solución anódica, el cual se incluye en el análisis de DQO realizado al inicio y al final del tiempo de operación de las celdas, como se explicará más adelante. Las sales KH_2PO_4, K_2HPO_4 y $NaHCO_3$ fueron empleadas en las dos cámaras como amortiguadores de pH.

4.1.4 Parámetros de evaluación del desempeño de las CCMs

4.1.4.1 Parámetros electroquímicos. Las celdas se operaron en circuito abierto, es decir sin resistor externo, hasta que el voltaje se estabilizó**.** Una vez estable, se cerró el circuito y se

registró el voltaje cada 10 minutos mediante el SAD. Con base en estos datos se determinaron los parámetros electroquímicos: DP y EC. El tiempo de operación fue hasta que se observó que la solución catódica adquirió un color azul que indica la ausencia de $K_2Cr_2O_7$ en la solución (Figura 5).

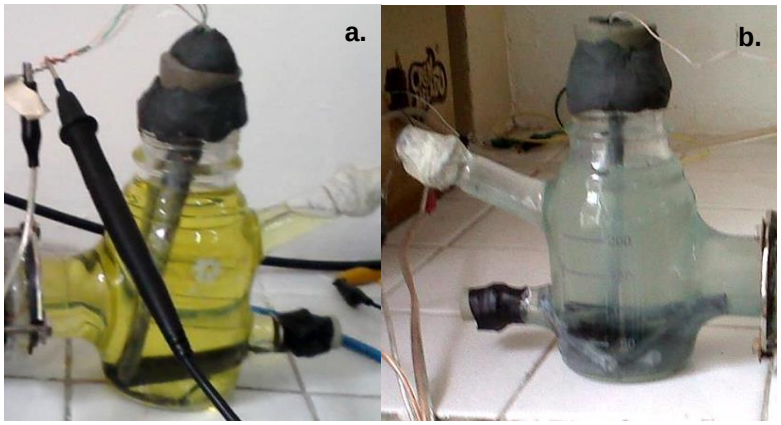


Figura 5. Determinación del tiempo de operación de la CCM-H mediante la observación del cambio de color en la cámara catódica: a. Solución catódica al inicio del tiempo de operación; b. Solución catódica al final de tiempo de operación.

La corriente I en amperios (A) se obtuvo mediante la ley de Ohm como I= V/R, donde V es el voltaje en voltios (V) y R es la resistencia externa (Ω); esta se utilizó para calcular la potencia P en vatios (Watts) medida como P= I×V. La densidad de potencia DP se determinó mediante la expresión matemática DP= P/área del electrodo (cm^2) (Alzate et al., 2008; Sun et al., 2012). Esta se calculó utilizando la potencia generada con el voltaje inicial (DP inicial) y el máximo voltaje durante el tiempo de operación (DP durante el tiempo de operación).

La EC se calculó de acuerdo con lo descrito por Luo et al. (2010), con la siguiente expresión matemática:

$$EC = 100\% \frac{\sum_{i=1}^{n} U_i t_i}{RFb\Delta SV} \; M = 100\% \frac{EM}{Fb\Delta SV}$$

Donde EC es la eficiencia columbica, E es el número columbico (carga columbica real calculada integrando el área bajo la curva en una gráfica de corriente versus tiempo de operación) (Anexo 2), M es el peso molecular del oxígeno (32 g/mol), F es la constante de Faraday (96,485 C/mol de electrones), b es el número de moles de electrones producidos por mol de DQO (24 moles e-/mol DQO), ΔS es la concentración de remoción de DQO (g/L), la cual incluye la concentración de materia orgánica que aporta el lodo utilizado como inóculo y V es el volumen del líquido de la cámara catódica (L).

4.1.4.2 Parámetros analíticos de las CCMs.

4.1.4.2.1 Demanda química de oxígeno - DQO. El porcentaje de remoción de materia orgánica se determinó mediante el cálculo de DQO. Para ello, se tomó una muestra de 2ml al inicio y al final del tiempo de operación de cada celda. Las muestras se analizaron siguiendo el método de DQO estandarizado por los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño (O'Dell, 1993) que consistió en agregar 3,5 mL de solución catalizadora y 1,5 mL de solución oxidante a 2,5 mL de la muestra a analizar. Se realizó la digestión en un termorreactor a 150°C durante 2 horas y se leyó absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer) utilizando como blanco una solución preparada de la manera descrita anteriormente pero remplazando la muestra por agua desionizada. El cálculo de la DQO se realizó utilizando la fórmula de regresión y = mx + b obtenida a partir de la curva de calibración (Anexo 3) previamente elaborada (y = 0,0003X + 0,0176; r = 0,9971), el método fue validado por el grupo BEQ (Fajardo, 2014 & López, 2014).

4.1.4.2.2 Reducción de Cr(Vl). Se utilizó el método colorimétrico de 1,5-difenilcarbazida para cuantificar la concentración de Cr(VI) en la cámara catódica al inicio y al final del tiempo de operación de cada celda. El método consistió en agregar 2,5 mL de ácido sulfúrico y 4 a 5 gotas de ácido fosfórico a 2 mL de muestra, hasta llevarla a un pH de 1,3 +/-0,3 y posteriormente se agregó 2,5 mL de solución 1,5-difenilcarbazida para observar la formación del complejo rojo-violeta en la muestra. Una vez se obtuvo este color se midió la absorbancia de la solución a 543 nm en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo) utilizando como blanco una solución preparada con todos los reactivos anteriormente mencionados excepto la muestra a evaluar. Finalmente los datos obtenidos se reemplazaron en la ecuación de regresión lineal y=mx + b obtenida a partir de una curva de calibración (Anexo 4) previamente elaborada (y = 0,677X + 0,0052; r=0,9976), el método fue validado en el grupo BEQ (López, 2014).

4.2 Estandarización del protocolo de extracción de DNA de la biopelícula del cátodo.

4.2.1 Obtención de la biopelícula. El biocátodo de cada ensayo se lavó varias veces con buffer fosfato salino (8,0 g/L NaCl; pH 7,3) para eliminar bacterias poco adheridas (Cristiani, Franzetti, Gandolfi, Guerrini & Bestetti, 2012; Sun et al., 2012) y con un bisturí estéril se retiró cuidadosamente toda la biopelícula (raspado) (Tandukar et al., 2009; Beecroft et al., 2012; Cristiani et al., 2012).

4.2.2 Ensayos de estandarización del protocolo de extracción de DNA. El DNA total se extrajo a partir de biopelículas de cátodos aclimatados como se describió anteriormente. Previo a los ensayos de estandarización se probaron los kits de extracción de DNA: Soil DNA Isolation (Norgen Biotek Corporation) y PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posteriormente se variaron las cantidades de la

biopelícula para conocer que efecto podía tener esto sobre la concentración del DNA extraído. Luego se empleó el kit PowerSoil DNA Isolation con modificaciones realizadas sobre el siguiente protocolo dado por el fabricante:

1. Añadir 0,25 g de muestra a un tubo Power Bread.
2. Agitar utilizando un vórtex.
3. Revisar que la solución C1 no presente precipitados, en caso contrario, calentar a 60°C hasta disolverlos completamente.
4. Adicionar 60 µl de la solución C1 y mezclar por vórtex durante 10 s.
5. Agitar por vortex a máxima velocidad durante 10 min.
6. Centrifugar a 10250 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Este y los demás pasos que requieren centrifugación se realizaron empleando una centrífuga con un diámetro del cilindro de 17 cm.
7. Transferir 400 µl del sobrenadante a un tubo de colección de 2ml.
8. Adicionar 250 µl de la solución C2, agitar en vortex por 10 s. Inmediatamente incubar a 4 °C (en baño hielo) por 5 min.
9. Centrifugar a temperatura ambiente por 1 min a 10250 rpm.
10. Teniendo cuidado de no tocar el pellet, transferir 600 µl del sobrenadante a un tubo de colección de 2 ml.
11. Añadir 200 µl de la solución C3 y agitar en vortex cuidadosamente. Incubar a 4 °C (baño hielo) por 5 min.
12. Centrifugar a temperatura ambiente por 1 min a 10250 rpm.
13. Transferir 600 µl del sobrenadante a un tubo de colección de 2 ml.
14. Adicionar 1200 µl de la solución C4 al sobrenadante y mezclar en vortex por 10 s.
15. Tomar aproximadamente 675 µl del sobrenadante y transferir a un tubo Spin Filter, centrifugar por 1 min a 10250 rpm, descartar el líquido que pasa a través de la columna y cargar nuevamente el sobrenadante restante (este paso se repite tres veces).
16. Adicionar 500 µl de solución C5 a la columna y centrifugar a temperatura ambiente por 30 s a 10250 rpm.
17. Descartar el líquido que pasa a través de la columna.

18. Centrifugar a temperatura ambiente a 15000 rpm por 1 min.

19. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección de 2 ml.

20. Adicionar 100 µl de solución C6 sobre el filtro.

21. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 s a 10250 rpm.

22. Descartar el filtro y conservar a -20°C el sobrenadante (DNA extraído).

A partir de este protocolo se realizaron 3 ensayos de extracción en los cuales solo se variaron el tiempo de centrifugación y de vórtex (Tabla 2), manteniendo los demás parámetros iguales en los tres ensayos, incluyendo la cantidad de la muestra que fue extraída a partir de varios electrodos de grafito (0,53 g) y dividida en tres partes iguales.

Tabla 1. Ensayos de estandarización del protocolo de extracción de DNA variando tiempo de centrifugación y vórtex empleando el kit PowerSoil DNA Isolation*.

Paso	Ensayos		
	1	2	3
2 (Vórtex)	30 s	1 min	2 min
5 (Vórtex)	5 min	10 min	15 min
6 (Centrifugación)	10250 rpm por 30 s	10250 rpm por 1 min	10250 rpm por 2 min
8 (Vórtex)	5 s	10 s	15 s
9 (Centrifugación)	10250 rpm por 30 s	10250 rpm por 1 min	10250 rpm por 2 min
14 (Vórtex)	5 s	10 s	15 s

* El ensayo 2 corresponde a las condiciones dadas por el fabricante del kit.

4.2.3 Valoración y cuantificación del DNA. La calidad del DNA extraído con cada uno de los ensayos propuestos se valoró en geles de agarosa al 0,8% (TBE 0,5X), teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador LabNet, GENTECH y fotografiados con una cámara digital. Se determinaron como mejores condiciones de corrida 1 hora a 80 V. Como control positivo se utilizó DNA disponible en el laboratorio de biología molecular y extraído de *Phytophthora infestans*, que permitió valorar las condiciones de corrida de DNA en un gel y como control negativo se utilizó agua miliQ. Para estimar cualitativamente la concentración del DNA, se utilizó DNA del fago Lambda (Fermentas) a las concentraciones de 5, 10, 15, 25 y 50 ng/uL y se utilizó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100pb (Thermo Scientific). Posteriormente, se escogió el protocolo de extracción con el cual se obtuvo el DNA de mejor calidad, visualizada a través de los geles de agarosa.

4.2.4 Extracción del DNA total de la biopelícula del cátodo de las CCMs. Las biopelículas adheridas al cátodo de la CCM-H y CCM-PS se muestrearon al final de su respectivo tiempo de operación. La extracción del DNA se realizó utilizando el protocolo escogido y la calidad y

concentración del DNA obtenido se verificó en geles de agarosa. Cuando fue requerido, se realizó un tratamiento con RNAsa agregando 0,03 ng/uL durante 2 horas a 37°C. El DNA total obtenido a partir de cada celda (Muestra 1: CCM-H y Muestra 2: CCM-PS) fue conservado a –20°C en el buffer de elución del kit y una muestra de 50 uL se envió para secuenciación al laboratorio Molecular Research DNA – MR DNA (www.mrdnalab.com, Texas, USA).

4.3 Análisis bioinformático de secuencias parciales del gen 16S rRNA generadas por el sistema de secuenciación masiva.

4.3.1 Amplificación y secuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA. De acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio MR DNA se llevó a cabo una PCR modificada a partir de Dowd et al. (2008) para la amplificación de las regiones hipervariables V1-V3 del gen 16S rRNA (Chakravorty, Helb, Burday, Connell & Alland, 2007; Guo, Ju, Lin & Zhang, 2012; Lu et al., 2012), con primers universales (27F - 519R), esta PCR consistió de 32 ciclos empleando el kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Valencia, CA), bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos; seguidos de 28 ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto; después de lo cual se hizo un paso de elongación final a 72°C por 5 minutos; posteriormente todos los productos de PCR obtenidos a partir de las Muestras 1 y 2 fueron mezclados en iguales concentraciones y purificados usando perlas Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) y las muestras fueron secuenciadas utilizando reactivos e instrumentos de titanio Roche 454 FLX siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.2 Edición de secuencias y Operational Taxonomic Units - OTU *picking*. Este procedimiento fue realizado bajo los parámetros empleados por MR DNA, en este sentido, las secuencias fueron reducidas removiendo *barcodes*, *primers*, secuencias con homopolimeros mayores a 6 pb (*denoising*), secuencias cortas menores a 200 pb, secuencias con bases ambiguas (Ns) y secuencias quimeras; las OTUs fueron definidas después de remover las secuencias *singleton*, agrupando a una divergencia del 3% (97% de similitud) y luego fueron clasificadas taxonómicamente alineando las secuencias con el algoritmo BLASTn contra las bases de datos de referencia GreenGenes (http://greengenes.lbl.gov/), RDPII (http://rdp.cme.msu.edu) y GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Por lo tanto, los laboratorios MR DNA entregaron la información de la asignación taxonómica en archivos .txt, de la calidad de secuencias en archivos .qual y las curvas de rarefacción en archivos .html a través de links de descarga. En esta investigación se utilizó el software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (Coparaso et al., 2010) con el lenguaje de programación BASH, para verificar la calidad de secuencias obtenidas a partir de la información contenida en los archivos .qual. Finalmente, utilizando los archivos de clasificación taxonómica .txt enviados por MR DNA, se construyó la matriz de abundancia de las especies bacterianas y con ella se calculó el porcentaje de abundancia relativa y los índices de diversidad alfa (Chao1, Shannon-Weiner y Simpson) empleando el software Past (Hammer, Harper & Ryan, 2001).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del desempeño de las CCMs reductoras de Cr(VI).

5.1.1 Ensayos exploratorios de la CCM-H. A partir de los ensayos exploratorios realizados (Anexo 1) se observaron algunas condiciones (Tabla 2) para evaluar reducción del Cr(VI), remoción de materia orgánica y generación de voltaje en la CCM-H.

Tabla 2. Condiciones bajo las cuales se operó la CCM-H.

Parámetros		Cámara anódica	Cámara catódica
Biológicos	Tipo de inóculo	Lodo anaerobio de laguna de igualación fresco	Agua de río Pasto zona de curtiembres
	Formación de la biopelícula	Mayor a un mes de formación	Mayor a dos meses de formación
Químicos	Medio de cultivo	Huang et al. (2011) modificado en el sustrato	Chang et al. (2010) modificado en la concentración de $K_2Cr_2O_3$
	Concentración de sustrato	Acetato 0,1 M	---
	Cantidad inicial de Cr(VI) (ppm)	---	61,3
Físicos	Área de superficie de electrodos (cm^2)	46	
	Distancia entre electrodos (cm)	13	
	Resistencia externa (Ω)	500	

Con relación a lo expuesto en la Tabla 2 es posible que estos parámetros contribuyeran en conjunto al mejoramiento del desempeño evaluado en la CCM-H. Por ejemplo, en esta investigación, el tiempo de realización de los ensayos exploratorios favoreció el establecimiento de las biopelículas en el ánodo y en el cátodo, permitiendo quizá obtener un mejor desempeño según los resultados obtenidos en la CCM-H finalmente operada; en diversas investigaciones se ha demostrado la importancia de contar con biopelículas maduras electroquímicamente estables y activas sobre el ánodo y el cátodo porque mejoran la generación de voltaje (Kim, Min & Logan, 2005; Huang et al., 2011a; López, 2014).

Para el fortalecimiento de la biopelícula es conveniente utilizar inóculos frescos los cuales mantienen la actividad microbiana (Madigan, Martinko & Parker, 2003), a partir del lodo fresco de la laguna de igualación y de las aguas del río Pasto aledañas a las curtiembres, se obtuvieron

las biopelículas del ánodo y cátodo respectivamente, cada una de 4 meses de formación (Figura 6). Estas biopelículas se utilizaron para la operación de la celda durante los ensayos exploratorios en lo que se observó que la biopelícula del cátodo, cuyo periodo de formación fue menor a un mes, empezó a desprenderse de la superficie del electrodo, lo cual también deja ver la importancia de trabajar con biopelículas maduras. También es posible atribuir el desprendimiento de la biopelícula al agotamiento de sustrato en el medio (Rodriguez, 2013). Por otro lado, el uso de inóculos provenientes las aguas del río Pasto contaminadas con Cr, puede ser favorable para el desempeño del sistema, pues los microorganismos presentes podrían demostrar una mayor eficiencia en cuanto a la reducción del Cr(VI) por dos razones: pueden estar adaptados o ser resistentes a este metal, tal como lo reporta Huang et al. (2010), por tanto en este estudio se destaca el uso de inóculos provenientes de estas aguas, ya que pueden tener un alto potencial para ser utilizados a futuro en procesos de biorremediación de los ambientes de donde fueron extraídos.



Figura 6. Biopelícula del ánodo (izquierdo) y del cátodo (Derecho) de una Celda de Combustible Microbiana.

Los parámetros químicos también pudieron influir en el mejoramiento del desempeño eléctrico de la celda por ejemplo, cuando se emplearon bajas concentraciones de acetato de sodio (0,02 M) el tiempo de operación de la celda fue de 33 horas durante las que no se logró observar la reducción de Cr(VI), sin embargo, cuando se aumentó la concentración de sustrato (acetato de sodio 0,05 y 0,1 M) se observaron mejores resultados con relación a la prolongación del tiempo de operación, generación de voltaje y a la reducción de Cr(VI). En relación a lo anterior se conoce que estos sistemas pueden funcionar bajo cinéticas tipo saturación, donde bajas concentraciones de sustrato pueden reducir el rendimiento de la celda (Gurung et al., 2012) y a

medida que aumenta su concentración, aumenta la velocidad de los procesos metabólicos hasta su saturación (Ozkaya et al., 2012).

De los parámetros físicos el aumento en el área de superficie de electrodos pudo incidir en el mejoramiento del desempeño de la celda ya que en los ensayos exploratorios se utilizaron áreas de superficie de 10 cm^2 donde no se obervo buen rendimiento de la CCM, pero cuando se aumentó el área de superficie de electrodos a 46 cm^2 (Anexo 1), la celda finalmente pudo ser operada, en este sentido Merkey & Chopp (2012), concluyeron que a mayor área de superficie del electrodo, habrá una mejor distribución de las bacterias, de tal manera que se desarrollan biopelículas delgadas con lo que se favorece la distribución homogénea del sustrato hacia todas las bacterias presentes en la biopelícula, siendo este aprovechado eficientemente y disminuyendo así la competencia en la comunidad bacteriana. Otro parámetro físico que se consideró fue la distancia entre electrodos, la cual fue de 30 cm en los ensayos exploratorios y se redujo a 13 cm en la celda finalmente operada (Anexo 1), esto pudo incidir en el mejor desempeño eléctrico de estas celdas ya que ha sido demostrado que distancias cortas entre electrodos generan un campo eléctrico mayor entre las dos cámaras, disminuyendo la R_i y mejorando la generación de voltaje (Rabaey & Verstraete, 2005).

En general los ensayos exploratorios permitieron observar unas condiciones que en conjunto pudieron incidir en el mejoramiento de la generación de energía, reducción de Cr(VI) y remoción de materia orgánica en la CCM-H, empleada por primera vez en el grupo BEQ, sin embargo, para futuros estudios es recomendable abordar la complejidad de estos sistemas bajo un modelo de integración de todos los factores que pueden influir en su desempeño, lo cual resultaría ideal para lograr su aplicación a mayor escala. Respecto a esto, diversos investigadores concluyen que el funcionamiento de las CCMs es complejo y que su rendimiento depende de la combinación de las condiciones biológicas, químicas y físicas del sistema que deben ser comprendidas de forma global y no del análisis de un único factor al momento de su operación (Wang et al., 2008; Leong, Wan, Ghasemi, Liew & Ismail, 2013; Olveira et al., 2013; Revelo et al., 2013; Mohan, Velvizhi, Modestra & Srikanth, 2014).

5.1.2 Evaluación del desempeño eléctrico de las CCMs. La generación de elecricidad se logró evaluar en las dos celdas: CCM-H y CCM-PS, operadas bajo condiciones similares. El voltaje en los dos sistemas se estabilizó en circuito abierto después de 8 y 7 días respectivamente. Posteriormente se cerró el circuito para evaluar la generación de electricidad en cada CCM, el tiempo de operación fue de 19 días para la CCM-H y de 21 días para la CCM-PS. Se observó una tendencia decreciente similar en los dos sistemas en la cual se generó un voltaje inicial que disminuyó significativamente después de 1 a 2 horas y posteriormente se mantuvo fluctuante durante el resto del tiempo de operación (Figura 7).

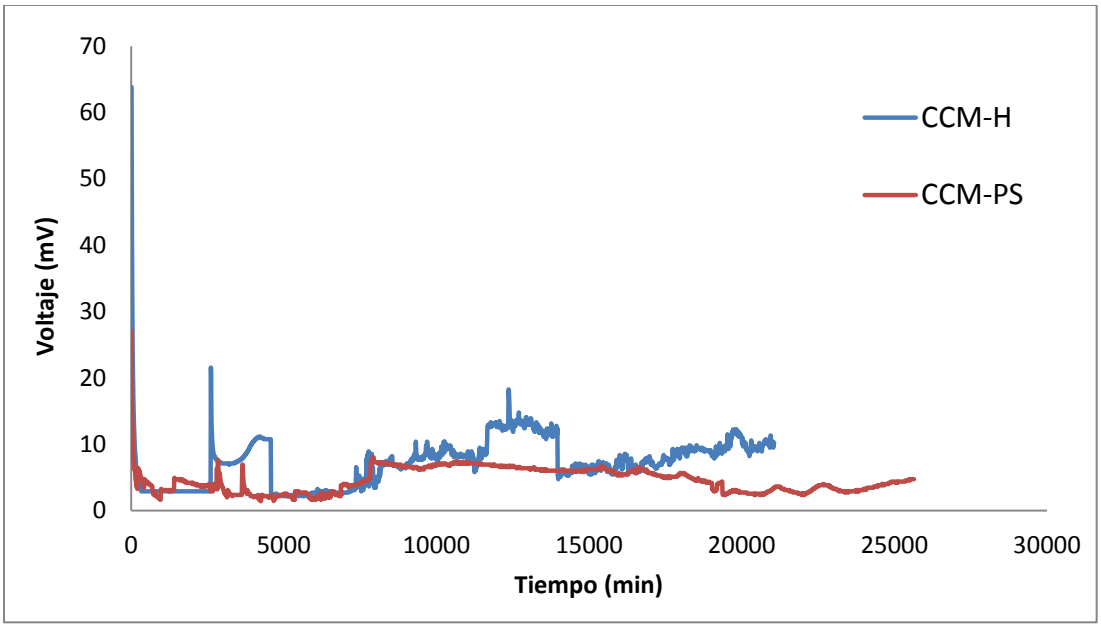


Figura 7. Generación de voltaje en la CCM-H y CCM-PS.

Como se puede observar en la Figura 7, se encontró que el máximo voltaje en cada celda se produjo al inicio del experimento, es decir cuando se cerró el circuito, esto puede atribuirse a la actividad bacteriana que oxida la materia orgánica presente en la cámara anódica, generando una acumulación de electrones en el ánodo que migran al cátodo a través del resistor externo cuando se cierra el circuito, posteriormente se evidencia un menor voltaje que se mantiene fluctuante durante el resto del tiempo de operación y que es producto de la actividad microbiana. Esta tendencia de voltaje ha sido reportada en CCMs de diferente configuración operadas en previas investigaciones del grupo BEQ (Fajardo, 2014; López, 2014).

A partir del voltaje generado en los dos sistemas se determinaron dos parámetros importantes para evaluar el desempeño eléctrico de las celdas como son EC y DP. La EC es un parámetro que proporciona información global acerca del desempeño eléctrico de estos sistemas, puesto que involucra el área bajo la curva calculada a partir de las gráficas de corriente (Anexo 2). Por su parte la DP proporciona información puntual ya que se calcula en instantes determinados del experimento, en este caso sobre los dos máximos voltajes obtenidos en cada celda. En la Tabla 3, se presentan las ECs, DPs y los dos voltajes máximos en los dos sistemas evaluados.

Tabla 3. Parámetros de evaluación del desempeño eléctrico de las CCMs operadas*.

Celda	V máximo inicial[1] (mV)	DP[1] (mW/cm^2)	V máximo durante el tiempo de operación[2] (mV)	DP[2] (mW/cm^2)	EC (%) del sistema
CCM-H	63,845	0,0001772	21,561	2,021E-05	0,0785
CCM-PS	27,041	3,179E-05	8,033	2,806E-06	0,044

* V = Voltaje; DP = Densidad de potencia; EC = Eficiencia coulómbica.

Las DPs obtenidas en general fueron bajas (Tabla 3) en comparación con lo reportado por otros estudios realizados en CCMs de biocátodo, por ejemplo Tandukar et al. (2009) alcanzaron una DP máxima de 56 mW/cm^2, Xafenias et al. (2014) obtuvieron una DP 1,7 mW/cm^2, mientras que Huang et al. (2010) obtuvieron una DP de 3,9 mW/cm^2 empleando celdas reductoras de Cr(VI) con diferente configuración pero utilizando acetato como sustrato, similarmente a Huang et al. (2010) quienes encontraron una DP de 10,3 mW/cm^2 y Huang et al. (2011b) que reportaron una DP 2,5 mW/cm^2. Con respecto a las ECs se encontró que la CCM-H fue más eficiente que la CCM-PS, pese a ello, se observa que el desempeño eléctrico en los dos sistemas fue bajo en comparación a lo que reportan otros estudios realizados en CCMs con diferentes configuraciones, por ejemplo Wang et al. (2008), obtuvieron ECs entre 25% a 59%; Liao et al. (2014) reportan eficiencias mayores a 50% y Kim et al. (2005) alcanzaron un 70% de EC.

Las diferencias entre los resultados encontrados en esta investigación y los reportados por literatura pueden atribuirse probablemente a que cada uno de estos sistemas posee una R_i propia que depende de diferentes factores relacionados con su configuración (Leong et al., 2013) y que influye de forma negativa sobre la generación de electricidad (Rabaey & Verstraete, 2005; Mohan et al., 2014). Uno de ellos es el tipo de separador. De acuerdo a lo reportado por Li et al. (2010) todos los tipos de separadores aportan a la R_i, no obstante la MIP causa menor R_i en comparación al puente salino. Esto probablemente puede explicar el hecho de que se haya obtenido mayor desempeño eléctrico en la CCM-H en comparación a la CCM-PS. Similarmente, López (2014) atribuye el bajo desempeño eléctrico (DP de 3,3 mW/m^2 y EC de 1%) obtenido en celdas de puente salino a la R_i del sistema, aunque estas celdas fueron operadas durante un mayor periodo de tiempo y utilizando biopelículas con mayor tiempo de aclimatación. En este sentido cabe resaltar la importancia de medir la R_i de cada sistema en investigaciones futuras.

Aunque el desempeño eléctrico en general fue bajo, fue posible generar electricidad en las celdas operadas, pese a que esta no es suficiente para aplicaciones prácticas; Du et al. (2007) reportaron que a manera general, la energía generada por las CCMs es baja y que es necesario profundizar en aquellos factores que inciden sobre su desempeño, sin embargo, destaca que la aplicación de estos sistemas puede encaminarse al tratamiento de aguas contaminadas y su biorremediación, lo cual es demostrado en esta investigación considerando que se logró una alta

eficiencia en la remoción de materia orgánica y reducción de Cr(VI) como se explica a continuación.

5.1.3 Remoción de materia orgánica. Los porcentajes de remoción de materia orgánica obtenidos en cada celda se muestran en la Tabla 4. En general se encontraron altos porcentajes de remoción de materia orgánica obtenidos en 19 días de operación de la CCM-H y en 21 días en la CCM-PS.

Tabla 4. Porcentaje de remoción de materia orgánica en las CCMs operadas.

Celda	DQO inicial (mgO_2/L)	DQO final (mgO_2/L)	Porcentaje de remoción (%)
CCM-H	15466,7	4688,9	69,68
CCM-PS	19133,3	4466,6	76,65

La eficiencia en la remoción de materia orgánica puede verse influenciada por el tiempo de operación de las celdas; así pues en ciclos más prolongados se espera que haya mayor remoción de DQO (Cirik, 2014), lo cual concuerda con encontrado en esta investigación donde el mayor porcentaje de remoción se encontró con la CCM-PS, que fue operada por más tiempo. Observaciones similares fueron reportadas por López (2014), quien evaluó el porcentaje de remoción de DQO en diferentes ciclos de operación y encontró que los porcentajes más altos de remoción de DQO (91% a 97%) se obtuvieron en el primer ciclo el cual fue operado por mayor tiempo.

Los resultados encontrados en remoción de DQO en general para los dos sistemas son representativos y comparables con lo reportado en literatura, por ejemplo, Cirik (2014) y Liao et al. (2014) reportan altos porcentajes de remoción de materia orgánica (90%), demostrando así la alta eficiencia de la actividad microbiana en la cámara anódica producto de la adaptación de los microorganismos a las diferentes condiciones de la celda y a la capacidad de asimilación del sustrato empleado (Cirik, 2014; Liao et al., 2014). Sin embargo, estos autores reportan que existe una relación directa entre remoción de DQO y EC del sistema, donde la mayor eficiencia en remoción de materia orgánica contribuye a generar mayores rendimientos en la EC, pese a ello en esta investigación no se observó esta relación en las celdas operadas ya que el mayor porcentaje de remoción de DQO se encontró en la CCM-PS donde la EC fue menor, pero, teniendo en cuenta las bajas magnitudes de las ECs, no es posible generalizar conclusiones sobre el comportamiento de las celdas respecto al desempeño eléctrico y su relación con la remoción de materia orgánica. Se sugiere, por tanto, que en futuras investigaciones se analice con mayor detalle el fenómeno eléctrico.

En esta investigación aunque se encontraron altos porcentajes de remoción de materia orgánica el desempeño eléctrico fue bajo, lo cual podría explicarse por la R_i propia de cada

sistema que puede depender de múltiples factores, además de la configuración; por ejemplo, la presencia de AFEs como el oxígeno en la cámara anódica, que puede estar presente debido a fisuras en el sistema o nitratos y sulfatos, que son competentes aceptores de electrones y pueden impedir que estos se conduzcan a través del electrodo para generar electricidad (Leong et al., 2013; Revelo et al., 2013; Xafenias et al., 2014). Otra vía importante de pérdida de electrones son las diferentes rutas metabólicas de fermentación y metanogénesis que son comúnmente competidores para la generación de electricidad, ya que evitan que los electrones producidos sean transferidos al ánodo y posteriormente al circuito externo para producir energía, disminuyendo así el desempeño eléctrico del sistema (Freguia, Rabaey, Yuan & Keller, 2008; Parameswaran, Torres, Lee, Krajmalnik & Rittmann, 2009; Tandukar et al., 2009; Zhang, Min, Huang Angelidaki, 2011). En este sentido, se recomienda que en futuros estudios se caracterice la comunidad microbiana del ánodo para esclarecer los procesos metabólicos que se están llevando a cabo a fin de controlar variables que influyan negativamente sobre el desempeño de la celda.

Considerando las altas eficiencias en la reducción de materia orgánica encontradas en este estudio, es posible concluir que estos sistemas son alternativas promisoras para el tratamiento de aguas contaminadas con altas cargas de materia orgánica y que además permiten la remoción de Cr(VI) como se muestra a continuación.

5.1.4 Reducción biológica de Cr(Vl) en las CCMs. En esta investigación se logró demostrar la reducción biológica de Cr(VI) utilizando un sistema bioelectroquímico con un consorcio microbiano mixto asociado al cátodo. La reducción de Cr(VI) fue cuantificada por espectrofotometría UV-VIS a través del método colorimétrico 1,5-difenilcarbazida reportado por diversos autores para este fin (Tandukar et al., 2009; Li et al., 2009), en este método se forma un complejo rojo-violeta cuya intensidad de color depende de la concentración de Cr(VI) presente en la solución y la absorbancia de este complejo se relaciona de manera lineal con la concentración del analito (Anexo 4), es decir que el método cumple con la ley de Beer-Lambert (Gómez et al., 2010).

Como se muestra en la Tabla 5, se encontraron altos porcentajes de reducción de Cr(VI) en las dos CCMs destacándose el obtenido en la CCM-H. Estos resultados demuestran que el Cr(VI) puede ser usado por los microorganismos del cátodo como AFE para reducirlo a Cr(III), como ha sido demostrado por diversos autores (Wang et al., 2008; Mathuriya & Yakhmi., 2014) posiblemente a través de mecanismos enzimáticos asociados a la membrana celular o al citoplasma, aunque las rutas metabólicas de la reducción del Cr(VI) no han sido completamente esclarecidas (Ramirez et al., 2006).

Tabla 5. Porcentaje de reducción de Cr(VI) en las CCMs operadas.

Celda	Cr(VI) inicial (ppm)	Cr (VI) final (ppm)	Porcentaje de reducción (%)
CCM-H	61,3	0,1	99,82
CCM-PS	61,3	1,3	97,83

La reducción biológica del Cr(VI) observada en esta investigación fue posible gracias a la actividad electrocatalítica de las bacterias del cátodo que utilizaron al $NaHCO_3$ como fuente de carbono y los electrones transferidos desde el ánodo. Otro posible donador de electrones en estos sistemas pudo haber sido el H, el cual es utilizado por bacterias autótrofas para la reducción de metales pesados como el Cr(VI) (Marsh & McInerney, 2001). Además, es posible que exista cierto aporte de electrones para la reducción de Cr(VI) por la oxidación biológica de la materia orgánica contenida en el inóculo de la cámara catódica (agua del río Pasto), sin embargo, se estima que este aporte es bajo ya que el inóculo solo es un 10% de la solución catódica. Considerando lo anterior, se recomienda que en posteriores investigaciones se realice la caracterización fisicoquímica del inóculo empleado. Por otra parte, el posible aporte de la reducción química del Cr(VI) en el medio utilizado en la cámara catódica no se determinó en esta investigación ya que Tandukar et al. (2009) utilizando medios similares, comprobó que dicho aporte no era significativo, no obstante se recomienda que para posteriores estudios se emplee un control (medio de cultivo sin microorganismos) para cuantificar el aporte exacto de la reducción química en la celda.

En esta investigación, partiendo de 61,3 mg/L de Cr(VI) se encontraron porcentajes de reducción cercanos al 100% (Tabla 4), similares a los obtenidos en previas investigaciones realizadas en el grupo BEQ utilizando CCMs de biocátodo con puente salino, en las que se encontraron porcentajes de reducción hasta del 86% (López, 2014) y a lo reportado por otros investigadores en celdas de biocátodo reductoras de Cr(VI) pero de diferentes configuraciones y con materiales de mayor costo, por ejemplo, Tandukar et al. (2009) redujo el 100% de Cr(VI) en una CCM de biocátodo tipo H, partiendo de 80 mg/L de Cr(VI) y obteniendo una DP de 55.5 mW/m^2. Igualmente, Huang et al. (2010) utilizando bacterias propias de un ambiente contaminado con Cr redujo el 100% de Cr(VI) partiendo de una concentración de 39,2 mg/L.

Comparando los resultados obtenidos en esta investigación frente a los obtenidos por la literatura científica citada, es importante destacar que el porcentaje de reducción de Cr(VI) es comparable independientemente de los materiales y configuraciones de las CCMs, sin embargo, no se puede decir lo mismo del desempeño eléctrico puesto que fue bajo en comparación a otros estudios, debido a la mayor eficiencia de los materiales utilizados en ellas. Por tanto, si la aplicación de las CCMs es para fines energéticos, se recomienda seguir investigando sobre los factores que influyen directamente sobre la generación de energía tales como, propiedades del sustrato anódico, R_i y comunidades bacterianas (Wang et al., 2008).

La alta eficiencia para la reducción de Cr(VI) encontrada en este estudio, hace de estos sistemas una alternativa atractiva y prometedora para la biorremediación de ambientes contaminados con este metal, siendo las CCMs técnicas costo-efectivas con relación a otros métodos empleados para la reducción de Cr(VI), por ejemplo los fisicoquímicos: sedimentación, seperación electroquímica, intercambio iónico o precipitación química (Tandukar et al., 2009; Dhal, Thatoi, Das & Pandey, 2014; Xafenias et al., 2014). De manera que es recomendable el uso a mayor escala de estos sistemas en nuestra región para el tratamiento de aguas contaminadas con Cr(VI) y de los residuos de Cr(VI) que se producen en los laboratorios de la Universidad de Nariño y que son almacenados y permanecen sin un tratamiento de detoxificación.

De acuerdo al desempeño evaluado en las dos CCMs de diferente diseño se concluye que se logró su operación bajo un conjunto de parámetros físicos, químicos y biológicos similares con los cuales se logró la remoción de materia orgánica, generación de energía y reducción biológica de Cr(VI) simultáneamente, destacando que estos sistemas tuvieron una alta eficiencia en cuanto a la remoción de materia orgánica y reducción biológica de Cr(VI), por lo cual resultan dispositivos atractivos para la biorremediación de aguas residuales. Sin embargo, pese a que las ECs obtenidas en otros estudios son relativamente altas, estas se alcanzaron utilizando materiales mas eficientes pero de mayor costo, en este sentido es pertinente resaltar que en esta investigación se operó una celda construida previamente en el grupo BEQ utilizando materiales de bajo costo como electrodos de grafito y puente salino, que permitieron alcanzar resultados comparables con la CCM-H adquirida en el mercado y con CCMs empleadas en otras investigaciones, lo cual resulta favorable para aplicaciones posteriores a mayor escala.

5.2 Estandarización del protocolo de extracción de DNA de la biopelícula del cátodo.

5.2.1 Implementación del protocolo de extracción de DNA. Los resultados obtenidos con los kits Soil DNA Isolation Norgen y PowerSoil DNA Isolation permitieron observar bandas de DNA comparables (Anexo 5). Los procedimientos de obtención de la biopelícula para estos ensayos, permitieron observar que el paso más importante para la extracción del DNA es la técnica de raspado de la biopelícula, ya que no es posible controlar la obtención de la misma calidad y cantidad de muestra en las diferentes extracciones, además porque las biopelículas son diferentes debido a sus propias condiciones, origen y tiempo de formación.

El kit PowerSoil DNA Isolation fue escogido para realizar las siguientes extracciones de DNA de biopelículas siendo el más reportado en otras investigaciones con la misma finalidad (Tandukar et al, 2009). Siguiendo las instrucciones originales del kit se logró extraer DNA cuyo tamaño molecular fue mayor a 3000 pb y presentó una concentración estimada mayor a 10 ng/uL, como se muestra en la Figura 8.

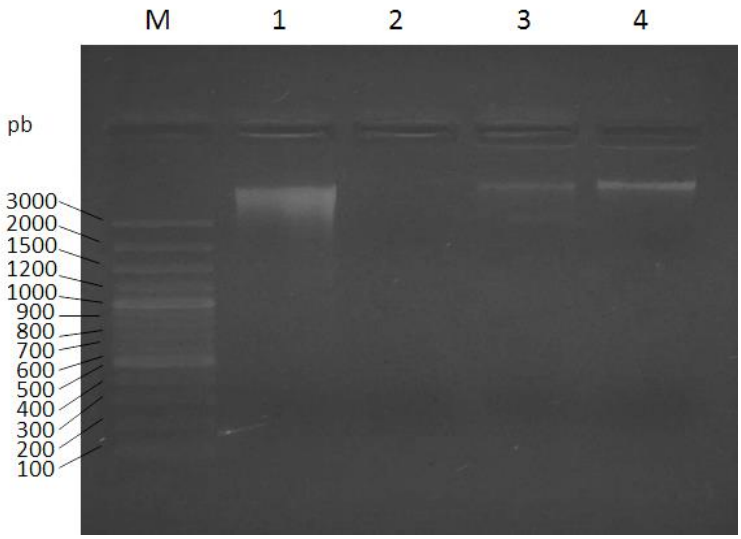


Figura 8. DNA total extraído a partir de biopelícula catódica empleando el kit PowerSoil DNA Isolation según las instrucciones del fabricante.Líneas: M. Marcador de tamaño molecular GeneRuler 100pb; 1. DNA total; 2. Agua MiliQ; 3. DNA de *P. infestans*; 4. λ 10 ng/uL.

No obstante, con el fin de encontrar mejores resultados en cuanto a concentración y calidad de DNA, se realizaron modificaciones en tiempo de vórtex y centrifugación en algunos pasos del protocolo original (Tabla 1). Para cada ensayo se lograron obtener muestras de biopelículas de 0,17 g a partir de las cuales se extrajo DNA, sin embargo, la calidad de este fue diferente en cada ensayo (Figura 9).

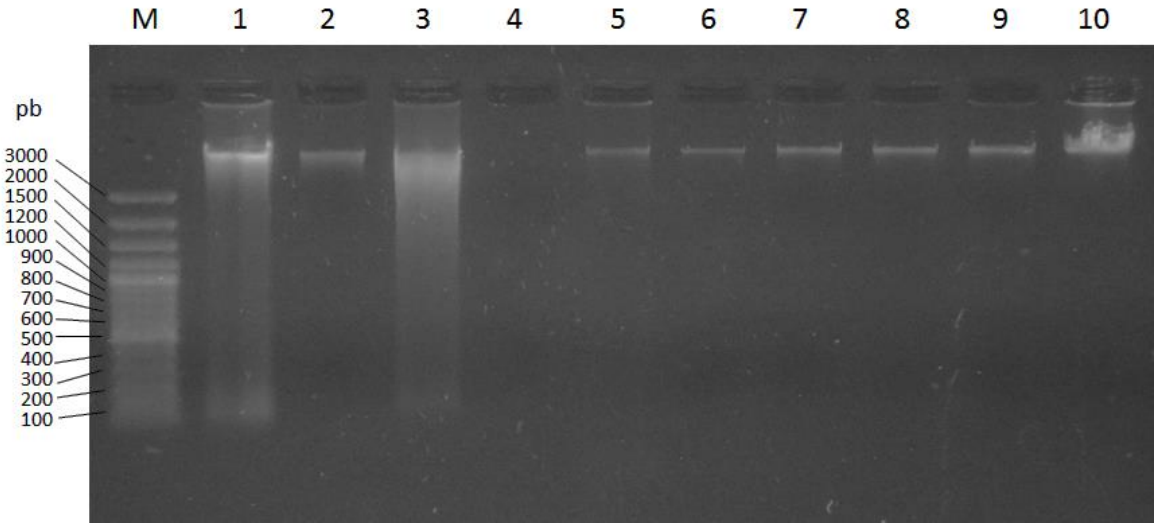


Figura 9. DNA total extraído a partir de biopelículas mediante tres ensayos del kit PowerSoil DNA Isolation, verificado en gel de agarosa al 0.8%. Líneas: M. Marcador de tamaño molecular GeneRuler 100pb; 1. Ensayo de extracción 1; 2. Ensayo de extracción 2; 3. Ensayo de extracción 3; 4. Agua MiliQ; 5. DNA de *P. infestans*; 6. λ 10 ng/uL; 7. λ 15 ng/uL; 8. λ 20 ng/uL; 9. λ 25 ng/uL; 10. λ 50 ng/uL.

De acuerdo con lo observado en la Figura 10, el DNA obtenido en los tres ensayos tuvo un tamaño molecular mayor a 3000 pb, en el ensayo 1 se obtuvo una banda de DNA con una concentración estimada mayor a 25 ng/uL, en el ensayo 2 se logró obtener DNA de una concentración estimada entre 15 a 20 ng/uL y finalmente, en el ensayo 3 no se pudo estimar una concentración de DNA puesto que la banda obtenida presentó un amplio barrido. Dada la calidad cualitativa de la banda, se optó por el ensayo 2, el cual fue realizado siguiendo el protocolo original del kit con la única modificación del aumento en el tiempo de centrifugación en los pasos 6 y 9 para lograr diferenciar claramente la fase del sobrenadante (DNA) de la fase del pellet.

La formación de estas dos fases se logró con la centrifugación, donde el DNA por la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfatos se separa en la fase acuosa del sobrenadante, mientras que las proteínas y lípidos se precipitan formando el pellet, con lo que se asegura la pureza del DNA (Sambrook et al, 1989; Alejos, Aragón & Cornejo, 2014). De acuerdo a lo observado en esta investigación, la separación de estas dos fases fue clave para lograr precipitar y remover los compuestos que no son DNA y requirió más tiempo posiblemente porque las biopelículas se conforman en su mayoría por una mezcla compleja de EPS de alto peso molecular (75-90%) que incluyen polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos urónicos (Rodríguez, 2013), sustancias húmicas, metales y sales que deben eliminarse para que no interfieran durante la extracción, contaminen el DNA o inhiban sus aplicaciones posteriores (Wu & Xi, 2009; Callahan, 2010).

Además, es importante mencionar que la muestra de biopelícula utilizada en esta investigación contenía parte del grafito al cual se encontraba adherida y la cantidad de este material depende de la técnica de raspado de la misma, esto puede afectar el proceso de extracción de DNA y el tiempo de centrifugación requerido para separar las fases. Por tanto es recomendable para posteriores investigaciones estandarizar la técnica de raspado de la biopelícula de manera que los diferentes experimentos de extracción se realicen siempre usando muestras iguales (Kennedy et al., 2014).

5.2.2 DNA total de la biopelícula del cátodo de las CCMs reductoras de Cr(VI). La biopelícula total extraída a partir del cátodo de la CCM-H pesó 0,298 g y la biopelícula del cátodo de la CCM-PS 0,225g, a partir de estas se realizó la extracción de DNA y se visualizó en un gel de agarosa 0,8% (Figura 10). Como se observa en la Figura 10a, el DNA extraído de la CCM-H presenta una banda definida después del tratamiento con RNAsa, de un tamaño molecular mayor a 3000 pb y una concentración estimada mayor a 25 ng/uL. En contraste el DNA de la CCM-PS (Figura 10b) presenta una concentración estimada menor de 25 ng/uL, sin embargo, su tamaño molecular fue similar al de la CCM-H (mayor a 3000 pb).

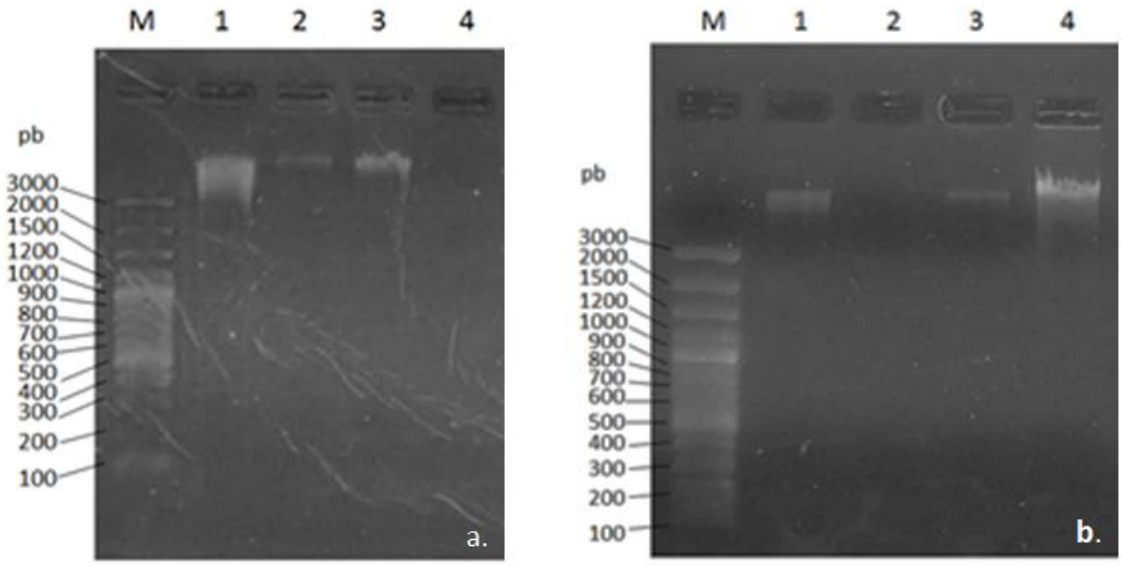


Figura 10. Verificación en gel de agarosa al 0.8% del DNA total extraído a partir de las biopelículas del biocátodo de las celdas usando el kit PowerSoil DNA Isolation: a. Extracción DNA de la CCM-H (Líneas: M. Marcador de peso molecular GeneRuler 100pb; 1. DNA de la CCM-H; 2. DNA de *P. infestans*; 3. λ 25 ng/uL; 4. Agua MiliQ. **b.** DNA del biocátodo de la CCM-PS (Pozos: M. Marcador de peso molecular GeneRuler 100pb; 1. DNA de la CCM-PS; 2. Agua MiliQ; 3. DNA de *P. infestans*; 4. λ 25 ng/uL).

Como se observa en las Figuras 9 y 10, la calidad del DNA extraído a partir de biopelículas, se evaluó de manera cualitativa a través de su visualización en geles de agarosa, que es una de las técnicas más utilizadas para la determinación simultánea de la cantidad y calidad del DNA (Acevedo, Navarro, Constantino, Gil & Benavides, 2007; Alejos et al., 2014). No obstante, es importante determinar cuantitativamente la pureza y cantidad de DNA mediante espectrofotometría (260nm/280nm) que brinda datos más exactos y confiables (Sambrook et al, 1989).

En esta investigación no fue posible utilizar estos métodos debido a que no se contaba con los equipos necesarios en los laboratorios, sin embargo, como lo reporta Tang, Sefers, Li, Kohn & Procop (2005), Wang et al. (2005), Hudson (2008) y Akkurt (2012) el más importante determinante de la integridad de DNA es su utilidad para estudios genéticos y moleculares ya que el DNA fragmentado puede dificultar la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y la reproducibilidad de las técnicas posteriores (Alejos et al., 2014). Teniendo en cuenta esto, es posible afirmar que la integridad del DNA extraído en esta investigación fue buena y cumplió con los requerimientos necesarios para utilizarse en técnicas de secuenciación de última generación, como se mostrará posteriormente.

De acuerdo a lo anterior se concluye que el kit PowerSoil DNA Isolation fue un método útil para la extracción de DNA de calidad a partir biopelículas asociadas al cátodo de CCMs, similar

a lo demostrado por Tandukar et al. (2009); Sun et al., (2012) y Zhang et al. (2012). Probablemente su eficiencia radica en que este utiliza tecnologías patentadas de remoción de inhibidores y una membrana inorgánica de sílice compacta cargada positivamente que retiene el DNA y lo separa del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores; contrario a los métodos de extracción orgánicos que requieren del uso de solventes como el cloroformo o fenol que son compuestos que pueden contaminar el DNA e inhibir posteriores aplicaciones, como PCR, sino no son completamente removidos (Invitrogen, 2005; Labome, 2013; Alejos et al., 2014).

En este sentido, el uso de estos métodos de extracción presenta ventajas en cuanto a obtención de pureza de DNA, realización en corto tiempo, a bajo costo y de manera más sencilla y fácil que otros métodos de extracción (Ausbel et al., 2003; Molina et al., 2006). Por otra parte, pese a que los protocolos de kits de extracción son estándar y tienen alta reproducibilidad, pueden requerir modificaciones o ajustes que dependerán de las características propias de la muestra, como se mostró anteriormente, fue necesario aumentar el tiempo de centrifugación en el protocolo para remover contaminantes de grafito y los altos porcentajes de EPS contenidos en la muestra.

5.3 Análisis de la microbiota del biocátodo de las CCMs reductoras de Cr(VI)

Con los datos de calidad enviados por MR DNA se realizaron las gráficas de calidad (Anexo 6), en las cuales se observa un descenso en la calidad a partir de los 400 pb, lo cual es normal si se considera que el tamaño promedio del *read* que genera la pirosecuenciacion 454 es de aproximadamente 450 pb (Youssef et al., 2009). Además teniendo en cuenta que la longitud del fragmento esperado en esta investigación de acuerdo a los primeros empleados por MR DNA fue de 492 pb, se concluye que la calidad de las secuencias obtenidas y con las que se realizaron los análisis fue buena.

Los *reads* obtenidos a partir del proceso de pirosecuenciación 454 de las regiones V1 a V3 del gen 16S rRNA realizado por MR DNA fueron en total 19576; después de realizar el proceso de *denoising*, filtración y corte de las secuencias resultaron 18607 *reads*, correspondientes al 95,05% del total, las cuales fueron utilizadas finalmente para el análisis. En la Tabla 6 se presentan los resultados de las secuencias obtenidas después de su edición y filtración en cada una de las celdas.

Tabla 6. *Reads* obtenidos por pirosecuenciación 454 a partir de los biocátodos de las CCMs operadas.

Muestra	Número de *reads* antes	Longitud promedio de secuencias	Número de *reads* después	Longitud promedio de secuencias
CCM-H	10227	488	9739	440
CCM-PS	9349	481	8868	450

Con el método de pirosecuenciación 454 se lograron definir aproximadamente 20000 *reads* (Tabla 6) que de acuerdo a la Figura 11 no tuvieron suficiente profundidad de secuencia para capturar la riqueza total de cada microbiota ya que no se alcanza una fase de estabilización porque se observa que nuevas OTUs bacterianas continuan emergiendo aún después de 5000 secuencias, aunque es importante considerar que este tipo de celdas proveen ambientes con condiciones muy particulares que probablemente limitan la diversidad bacteriana. Por lo tanto, la profundidad de secuenciación es un aspecto que debe tenerse en cuenta para futuras investigaciones.

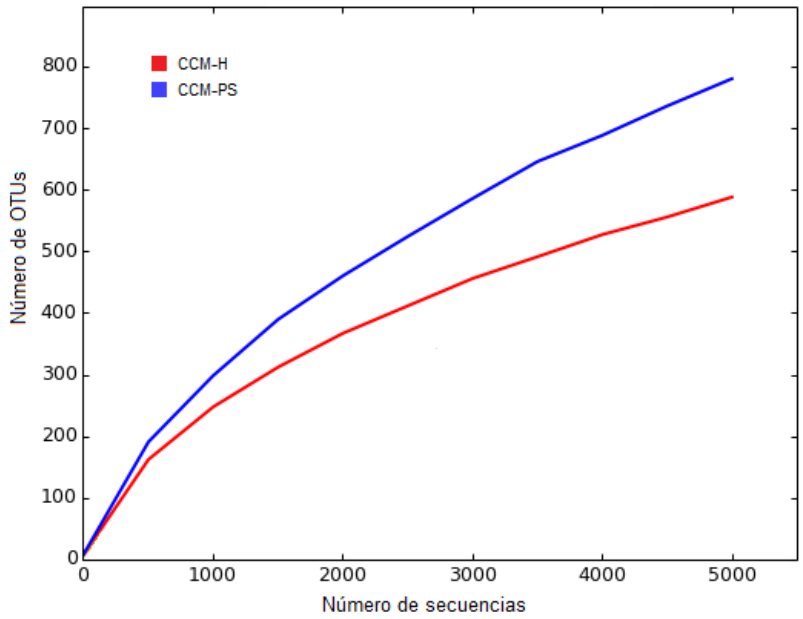


Figura 11. Curva de rarefacción basada en pirosecuenciación de las microbiotas asociadas al cátodo de las CCM-H y CCH-PS. Los OTUs fueron definidos con una divergencia del 3%.

Después del proceso de edición de las secuencias se observó que la CCM-H presentó mayor número de *reads* que la CCM-PS (Tabla 6). Con los *reads* finalmente obtenidos, se determinaron las OTUs presentes en cada muestra con un mínimo de similitud de 97% y a partir de estos se estimó la riqueza mediante el estimador Chao1 (Tabla 7), que indicó que el número de OTUs o especies esperadas para la CCM-H fue de 97 de las cuales en este estudio se registraron 94, lo que corresponde a un 96,9% y para la CCM-PS el número de especies esperadas fue de 131 de

las cuales se encontraron 124 especies, correspondientes a un 94,6%, es decir que la pirosecuenciación logró capturar la mayoría de las especies presentes en las dos microbiotas. Los resultados indican que hubo una mayor riqueza en el biocátodo de la CCM-PS que en la CCM-H pese a que se empleó el mismo tipo de inóculo y las celdas fueron operadas bajo las mismas condiciones por lo tanto, las diferencias en la riqueza quizá puedan estar influenciadas por el diseño de las celdas que incluye básicamente condiciones de sellado y hermetismo diferentes y distintos separadores (puente salino y MIP), como ha sido demostrado en otras investigaciones por Shehab et al. (2013) y Sun et al. (2012).

Tabla 7. Medidas de diversidad alfa para las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas.

	CCM-H	CCM-PS
Número de especies	94	124
Estimador Chao1	97	131
Índice Shannon-Wiener	3,25	3,48
Índice Simpson	0,92	0,9

Para evaluar la diversidad alfa de la microbiota del biocátodo de las dos CCMs se estimaron los índices de diversidad (Tabla 7), el índice de Shannon-Weiner tiene en cuenta la distribución de la abundancia entre las especies y es susceptible a la riqueza de las mismas, en este caso el índice sugiere que las microbiotas presentan una diversidad similar, aunque la microbiota de la CCM-PS fue ligeramente mayor en comparación con la CCM-H, lo cual se debe a la presencia de un mayor número de especies en esta microbiota que determina mayor riqueza (Anexo 7); por su parte el índice de Simpson tiene en cuenta las especies que están mejor representadas por sus abundancias y es susceptible a especies dominantes (Moreno, 2001), en este estudio el índice muestra que hay una alta dominancia en las dos microbiotas lo cual puede explicarse por la elevada abundancia de uno de sus OTUs quien ejerce mayor control sobre la estructura de la comunidad como se mostrará más adelante.

Cada secuencia representativa de las OTUs encontradas fue comparada con las bases de datos Greengenes, RDPII y GenBank para asignar la clasificación taxonómica, es importante destacar que en esta investigación se secuenciaron las regiones hipervariables V1 a V3 del gen 16S rRNA, las cuales se escogieron teniendo a Guo et al. (2012) quien sugiere que las regiones V1 y V2 proporcionan una asignación taxonómica consistente para un rango de géneros relativamente amplio y permiten analizar comunidades bacterianas funcionales, asimismo Lu et al. (2012) utilizó las regiones V1 a V3 para el estudio de comunidades bacterianas anódicas en celdas electrocatalíticas y Chakravorty et al. (2007) afirma que las regiones V2 y V3 son las más adecuadas para distinguir la mayoría de las especies bacterianas a nivel de género. Similarmente, en el presente estudio, el uso de las regiones V1 a V3 permitío una alta resolución taxonímica ya que permitió la clasificación de las bacterias a nivel de phylum, clase, orden, familia, género y en algunos casos especie (Figura 12, Anexo 7).

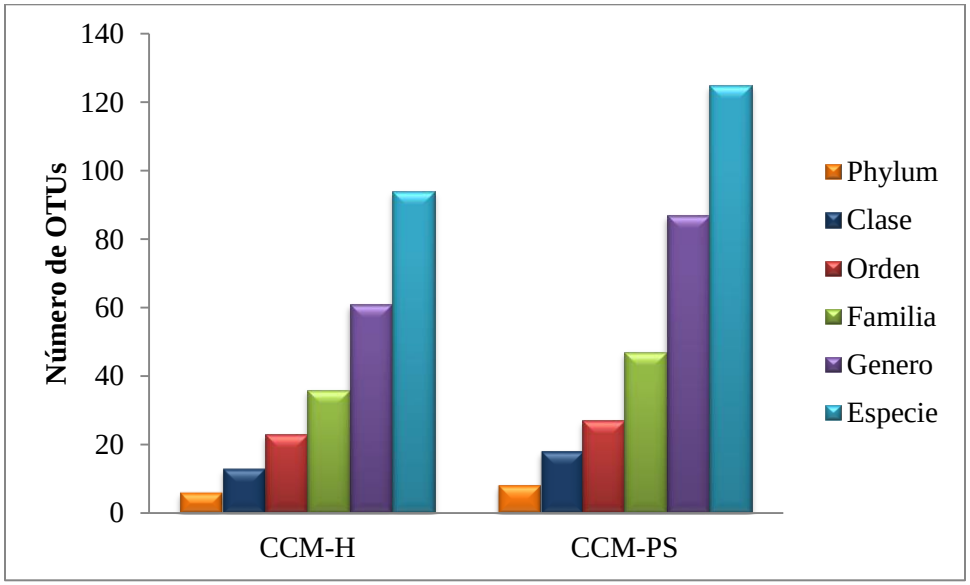


Figura 12. Cantidad de OTUs encontrados para cada taxa presente en las CCMs operadas

La Figura 13 muestra los phyla que se encontraron en cada una de las CCMs, como se puede observar, en la CCM-H se encontró que el phylum más abundante fue Proteobacteria con un 66,1%, comprendiendo las clases Gammaproteobacteria (67,4%), Alphaproteobacteria (20,8%) y Betaproteobacteria (11,7%); seguido de los phyla Actinobacteria (14,6%), Bacterioidetes (11,6%), Firmicutes (7,4%) y en menor abundancia los phyla Tenericutes (0,04%) y un división candidata TM7 (0,03%) que por su baja abundancia no se observar en la Figura 13a. En la CCM-PS se encontró que también el phylum más abundante fue Proteobacteria con un 78,8%, comprendiendo las clases Gammaproteobacteria (54,5%), Alphaproteobacteria (29,7%) y betaproteobacteria (14,3%), deltaproteobacteria (0,4%) y epsilonproteobacteria (0,9%), seguido de los phyla Firmicutes (7,9%), Actinobacteria (6,6%), Bacteroidetes (5,5%), y tres phyla con menor abundancia Tenericutes (0,4%), Verrucomicrobia (0,3%), Spirochaetes (0,1%) y finalmente una división candidata TM7 (0,1%) (Figura 13b). Como se puede observar, los cuatro phyla más abundantes se presentan en el biocátodo de ambas CCMs además de Tenericutes y uno no identificado que se presentan en menor abundancia, mientras que los phyla Verrucomicrobia y Spirochaetes solo se presentan en la CCM-PS, aunque en muy baja abundancia. De estos phyla no se conocen informes de su asociación con ambientes contaminados con Cr(VI), sin embargo, Sun et al. (2012) y Lesnik & Liu (2014) reportan que estos phyla son representativos en el cátodo y ánodo de CCMs respectivamente; teniendo en cuenta que su presencia en el biocátodo de la CCM-PS no es representativa para la reducción de Cr(VI) debido a su baja abundancia, son requeridos futuros estudios para explicar su presencia en esta celda de particular configuración.

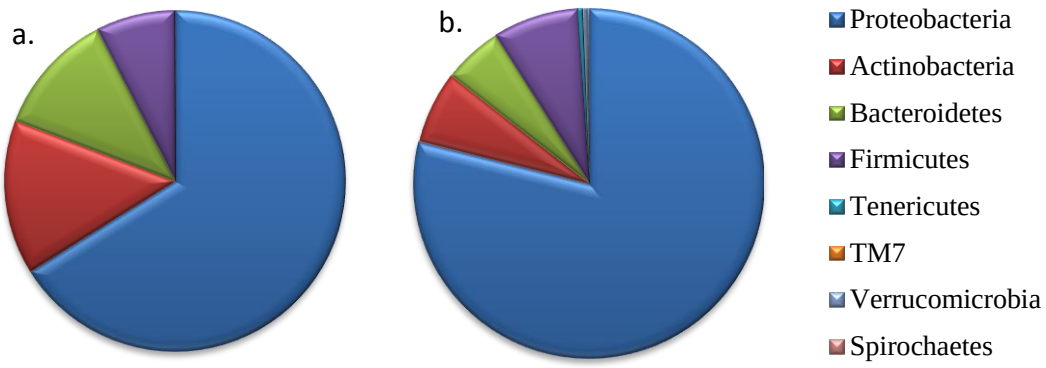


Figura 13. Phyla presentes en la microbiota asociada al biocátodo de las CCMs operadas: a. CCM-H; b. CCM-PS.

Es importante resaltar que los cuatro phyla más abundantes encontrados en las microbiotas de las CCM-H y CCM-PS (Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes), también coinciden con los reportados por Desai, Parikh, Vaishnav, Shouche & Madamwar (2009) como más abundantes en la caracterización bacteriana realizada a partir de un ambiente contaminado con Cr(VI), indicando que las especies pertenecientes a estos taxa están asociadas a la presencia de Cr(VI), en su ambiente. En particular llama la atención la sobresaliente abundancia del phylum Proteobacteria en ambas CCMs, el cual es el grupo taxonómico de Bacteria más numeroso existente en la naturaleza. A este phylum pertenecen diversas especies bacterianas con diferentes capacidades metabólicas específicas que les permiten adaptarse a una amplia variedad de ambientes (Tortora et al., 2007), quizá por esta razón lograron adaptarse a las condiciones particulares de las celdas y colonizar el cátodo con una alta abundancia, lo que indicaría que las bacterias de este phylum fueron capaces de expresar un metabolismo relacionado con la reducción de Cr(VI), por ejemplo las especies del género *Pseudomonas* que fueron dominantes en las microbiotas estudiadas en esta investigación y de las que se conoce presentan una conformación genética muy versátil, incluyendo elementos móviles en su genoma como transposones y plásmidos que les permiten la transferencia de genes así como la presencia de genes que codifican para diversas enzimas cromato reductasas (Gómez, et al., 2008; Ramirez et al., 2009). A este phylum también pertenecen otras especies que fueron igualmente abundantes y que serán analizadas más adelante en conjunto con aquellos géneros pertenecientes a los demás phyla reportados en este estudio.

Para abarcar el análisis general de las microbiotas, se calculó la abundancia relativa de cada especie y se clasificaron como dominantes las especies cuya abundancia relativa fue >10% y abundantes cuando fue > 2% (Tabla 8) y se enfocó el análisis principalmente en aquellos géneros a los que estas pertenecen. Los géneros a los que pertenecen las especies con abundancias relativas menores, fueron clasificados como no abundantes (0,5% - 1,9%) (Zhang et al., 2012) y los géneros con abundancias relativas menores a 0,5% se presentan en el Anexo 7, sobre estos se concluye que se requieren más estudios para verificar su presencia en el biocátodo.

Tabla 8. Clasificación taxonómica de las OTU más abundantes (abundancia relativa >2%) en las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Abundancia relativa (%)	
						CCM-H	CCM-PS
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas* spp.	21,73	28,51
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Shinella*	*Shinella* spp.	-	4,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Papillibacter*	*Papillibacter* spp.	-	3,96
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Brevundimonas*	*Brevundimonas diminuta*	4,07	3,91
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Pseudochrobactrum*	*Pseudochrobactrum saccharolyticum*	-	3,49
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	-	3,21
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum lupini*	-	3,12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Hydrogenophaga*	*Hydrogenophaga palleronii*	-	2,88
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	*Fluviicola*	*Fluviicola* spp.	-	2,35
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Alcaligenes*	*Alcaligenes faecalis*	-	2,30
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus*	*Rhodococcus globerulus*	8,06	-
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	*Flavobacterium* spp.	5,79	-
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Delftia*	*Delftia* spp.	5,54	-
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum anthropi*	5,12	-
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Clostridium*	*Clostridium* spp.	5,10	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Clostridium* spp.	5,10	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas maltophilia*	3,38	-
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Myroides*	*Myroides* spp.	3,12	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas mendocina*	2,86	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	2,13	-

Como se puede observar en la Tabla 8, de los phyla encontrados se resalta la alta abundancia de Proteobacteria tanto en el biocátodo de la CCM-H como en el de la CCM-PS, al cual pertenece el género dominante *Pseudomonas* (36,3% y 34,9% respectivamente) y algunos de los géneros abundantes en cada celda (Tabla 8), que incluyen: *Ochrobactrum* (6,3%), *Delftia* (5,5%), *Stenotrophomonas* (4,6%) y *Brevundimonas* (4,1%) para la CCM-H y *Stenotrophomonas* (5,8%), *Shinella* (4%), *Brevundimonas* (3,9%), *Pseudochrobactrum* (3,5%), *Ochrobactrum* (3,5%), *Hydrogenophaga* (2,9%) *y Alcaligenes* (2,3%) para la CCM-PS.

El género *Pseudomonas* fue el que presentó mayor dominancia en las dos microbiotas (abundancia relativa > 10%, Tabla 8) y ejerció mayor control sobre la estructura de la comunidad bacteriana lo cual se evidenció con el índice de Simpson (Tabla 7). La presencia de *Pseudomonas* en las microbiotas es un resultado muy importante en esta investigación ya que diferentes autores han aislado especies de este género a partir de ambientes contaminados con altas concentraciones de Cr(VI) y han concluido que presentan alta resistencia a la toxicidad de este metal, igualmente han sido foco de estudio para ser utilizadas en diferentes tipos de biorreactores para detoxificar Cr(VI), encontrando altas tasas de reducción y demostrando que son potentes agentes reductores de este contaminante (Camargo, Okeke, Bento & Frankenberger, 2005; Desai et al., 2008; Song, Wu & Zhou, 2009; Garavaglia, Cerdeira & Vullo, 2010; Pang et al., 2011; Brodie et al., 2012; Singh, Bishnoi & Kirrolia, 2013). En este sentido la dominancia de este género, no solo fue por su alta abundancia, sino también por el rol que pueden estar desempeñando en la reducción del Cr(VI).

Probablemente la dominancia de las especies del género *Pseudomonas* en este tipo de ambientes puede atribuirse a la capacidad de competencia que les confiere habilidad para desarrollar diversas estrategias de resistencia a los efectos nocivos del Cr(VI), por ejemplo, su expulsión del citoplasma o su reducción a Cr(III) mediante la actividad de la enzima cromato reductasa (ChrR) la cual sobresale como uno de los mecanismos de resistencia al Cr(VI) (Ramírez et al., 2006) y probablemente es un factor que favorece la adaptación de las especies y su supervivencia en el medio (Desai et al., 2009), esta enzima ha sido encontrada en varias especies de este género tales como *P. ambigua, P. fluorecens* y en *P. putida* la cual también fue reportada en esta investigación (Park et al., 2000; Ramirez et al., 2006).

Otras especies pertenecientes al género *Pseudomonas* encontradas en esta investigación y que fueron asociadas al biocátodo de una CCM reductora de Cr(VI) fueron *P. stutzeri, P. mendocina, P. pseudoalcaligenes, P. agarici, P. nitroreducens, P. synxantha, P. fragi, P. poae* y *P. putida*, lo cual constituye un nuevo aporte al conocimiento de la adaptación de estas a ambientes contaminados con Cr(VI), ya que en la literatura revisada hasta el momento solo se encuentra un estudio publicado por Tandukar et al. (2009), quienes empleando RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) sobre el DNA obtenido a partir del biocátodo de una CCM reductora de Cr(VI) lograron caracterizar dos filotipos cercanamente relacionados a *Trichococcus pasteurii* y *P. aeruginosa*, putativos reductores de Cr(VI). Esto

también nos permite ver que el uso de técnicas de secuenciación de última generación, permite obtener mayor información sobre la diversidad de bacterias asociadas al cátodo de una CCM reductora de Cr(VI) en relación técnicas moleculares tradicionales.

En las microbiotas de las dos celdas estudiadas se encontraron otros géneros y especies del phylum Proteobacteria clasificados como abundantes. Por ejemplo se destacan las especies del género *Ochrobactrum* (6,3% CCM-H y 3,5% CCM-PS), *O. anthropi* y *O. lupini*, cuya presencia en estos biocátodos es relevante ya que probablemente pueden estar cumpliendo algún papel en la reducción de Cr(VI), siendo que especies de este género han sido aisladas de ambientes contamindos con este metal y han demostrado ser potenciales agentes resistentes y reductores de este contaminante (Sultan & Hasain, 2006; Sultan & Hasnain, 2007; He, Sha, Hu & He, 2009; Cheng et al., 2009; Kavita & Keharia, 2012). Se ha reportado que la resistencia al Cr(VI) en especies pertenecientes a este género está asociada a diferentes genes de resistencia al cromato (*chrB, chrA, chrC, chrF*) ubicados en transposones en su genoma (Vasconcelos, Branco & Fransisco, 2011). Kiliç & Dönmez (2008) han demostrado que tanto *Ochrobactrum* como *Pseudomonas* son capaces de crecer en ambientes contaminados con Cr(VI) y además producir EPS para la formación de biopelículas, probablemente como una estrategia adaptativa de resistencia al metal que les les permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en un ambiente determinado propocionandoles protección y comunicación (Betancourth et al., 2004; Rodríguez, 2013), lo cual podría explicar la importante presencia de estas especies en las microbiotas analizadas en esta investigación.

Del mismo modo, las especies del género *Stenotrophomonas* (4,6% CCM-H y 5,8 CCM-PS) (*S. maltophilia, S. acidaminiphila, S. rhizophila* y *S. nitritireducens*), encontradas en el biocátodo de las dos celdas, son representativas en estos sistemas ya que en otras investigaciones se han aislado de ambientes contaminados con Cr y han presentado altas tasas de reducción de Cr(VI) y además capacidad para la producción de EPS y formación de biopelículas sobre superficies inertes (Morel, Ubalde, Olivera, Callejas & Castro, 2009; Gunasundari & Muthukumar, 2013). Otro género representativo en las dos microbiotas analizadas fue *Brevundimonas* (4,1% CCM-H y 3,9% CCM-PS) por la abundancia de su especie *B. diminuta*, en este sentido Lu, An & Zheng (2011) caracterizaron muestras de suelo contaminado con Cr(VI) y encontraron una baja diversidad pero con alta abundancia del género *Brevundimonas* demostrándose su fuerte tolerancia y poder de reducción de este metal.

Respecto a los géneros *Delftia* (5,5%) *(Delftia* spp.), encontrado en el biocátodo de la CCM-H y *Pseudochrobactrum* (3,5%) (*P. saccharolyticum*) y *Alcaligenes* (2,3%) (*A. fecalis*) encontrados en el biocátodo de la CCM-PS, es importante anotar que son resistentes al Cr(VI) ya que presentan capacidad para reducirlo bajo diferentes condiciones de crecimiento (Garavaglia et al., 2010; Morel, Ubalde & Castro, 2011; Long et al., 2013). Para el género *Delftia* existen estudios que demuestran que la reducción de Cr(VI) es dependiente de NADH y NADPH y esta

asociada a la fracción soluble de la membrana (Morel et al., 2011), de manera similar al género *Alcaligenes* en el cual se ha demostrado la reducción intracelular del Cr(VI) por actividad reductasa dependiente de NAD(P)H (Thatoi, Das, Mishra, Prasad & Das, 2014).

Por otra parte, de acuerdo a la literatura científica, no se han encontrado registros que asocien a géneros presentes en los biocátodos de las celdas estudiadas en esta investigación con la capacidad reductora de Cr(VI), tal es el caso del género *Shinella* (4%) presente en el cátodo de las dos CCMs y el género *Hydrogenophaga* (2,9%) encontrado únicamente en la CCM-PS. Esto puede constituir el primer informe de bacterias de estos géneros que cumplan una función determinada en el biocátodo empleado para la reducción de Cr(VI), por ejemplo, en el caso del género *Hydrogenophaga* que tiene la capacidad de formar biopelícula sobre el electrodo como ha sido reportado por Kimura y Okabe (2013).

Respecto a los demás phyla encontrados en el biocátodo de las CCMs, sus abundancias fueron mucho menores en relación a Proteobacteria siendo el phylum Actinobacteria, el segundo más abundante en la CCM-H y el tercero en la CCM-PS. Camargo et al. (2005) y Wang et al. (2014) han reportado la presencia de especies de este taxa en ambientes contaminados con Cr, de los cuales han obtenido varios aislamientos bacterianos reductores de este metal. Entre los géneros más abundantes pertenecientes a este phylum, en esta investigación se encontró a *Rhodococcus* (9,8% CCM-H y 2,9% CCM-PS), presente en los dos biocátodos analizados y el segundo más abundante en el biocátodo de la CCM-H representado por las especies *R. globerulus y R. erythropolis*. Existen algunos reportes de la capacidad de *Rhodococcus* para reducir el Cr(VI), entre ellos el estudio realizado por Sun et al. (2011) y el de Patra, Malik, Beer, Mallavarapu & Naidu (2010) quienes además lograron identificar uno de sus aislamientos como *R. erythropolis.*

Otro phylum que se destaca en el biocátodo de las CCMs estudiadas es Firmicutes, el cual se ha encontrado en altas abundancias en estudios realizados en suelos contaminados con efluentes de curtiembres que contienen Cr (Camargo et al., 2005; Desai et al., 2009). En esta investigación se destacan los géneros *Clostridium* (5,2%), que fue uno de los más abundantes en la CCM-H y *Papillibacter* (4,0%) que igualmente se destacó por su abundancia en la CCM-PS. Con relación a estos, Nguema & Luo (2011) e Inglett, Bae, Aldrich, Hatfield & Ogram (2011) demostraron la reducción de Cr(VI) utilizando especies del género *Clostridium* resistentes a este metal y Sharma (2002) reporta que la reducción de Cr(VI) en este género se debe posiblemente a actividad enzimática en la cual los electrones del NADH son transferidos a través de la cadena transportadora de electrones, vía citocromos, hasta el Cr(VI). Para este phylum el género *Papillibacter* aún no ha sido relacionado con la reducción de Cr(VI), es decir que probablemente esta investigación constituye un primer registro de la asociación de este género con procesos de reducción de Cr(VI).

Finalmente, el phylum Bacteroidetes, encontrado en las dos CCMs estudiadas, ha sido reportado tambiénen ambientes contaminados con Cr(VI) por Branco, Chung, Veríssimo & Morais (2005) quienes además obtuvieron diferentes aislamientos resistentes con capacidad para reducir este contaminante, y al igual que lo observado en este estudio, encontraron este phylum en menor abundancia que Proteobacterias y Actinobacterias. De este phylum, en esta investigación sobresalen los géneros *Fluviicola* (2,4%), *Flavobacterium* (6,3%) y *Myroides* (4,3%) destacados por sus abundancias en la CCM-H, pero sólo el género *Flavobacterium* ha sido asociado con la reducción de Cr(VI) (Kumar et al., 2011). Pese a que este fue uno de los phyla más abundantes en la CCM-PS no hubo un género representativo.

Con relación a los géneros clasificados como no abundantes en esta investigación (abundancia relativa 0,5% - 1,9%), la Tabla 9 presenta un listado de aquellos que han sido reportados previamente en estudios de caracterización de suelos contaminados con Cr(VI) de los cuales han sido aislados y que se han considerado potenciales agentes reductores de este metal; también se presentan doce géneros (*Megamonas, Epulopiscium, Sphingobacterium, Actinobaculum, Acidovorax, Aquamicrobium, Oscillibacter, Phenylobacterium, Arcobacter, Bradyrhizobium, Bosea* y *Alkaliflexus*) de los cuales no se conocen reportes previos sobre su asociación a la reducción de Cr(VI), pero en esta investigación fueron aisladas a partir de la biopelicula asociada al catodo de las CCMs reductoras de Cr(VI) y posiblemente pueden estar cumpliendo algún papel relacionado con esta función (Tabla 9), sin embargo, para determinar la capacidad de reducción de Cr(VI) y la eficiencia de las bacterias encontradas en esta investigación, es necesario que se evalúe cada una de manera independientemente.

La abundancia relativa de estos géneros fue menor en comparación con los géneros dominantes y abuandantes mencionados anteriormente, esto puede atribuirse a que las condiciones de operación propias de las CCMs estudiadas: pH, temperatura, sustratos o concentración de Cr(VI), ejercen una selección natural que condiciona la estructura de la microbiota, de manera que favorece a aquellas especies con capacidad adaptativa y pone en desventaja a aquellas especies cuyos óptimos de crecimiento son diferentes a las condiciones que les ofrece la celda, lo que se evidencia en abundancias relativas bajas (Gómez et al., 2008; Tandukar et al., 2009; Soni, Singh, Liao et al., 2014). Sin embargo, de acuerdo a los reportes científicos mostrados en la Tabla 9, dichos géneros presentan capacidad para reducir el Cr(VI), lo cual permite inferir que las especies de estos géneros están cumpliendo determinado papel dentro de la microbiota estudiada y que contribuyen a la reducción de Cr(VI) participando dentro de las interacciones sinérgicas de la microbiota, de las cuales no se tiene mucho conocimiento hasta ahora (Rabaey & Verstraete, 2005; Chang et al., 2006; Tandukar et al., 2009; Lovley & Nevin, 2011). Por tanto, se recomienda profundizar en su estudio ya que independientemente de sus abundancias, es probable que cada una pueda desempeñar una función específica dentro de la biopelícula asociada al cátodo de las CCMs reductoras de Cr(VI), lo cual puede ser objeto de estudio en futuras investigaciones.

Tabla 9. Clasificación taxonómica de los OTUs abundantes (abundancia relativa >0,5%) en las microbiotas de los biocátodos de las CCMs operadas y reportes previos asociados a la reducción de Cr(VI).

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Abundancia relativa (%)		Referencia
					CCM-H	CCM-PS	
Actinobacteria	Actinobacteria	Arthrobacter	Micrococcaceae	*Arthrobacter*	1,9	0,2	Dey & Paul (2012); Ziagova et al. (2014); Xiao et al. (2014).
Proteobacteria	Gamma-proteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	*Aeromonas*	1,1	0,2	Desai et al. (2009).
Proteobacteria	Gamma-proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Citrobacter*	1,7	1,0	Tekerlekopoulou et al. (2013).
Proteobacteria	Beta-proteobacteri	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Variovorax*	0,7	-	Sotola et al. (2013)
Proteobacteria	Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Achromobacter*	0,2	0,5	Tekerlekopoulou et al. (2013); Thatoi et al. (2014).
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Agrobacterium*	1,0	1,8	Thatoi et al. (2014).
Proteobacteria	Gamma-proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Escherichia*	0,5	0,5	Thatoi et al. (2014).
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	*Leucobacter*	0,4	0,8	Thatoi et al. (2014).
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Rhodobacter*	0,3	0,8	Thatoi et al. (2014).
Proteobacteria	Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*	0,8	1,5	Somenahally et al. (2013); Xiao et al. (2014).
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	*Megamonas*	0,8	-	-
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Devosia*	0,7	1,7	Chen et al. (2012).
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Gordoniaceae	*Gordonia*	0,6	1,6	Berekaa et al. (2006).
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Epulopiscium*	0,6	0,1	-
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Sphingobacterium*	0,6	0,5	-
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	*Actinobaculum*	1,3	0,9	-

Proteobacteria	Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Acidovorax*	0,3	1,5	-
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Aquamicrobium*	-	1,0	-
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Oscillibacter*	-	0,8	-
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Phenylobacterium*	-	0,8	-
Proteobacteria	Epsilon-proteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Arcobacter*	-	0,8	-
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	*Alkaliphilus*	-	0,5	Ye et al. (2004)
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Bradyrhizobium*	-	0,5	-
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Bosea*	0,3	0,5	-
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinilabiaceae	*Alkaliflexus*	-	0,5	-
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	*Hyphomonas*	-	0,5	Sheik et al.,2012

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los antecedentes científicos se refieren a bacterias aisladas de suelos contaminados con Cr(VI) y dan cuenta de su habilidad para resistir y/o reducir este metal; estas bacterias pertenecen a los mismos phyla que se reportan en esta investigación, pero en este caso estos provienen de un inóculo extraído de las aguas del río Pasto aledañas a la zona de curtiembres; dichas bacterias fueron capaces de formar biopelícula en los biocátodos de las CCMs reductoras de Cr(VI), demostrando así su importante papel en el funcionamiento de sistemas utilizados para la biorremediación de aguas residuales sintéticas como las que fueron simuladas en la solución catódica empleada tanto en la CCM-H como en la CCM-PS.

En estos dos sistemas se lograron altos porcentajes de reducción de Cr(VI) (99,82% CCM-H y 97,83% CCM-PS), lo cual se atribuye en gran parte a la presencia y habilidad catalítica de las microbiotas altamente diversas que fueron caracterizadas; la mayor riqueza observada en la CCM-PS al parecer no tuvo influencia sobre el porcentaje de reducción de Cr(VI), probablemente porque el diseño de la CCM-H contribuyó a proveer condiciones más estrictas para permitir la reducción de Cr(VI), favoreciendo la proliferación de bacterias en la biopelícula mayormente especializadas en funciones relacionadas con la reducción de este metal. En las microbiotas de los biocátodos de las CCM-H y CCM-PS se observó algunas especies dominantes, otras abundantes y otras poco abundantes, este fenómeno podría explicarse porque el estrés generado por el Cr(VI) al que se encuentran sometidas, o las condiciones propias de operación de las celdas, afectan las abundancias de cada especie, lo cual resulta en especies poco abundantes, con baja habilidad de competencia y especies abundantes y dominantes resistentes al metal, capaces de adaptarse al estrés y llenar nichos que mantienen la estabilidad de la microbiota (Desai et al., 2009; Tandukar et al., 2009).

La reducción de Cr(VI) observada en estas CCMs quizá no depende de la funcionalidad de un único miembro de la microbiota bacteriana sino de la cooperación sintrófica entre múltiples miembros que interactúan de forma compleja como ha sido expuesto por diferentes autores (Tandukar et al., 2009). El estudio de estas interacciones debe ser considerado en futuras investigaciones, sin embargo, este estudio constituye un primer aporte al conocimiento de la microbiota y ofrece una perspectiva sobre su riqueza y estructura, dando a conocer la composición de las especies bacterianas asociadas al biocátodo de CCMs reductoras de Cr(VI) (Tabla 2 y Anexo 7) después del respectivo tiempo de operación bajo las condiciones particulares de cada sistema.

CONCLUSIONES

Las condiciones biológicas, físicas y químicas seleccionadas a partir de los ensayos exploratorios, en su conjunto, permitieron operar finalmente la CCM-H para la generación de electricidad, remoción de materia orgánica y reducción de Cr(VI) simultáneamente en este sistema.

Se logró demostrar que es posible la generación de energía eléctrica en CCMs de diferente configuración en las que se evidenció que el separador podría ser un parámetro importante que influye sobre su desempeño eléctrico, de manera que los mejores resultados se encontraron en la CCM-H operada con MIP (DP = $2{,}0 \times 10^{-5}$ mW/cm^2 y EC = 0,0785%) respecto a la CCM-PS operada con puente salino (DP = $2{,}8 \times 10^{-6}$ y EC = 0,044%).

La reducción del Cr(VI) empleando microorganismos formadores de biopelícula provenientes de aguas del río Pasto contaminadas con efluentes de curtiembres, fue altamente eficientes en ambas CCMs de biocátodo (99,82% en la CCM-H y 97,83% en la CCM-PS), demostrando así su potencial para procesos de biorremediación de aguas contaminadas con este metal.

La remoción de materia orgánica empleando microorganismos de lodos anaerobios en la cámara anódica fue eficiente en las dos celdas operadas (69,68% en la CCM-H y 76,65% en la CCM-PS), constituyéndose en una alternativa atractiva para el tratamiento de aguas residuales.

En la CCM-PS operada en esta investigación se logró un alto porcentaje de remoción de materia orgánica (76%) y una eficiente reducción de Cr(VI) (97%) constituyéndose en una alternativa de bajo costo para procesos de escalamiento de tecnologías alternativas para el tratamiento de aguas residuales.

La implementación del kit PowerSoil DNA Isolation para la extracción de DNA a partir del biocátodo exige una técnica de raspado cuidadoso de la biopelícula ya que esto incide sobre la calidad de la muestra y repercute en los tiempos de centrifugación del proceso, en los cuales fue necesario modificar el protocolo.

Con respecto a la composición de las microbiotas bacterianas asociadas a los cátodos de las CCMs, se encontró que la riqueza fue mayor en la CCM-PS respecto a la CCM-H y en cuanto a sus estructuras, las CCMs presentaron especies pertenecientes a géneros no abundantes (26), abundantes (15) y a un género dominante.

Se demostró que la diversidad bacteriana fue ligeramente mayor en la CCM-PS en comparación con la CCM-H, sin embargo, ambas microbiotas incidieron en la obtención de similares porcentajes de reducción de Cr(VI) cercanos al 100%.

Los phyla más abundantes en las dos microbiotas analizadas fueron Proteobacteria (66,1% en la CCM-H y 78,8% en la CCM-PS), Actinobacteria (14,6% en la CCM-H y 6,6% en la CCM-PS), Bacteroidetes (11,6% en la CCM-H y 5,5% en la CCM-PS) y Firmicutes (7,4% en la CCM-H y 7,9% en la CCM-PS), a los cuales pertenecen potenciales especies reductoras de Cr(VI).

La pirosecuenciacion 454 permitió generar un primer reporte de la composición bacteriana de las biopelículas asociadas a los cátodos de las CCMs reductoras de Cr(VI), encontrándose 94 especies bacterianas en la CCM-H y 124 en la CCM-PS, de las cuales las especies pertenecientes a los géneros *Shinella, Hydrogenophaga, Papillibacter, Fluvicola, Myroides, Megamonas, Epulopiscium, Sphingobacterium, Actinobaculum, Acidovorax, Aquamicrobium, Oscillibacter, Phenylobacterium, Arcobacter, Bradyrhizobium, Bosea* y *Alkaliflexus*, de acuerdo a la literatura científica revisada, no han sido relacionadas con la reducción de Cr(VI), siendo esta investigación un primer aporte al conocimiento sobre su asociación con la reducción de este metal.

RECOMENDACIONES

Evaluar los diferentes factores físicos, químicos y biológicos y sus interacciones para poder determinar sus efectos sobre el desempeño de la CCM, por ejemplo: pH, tiempo de formación de la biopelícula, tipo y concentración de sustrato de la cámara anódica, concentración inicial de Cr(VI) en la cámara catódica y diferentes tipos de inóculos.

Incluir réplicas biológicas para poder aplicar análisis estadísticos y obtener resultados comparables en cuanto al desempeño de las CCMs.

Realizar la caracterización fisicoquímica de las muestras empleadas como inóculo para las cámaras anódicas y catódicas.

Evaluar a escala de laboratorio el tratamiento de aguas residuales naturales en las CCMs.

Se puede recomendar el uso de la CCM-PS para futuras aplicaciones de tratamiento de aguas residuales contaminadas con Cr(VI), ya que es un diseño costo-efectivo que resultaría apropiado para procesos de escalamiento y es necesario mejorar el método de ensamblaje de sus piezas.

Mejorar la técnica de raspado de la biopelícula, de manera que sea posible trabajar siempre con muestras de igual calidad (sin restos de grafito) en cada extracción de DNA.

Evaluar la concentración y calidad del DNA extraído mediante espectrofotometría (260/280).

Se recomienda el uso de la pirosecuenciación también para caracterizar la microbiota asociada al ánodo de la CCM con el fin de determinar las bacterias relacionadas con la oxidación de la materia orgánica y los procesos de transferencia de electrones para la generación de electricidad.

Se recomienda evaluar el desempeño de estas CCMs empleando poblaciones bacterianas aisladas y en consorcio con el fin de ampliar el conocimiento sobre su función en los procesos de reducción de Cr(VI) a nivel de una biopelícula.

Estudiar la dinámica de las microbiotas bacterianas asociadas al cátodo de CCMs reductoras de Cr(VI) a lo largo del tiempo de operación de las celdas.

Probar diferentes parámetros bioinformáticos en el análisis de secuencias generadas por pirosecuenciación referentes a edición y calidad de secuencias o porcentaje de divergencia en OTU picking.

Estudiar los posibles mecanismos de reducción de Cr(VI) que utilizan las bacterias que están asociadas al biocátodo reductor de Cr(VI) reportadas en esta investigación.

Evaluar las bacterias encontradas en esta investigación de forma aislada para determinar su capacidad y efieciencia de reducción de Cr(VI).

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, F., Navarro, L., Constantino, L., Gil, P. & Benavides, M. (2007). Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé 58*(2), 134-141.

Acinas, S. (2008). Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. *Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología, 44*(25), 24-29.

Ahmed, J. & Kim, S. (2011). Effect of Cathodic Biofilm on the Performance of Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Korean Chemical Society, 32*(10), 3726-3729.

Akkurt, M. (2012). Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genetics and Molecular Research, 11*(3), 2343-2351.

Alejos, L., Aragón, M. & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. & Rocha, M. (Ed.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-20). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.

Alzate, A. (2004). Diagnóstico ambiental del sector curtiembre en Colombia. Proyecto gestión ambiental en la industria de curtiembre. Recuperado del sitio de internet de: http://www.tecnologiaslimpias.org/curtiembres/diagnosticonacional.pdf

Alzate, L., Fuentes, C., & Alvarez, A. (2008). Generación de energía a partir de una Celda de Combustible Mirobiana tipo PEM. *Interciencia, 33*(7), 503-509.

Arauzo, M., Rivera, M., Valladolid, M., Noreña, C. & Cedenilla, O. (2003). Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del río Jarama. Editor: Asociación Española de Limnología. *Limnetica 22*(3), 87-100 (2003).

Ausbel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Scidman, J., Smith, R. & Struhl, K. (Ed.). (2003). Current protocols in Molecular Biology. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

Beecroft, N., Zhao, F., Varcoe, J., Slade, R., Thumser, A. & Avigone, C. (2012). Dynamic changes in the microbial composition in microbial fuel cells fed with sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(1), 423-427.

Berekaa, M., Abdel, Y. & Husein, H. (2006). Modeling of Chromium (VI) accumulation in *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 using response surface methodology, *Biotechnology 5*(1), 5-11.

Betancourth, B., Botero, O. & Rivera, P. (2004). Biopeliculas: una comunidad microscopica en desarrollo. *Colombia médica, 35*(3), 34-39.

Bibby, K., Viau, E. & Peccia, J. (2010). Pyrosequencing of the 16S rRNA gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids. *Water Research, 44*, 4252-4260.

Bond, D., Holmes, D., Tender, L. & Lovley, D. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments (review). *Science, 295*, 483-485.

Branco, R., Chung, A., Veríssimo, A., Morais, P. (2005). Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river. *FEMS Microbiology Ecology 54*, 35–46.

Brodie, E., Joyner, D., Faybishenko, B., Conrad, M., Ríos, C., Malave, J., Martinez, R., Mork, B., Willet, A., Koenigsberg, S., Herman, D., Firestone, M. & Hazen, T. (2011). Microbial community response to addition of polylactate compounds to stimulatehexavalent chromium reduction in groundwater. *Chemosphere, 85*, 660–665.

Bullen, R., Arnot, T., Lakemanc, J. & Walsh, F. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics, 21*, 2015–2045.

Burgos, R. (2012). Evaluación electroquímica de materiales anódicos y su aplicación en celdad de combustible microbianas. Tesis de pregrado. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

Cabrera, G. (2005). Estudio de proceso para la solubilización y precipitación de iones metálicos contaminantes mediante bacterias azufre-oxidantes y sulfatoreductoras. Universidad de Cádiz, Madrid, España.

Camargo, F., Okeke, B., Bento, F. & Frankenberger, W. (2005). Diversity of chromium-resistant bacteria isolatedfrom soils contaminated with dichromate. *Applied Soil Ecology, 29*, 193–202.

Callahan, H. (2010). Improved DNA and RNA isolation from biofilms. *BioTechniques, 48*(5), 413.

Cha, J., Choi, S., Yu, H., Kim, H. & Kim, C. (2010). Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochemistry*, 78, 72–79.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods, *69*(2), 330–339.

Chang, I., Jang, J., Gil, G., Kima, M., Kim, J., Cho, B. & Kim, B. (2003). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosensors and Bioelectronics, 19*, 607–613.

Chang, I., Moon, H., Bretschger, O., Jang, J., Park, H., Nealson, K. & Kim, B. (2006). Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells (review). *Journal of Microbiology and Biotechnology, 16*(2), 163-177.

Chen, J., Tang, Q. & Wu.L. (2012). Bacterial Community Shift in Two Sectors of a Tannery Plant and its Cr (VI) Removing Potential. *Geomicrobiology Journal*, *29*(3), 226-235.

Cheng, Y., Xie, Y., Zheng, G., Wu, Z., Chen, Z., Ma, X., Li, B. & Linz, Z. (2009). Identification and characterization of the Chromium(VI) responding proteinfrom a newly isolated *Ochrobactrum anthropi* CTS-325. *Journal of Environmental Sciences, 21*, 1673–1678.

Cheung, K., & Gu, J. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential (review). *International Biodeterioration & Biodegradation, 59*, 8–15.

Cirik, K. (2014). Optimization of Bioelectricity Generation in Fed-Bactch Microbial Fuel Cell: Effect of Electrode Material, Initial Substrate Concentration, and Cycle Time. *Appl Biochem Biotechnol, 173*, 205–214.

Cole, J., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R., Kulam, S., Mohideen, A., Mcgarrell, D., Marsh, T., Garrity, G., & Tiedje, J. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research, 37*(200), 141–145.

Coparaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. & Costello, E. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods, 7*, 335-336.

Corredor, J. (2006). El Residuo Líquido De Las Curtiembres Estudio De Caso: Cuenca Alta Del Río Bogotá. *Ciencia E Ingeniería Neogranadina, 16*(2), 14-28.

Cristiani, P., Franzetti, A., Gandolf I., Guerrini, E. & Bestetti, G. (2012). Bacterial DGGE fingerprints of biofilms on electrodes of membrane less microbial fuel cells. *International Biodeterioration & Biodegradation, XXX*(2012), 1-9.

Cuberos, E., Rodríguez, A. & Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista Salud Pública Universidad Nacional de Colombia, 11*(2), 278-289.

Debabov, V. (2008). Electricity from microorganisms. *Microbiology, 77*(2), 123–131.

Desai, C., Parikh, R., Vaishnav, T., Shouche, Y. & Madamwar, D. (2009).Tracking the influence of long-term chromium pollution onsoil bacterial community structures by comparative analysesof 16S rRNA gene phylotypes. *Research in Microbiology, 160*, 1-9.

Dhal, B., Thatoi, H., Das, N. & Pandey, B. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials 250-251*, 272-291.

Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R. & Edrington, T. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol*, 8, 125.

Du, A., Li, H. & Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy (review). *Biotechnology Advances, 25*, 464-482.

Erable, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Delia, M., Etcheverry, L., Vandamme, P. & Bergel A. (2010). Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry, 78*(1), 51-56.

Fajardo, D. (2014). Evaluación de la remoción de materia orgánica y del desempeño eléctrico en una Celda de Combustible Microbiana con agua residual sintética. Tesis de pregrado. Universidad de Nariño, Nariño, Colombia.

Falcón, A., Lozano, E. & Juárez, K. (2009). Bioelectricidad (review). *BioTecnología, 13*(3), 62-78.

Ferro, M., Contreras, E. & Zaritzky, N. (2009). Remoción biológica de cromo hexavalente en reactores batch de barros activados: efecto tóxico de la concentración del metal en el metabolismo microbiano. *CONICET UNLP, 47*(1), 1-7.

Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z. & Keller, J. (2008).Syntrophic processes drive the conversion of glucose in microbial fuel cell anodes. *Environ. Sci. Technol, 42*, 7937–7943.

Gaona, J., Garza, Y., Rodríguez, J., & Martínez, G. (Enero-2012). Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. Cienciacierta. Recuperado de: www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC 29/1.html.

Garavaglia, L., Cerdeira, L. & Vullo, D. (2010). Chromium (VI) biotransformation by β- and γ-Proteobacteria from naturalpolluted environments: A combined biological and chemical treatment forindustrial wastes. *Journal of Hazardous Materials, 175*, 104–110.

Gomez, S., Gutiérrez D., Hernandez, A., Hernandez, C., Losada, M., mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por Pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos, *Ciencias Biomedicas, 6*(9), 201-212.

Gómez, S., Sierra, M., Quintanilla, D. & Morante, S. (2009). Análisis instrumental. España: NETBIBLO.

Gunasundari, D. & Muthukumar, K. (2013). Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation using *Stenotrophomonas* sp. isolated from tannery effluent contaminated soil.

Guo, F., Ju, F., Lin, C. & Zhang, L. (2012). Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regionsof 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *Plos One, 8*(10), 1-11.

Gurung, A., Kim, J., Jung, S., Byong, H., Yang, J. & Oh, S. (2012). Effects of substrate concentrations on performance of serially connected microbial fuel cells (MFCs) operated in a continuous mode. *Biotechnol Lett 34*, 1833-1839.

Hammer, Ø., Harper, D. & Ryan, D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, *Palaeontologia Electronica 4*(1), 9.

He, Z. & Angenent, L. (2006). Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis, 18*(20), 2009 – 2015.

He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y. & He, C. (2009). Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum*sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. *Journal of Hazardous Materials 163*(2009), 869–873.

Hensley, S. A., Vargas, M & Franks, A. E. (2012).The microbiology of microbial electric systems. En A. Rajesh (Ed.), Microbial biotechnology (pp. 16-38). Delhi: CABI.

Huang, L., Chai, X., Chen, G. & Logan B. (2011a). Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology, 45,* 5025–5031.

Huang, L., Chai, X., Cheng, S. & Chen, G. (2011b). Evaluation of carbón-based materials in tubular biocathode microbial fuel cells in terms of hexavalent chromium reduction and electricity generation.*Chemical Engineering Journal 166*:652-661.

Huang L, Chai X, Cheng S, Chen G. (2011c). Evaluation of carbon-based materials in tubular biocathode microbial fuel cells in terms of hexavalent chromium reduction and electricity generation.*Chemical Engineering Journal, 166*, 652-661.

Huang, L., Chen, J., Quan, X. & Yang, F. (2010). Enhancement of hexavalent chromium reduction and electricity production from a biocathode microbial fuel cell.*Bioprocess and Biosystems Engineering, 33*, 937-945.

Huang, L., Regan, J. & Quan, X. (2011a). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells.*Bioresource Technology, 102*, 316-323.

Hudson, E. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology.*Molecular ecology resources, 8*(1), 3-17.

Inglett, K., Bae, H., Aldrich, H., Hatfield, K. & Ogram, V. *Clostridium chromiireducens* sp. nov., isolated from Cr(VI)-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61*,2626–2631.

Instituto Nacional de Ecología de México INE. (2007). Capítulo 1: Descripción del proceso de curtido. Recuperado de: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/122/cap1.html

Invitrogen. (2005). Nucleic acid purification and quantification sourcebook.InvitrogenIndustries, EE.UU.

Jeremiass, A., Hamelers, H. & Buisman, C. (2009). Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. *Bioelectrochemistry*, xxx, xxx–xxx.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. & Madden, T. (2008). NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Research*, *36* (Web Server issue), W5-W9.

Kavita, B & Keharia, H. (2012). Reduction of hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium*BCR400 isolated from a chromium-contaminated soil. *Biotech, 2,*79–87.

Kennedy, N., Walker, A., Berry, A., Duncan, S., Farquarson, F., Louis, P., Thomson, J., UK IBD Genetics Consortion, Satsangi, J., Flint, H., Parkhill, J., Lees, C. & Hold, G. (2014). The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human GutMicrobiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing. *PLoS ONE 9*(2), e88982.

Kiely, P., Regan, J. & Logan, B. (2011). The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. C*urrent Opinion in Biotechnology, 22*, 378–385.

Kim, R. Min, B. & Logan, B. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl Microbiol Biotechnol 68*, 23–30.

Kimura, Z. & Okabe, S. (2013). *Hydrogenophaga electricum* sp. nov., isolated from anodic biofilms of an acetate-fed microbial fuel cell. J. *Gen. Appl. Microbiol, 59,* 261-266.

Kılıç, N. & Dönmez, G. (2008). Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *Journal of Hazardous Materials, 154*, 1019–1024.

Kumar, A., Bisht, B. & Joshi, V. (2011).Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste.*International Journal Of Environmental Sciences, 2*(2), 896-908.

Labome. (2013). DNA extraction and purification. *Mater Methods* 3, 191.

León, C. (2009). Estandarización y validación de una técnica para medición de la demanda bioquímica de oxígeno por el método respirométirco y la demanda química de oxígeno por el método colorimétrico. Tesis de pregrado. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

Leong, J., Wan, R., Ghasemi, M., Liew, K. & Ismail, M. (2013). Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 28,* 575–587.

Lesnik, K. & Liu, H. (2014). Establishing a core microbiome in acetate-fed microbial fuel cells.*Appl Microbiol Biotechnol, 98*(9), 4187-96.

Li, Y., Lu, A., Ding, H., Jin, S., Yan, Y., Wang, C., Zen, C. & Wang, X. (2009). Cr(VI) reduction at rutile-catalyzed cathode in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications, 11*, 1496-1499.

Li, W., Sheng, G., Liu, X., & Yu, H. (2010). Recent advances in the separators for microbial fuel cells (review). *Bioresource Technology*, xxx, xxx - xxx.

Liao, Q., Zhang, J., Li, J., Ye, D., Zhu, X., Zheng, J. & Zhang.B. (2014). Electricity generation and COD removal of microbial fuel cells (MFCs) operated with alkaline substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, xxx, 1-6.

Liao, Y., Min, X., Yang, Z., Chai, L., Zhang, S. & Wang, Y. (2014). Physicochemical and biological quality of soil in hexavalentchromium-contaminated soils as affected by chemicaland microbial remediation, *Environ Sci Pollut Res, 21*, 379–388.

Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Chen, L., Duan, D., Zhu, J. & Chen, Y. (2013). Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10. *J Hazard Mater, 15*(256-257), 24-32.

López, S. (2014). Reducción de Cromo en estado de oxidación (6+) (Cr^{6+}) y generación de energía eléctrica en una Celda de Combustible Microbiana (CCM) de biocátodo. Tesis de pregrado. Universidad de Nariño. Nariño. Colombia.

Lovley, D. (2011). Powering microbes with electricity: Direct electron transfer from electrodes to microbes (review). *Environmental Microbiology Reports, 3*(1), 27–35.

Lovley, D. & Nevin, K. (2011). A shift in the current: New applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Current Opinion in Biotechnology, 22*, 441–448.

Lovley, D. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity (review). *Current Opinion in Biotechnology*, *19*, 564–571.

Lu, L., Xing, D. & Ren, N. (2012). Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H_2 production from waste activated sludge. *Water research, 46*, 2425-2434.

Lu, Z., An, X. & Zhang, W. (2011). Isolation and Phylogenetic Analysis of Chromium(VI) ReducingBacteria of a Magnetite Mine Drainage from Hebei China. *Environ Sci Pollut Res Int, 20*(9), 6563-73.

Luo, Y., Zhang, R., Liu, G., Li, J., Li, M & Zhang, C. (2010). Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials, 176*, 759–764.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos, 10ª edición, Pearson – Prentice Hall, Madrid (España), 2004.

Marsh, T. & McInerney, M. (2001). Relationship of Hydrogen Bioavailability to Chromate Reduction in Aquifer Sediments. *Applied and Environmental Microbiology 67*(4), 1517-1521.

Marino, B. 2006. Evaluación de las tecnologías de tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con Cromo. Tesis de maestría. Departamento de Ingeniería Química. Universitat Politècnica de Catalunya.

Mathuriya, A. & Yakhmi, J. (2014). Microbial fuel cells to recover heavy metals. *Environ Chem Lett*.

Merkey, B. & Chopp, D. (2012). The Performance of a Microbial Fuel Cell Depends Strongly on Anode Geometry: A Multidimensional Modeling Study, *Bull Math Biol, 74*, 834–857.

Min, B., Cheng, S & Logan, B. (2005). Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Water Research, 39*, 1675–1686.

Mohan, S., Velvizhi, G., Modestra, A. & Srikanth, S. (2014). Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 40*, 779-797.

Molina, N., Polverino, D., Miniviell, M., Apezteguía, M., Aguilar, M. & Basualdo, J. (2006). Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN detrofozoítos de *Giardia lamblia. Parasitol Latinoam, 61*, 133–137.

Molokwane, P., Meli, K. & Khalambayausi, E. (2008). Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading: Brits culture (South Africa). *Water research,* 42(2008), 4538 – 4548.

Morel, M., Ubalde, M., Olivera, S., Callejas, C., Gill, P. & Castro, S. (2009). Cellularand biochemical response to Cr(VI) in*Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett, 291,* 162–168.

Morel, M., Ubalde, B. & Castro, S. (2011). *Delftia* sp. JD2: A potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Arch Microbiol, 193*(1), 63-68.

Moreno, C. (2001). Métodos para Medir la Biodiversidad. Volumen I. Manuales y Tesis. Sociedad Entomológica Aragonesa. Zaragoza, España. 84 pp.

Nguema, P. & Luo, Z. (2010). Aerobic chromium(VI) reduction by chromium-resistantbacteria isolated from activated sludge. *Ann Microbiol* DOI 10.1007/s13213-011-0224-7.

O'Dell, W. The determination of chemical oxygen demand by semi-automated colorimetry. (1993). ALS environmental. Recuperado de: http://www.caslab.com/EPA-Method-410_4/

Oueriaghli, N., Martínez, C., Quesada, E. & Béjar, V. (2010). La biodiversidad microbiana como fuente de productos de interés biotecnológico. *ARS Pharmaceutica, 51*(3), 525-539.

Oh, S., & Logan, E. (2005). Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research, 39*(2005), 4673–4682.

Oliveira, V., Simoes, M., Melo, L. & Pinto, A. (2013). Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal, 73,* 53– 64.

Osman, M., Shah, A. & Walsh, F. (2010). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial. *Biosensors and Bioelectronics, 26,* 953–963.

Ozkaya, B., Akoglu, B., Karadag, D., Aci, G., Taskan, E. & Hasar, H. (2012). Bioelectricity production using a new electrode in a microbial fuel cell. *Bioprocess Biosyst Eng 35*, 1219–1227.

Pang, Y., Zeng, G., Tang, L., Zhang, Y., Yuan, L., Xia, X., Shi, M., Li, Z. & Liu, C. (2011). Cr(VI) reduction by Pseudomonas aeruginosa immobilized in a polyvinylalcohol/sodium

alginate matrix containing multi-walled carbon nanotubes. *Bioresource Technology, 102*, 10733–10736.

Parameswaran, P., Torres, C., Lee, H., Krajmalnik, B. & Rittmann, B. (2009). Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and non-ARB in a biofilm anode: electron balances. *Biotechnol. Bioeng, 103*, 513–523.

Park, D, & Zeikus, J. (2002). Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using Shewanella putrefaciens. *Applied Microbiology Biotechnology, 59*(2002), 58–56.

Patra, R., Malik, S., Beer, M., Mallavarapu, M. & Naidu, R. (2010). Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. *Soil biology and biochemistry 42*(10), 1857-1863.

Pazos, P. (2007). Biodisponibilidad de cromo en sedimentos marinos de la ría de Arousa. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela. España.

Prieto, Z., León, J., Quijano, L., Fernández, R., Polo, E., Vallejo, R., Villegas, L., & Sánchez, R. (2008). Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de Oreochromis niloticus (Tilapia). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 25*(1), 51-58.

Rabaey, K., Rea, S., Clauwaert, P., Freguia, S., Bond, F., Blackall, L. & Keller, J. (2008). Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *International Society for Microbial Ecology, 2*(2008), 519–52.

Rabaey, K. & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology, 23*(6), 291-298.

Ramirez, M., Campos, J., Vargas, E. & Cervantes, C. (2006). Mecanismos bacterianos de tolerancia al cromo. *Ciencia Nicolaita, 45*, 41-54.

Ramírez, D., Riveros, H, Campos, J. & Cervantes. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica, 28*(3), 73-79.

Revelo, D., Hurtado, N. & Ruiz, J. (2013). Celdas de Combustible Microbianas (CCMs), Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Información Tecnológica, 24*(6), 17-28.

Rodríguez, M (2013). Búsqueda de bacterias formadoras de biopelículas para estimular la transformación del cromo hexavalente. Tesis de pregrado. Universidad de Guanajuato. Guanajuato. México.

Rojas, F. (2010). Estudio economico-financiero del aprovechamiento de las grasas extraidas del residuo de descarne "unche" derivado del proceso de curticion en el municipio de Villapinzon – Cundinamarca. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Sacco, N., Bonetto, M. & Cortón, C. (2008). Generación de Electricidad en una Celda de Combustible Microbiana Mediada Utilizando Micro-ánodos Descartables. *CONICET UNLP*, *47*(1), 388-392.

Singh, R., Bishnoi, N. & Kirrolia, A. (2013). Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* an innovative bioremediation toolin multi metals ions from simulated system using multi responsemethodology.*Bioresource Technology 138*, 222–234.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol. 4*(4), 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor.

Sánchez, O., Herzing, M., Peters, E., Márquez, R., & Zambrano, L. (Ed.). (2007). Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México. México: S y G Editores.

Satola, B., Wübbeler, J. & Steinbüchel, A. (2013). Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol, 97*, 541–560.

Severiche, C., & Gonzáles, H. (2013). Verificación Analítica Para Las Determinaciones De Cromo Hexavalente En Aguas Por Espectrofotometría. *Revista Facultad Ingenierias USBMed*, *4*(1), 22-26.

Sharma, K. (2002). Microbial Cr(VI) reduction: role of electron donors, acceptors, and mechanisms, with special emphasis on *Clostridium* spp. Tesis doctoral. Universidad de Florida. Estados Unidos.

Shehab, N., Li. D., Amy, G., Logan, B. & Saikaly, P. (2013). Characterization of bacterial and archaeal communities in air-cathode microbial fuel cells, open circuit and sealed-off reactors. *Applied Micobiology and Biotechnology, 97*, 9885–9895.

Sheik, C., Tyler, M., Rizvi, F., Rehman, Y., Muhammad, F. Hasnain, S., McInerney, M., Krumholz, L. (2012). Exposure of Soil Microbial Communities to Chromium and Arsenic Alters Their Diversity and Structure, *PLoS One, 7*(6), 1-8.

Somenahally, A., Mosher, J., Yuan, J., Podar, M., Phelps, T., Brown, S., Yang, Z., Hazen, T., Arkin, A., Palumbo, A., Nostrand, J., Zhou, J. & Elias, D. (2013). Hexavalent chromium reduction under fermentative conditions with lactate stimulated native microbial communities. *PLoS One, 8*(12), 1-11.

Song, T., Wu, X. & Zhou, C. (2014). Effect of different acclimation methods on the performanceof microbial fuel cells using phenol as substrate. *Bioprocess Biosyst Eng, 37,* 133–138.

Soni, S., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M & Kalra, A. (2013). In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extractsof chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environ Sci Pollut Res, 20*, 1661–1674.

Sun, J., Xu, L., Tang, Y., Chen, F., Liu, W. & Wu, X. (2011). Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol. *J Hazard Mater*. *191*(1-3), 62-68.

Sun, Y., Wei, J., Liang, P. & Huang, X. (2012). Microbial community analysis in biocathode microbial fuel cells packed with different materials. *AMB Express, 2*, 2-8.

Sultan, S. & Hasnain, S. (2006). Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology, 39*, 883–888.

Sultan, S. & Hasnain, S. (2007). Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. *Bioresource Technology, 98*, 340–344.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Society for Molecular Biology and Evolution, 30*(12), 2725–2729.

Tandukar, M., Huber, J., Onodera, T. & Pavlostathis, G. (2009). Biological chromium (VI) reduction in the cathode of a microbial fuel cell.*Environmental Science Technology, 43*, 8159–8165.

Tang, W., Sefers, S., Li, H., Kohn, D.& Procop.G. (2005). Comparative evaluationof three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology 43*, 4830-4833.

Tekerlekopoulou, A., Tsiflikiotou, M., Akritidou, L., Viennas, A., Tsiamis, G., Pavlou, S., Bourtzis, K. & Vayenas, D. (2013). Modelling of biological Cr(VI) removal in draw-fill reactors using microorganisms in suspended and attached growth systems. *Water research, 47*, 623-636.

Tellez, J., Carvajal, R. & Gaitán, A. (2004). Aspectos toxicológios relacionados con la utilización del Cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, 52*(1), 50-61.

Thatoi, H., Das, S., Mishra, H., Prasad, B. & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediationof hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management, 146*, 383-399.

Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994). ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research, 22*(22), 4673-4680.

Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.

Vasconcelos, P., Branco, R. & Fransisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes*Ochrobactrum tritici* 5bvl1 a strain highly resistant, *Biometals 24*, 401–410.

Vilchez, R (2005). Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Bogotá, Colombia.

Wang, G., Huang, L. & Zhang, Y. (2008). Cathodic reduction of hexavalent chromium [Cr(VI)] coupled with electricity generation in microbial fuel cells. *Biotechnology Letters, 30*, 1959–1966.

Wang F., Zhu, Y., Huang, Y., McAvoy, S., Johnson, W., Cheung, T., Chung, T., Lo, K., Yim, S., Yu, M., Ngan, H., Wong, Y. & Smith, D. (2005). Transcriptionalrepression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 24, 3875–3885.

Wang, Y., Peng, B., Yang, Z., Chai, L., Liao, Q., Zhang., Z. & Li., C. (2014). Bacterial community dynamics during bioremediation of Cr(VI)-contaminated soil. Applied Soil *Ecology, 85*, 50–55.

Wang, Z., Ma, J., Xu, Y., Yu, H. & Wu, Z. (2013). Power production from different types of sewage sludge using microbial fuel cells: A comparative study with energetic and microbiological perspectives. *Journal of Power Source, 235*, 280-288.

Wu, J. & Xi, C. (2009). Evaluation of Different Methods for Extracting Extracellular DNA from the Biofilm Matrix. *American Society for Microbiology, 75*(16), 5390–5395.

Xafenias, N; Zhang, Y & Banks, C. (2014). Evaluating hexavalent chromium reduction and electricity production in microbial fuel cells with alkaline cathodes. *Int. J. Environ. Sci. Technol*, DOI 10.1007/s13762-014-0651-7.

Xiao, X., Yang, X., He, Z.& Li, T. (2014). Chromium-Resistant Bacteria Promote the Reduction of Hexavalent Chromium in Soils. *Journal of Environmental Quality, 43*(2), 507-516.

Ye, Q., Rho, Y., Carrol, S., Zhou, J., Zhang, C. & Fields, M. (2004). Alkaline anaerobic respiration: Isolation y characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol, *70*(9), 5595-5602.

Yousef, N., Sheik, C., Krumholz, L., Najar F., Roe, B. & Elshahed, M. (2009). Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys. Appl. Environ. Microbiol, *75*(16), 5227-5236.

Yu, J., Park, Y. & Lee, T. (2014). Effect of separator and inoculum type on electricity generation and microbial community in single-chamber microbial fuel cells. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37, 667–675.

Zhang, G., Zhao, Q. Jiao, Y., Wang, K., Jong, D. & Ren, N. (2012). Efficient electricity generation from sewage sludge using biocathode microbial fuel cell. *Water research, 46*, 43-52.

Zhang, Y., Min, B., Huang, L. & Angelidaki, I. (2011). Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 102, 1166-1173.

Ziagova, M., Koukkou, A. & Liakopoulou, K. (2012). Optimization of cultural conditions of *Arthrobacter* sp. Sphe3 for growth-associated chromate (VI) reduction in free and immobilized cell systems. *Chemosphere, 95*, 535–540.

Zorro, P. (2011). Caracterización de las Comunidades Bacterianas de los Octocorales Eunicea sp., y Pseudopterogorgia elisabethae. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

ANEXOS

ANEXO 1. Parámetros biológicos, químicos y físicos probados en ensayos exploratorios para la operación de la CCM-H.

Parámetros		Cámara anódica	Cámara catódica
Biológicos	Tipo de inóculo	- Lodo anaerobio de laguna de igualación almacenado 4°C por más de 7 meses - Lodo anaerobio del desarenador - Lodo anaerobio de laguna de igualación fresco*	Agua de río Pasto zona de curtiembres*
	Formación de la biopelícula	- Menor a un mes de formación - Mayor a un mes de formación*	Menor a dos meses de formación Mayor a dos meses de formación*
Químicos	Medio de cultivo	- Huang et al. (2011)[a]. - Huang et al. (2010)[b]. - Huang et al. (2011)[b]*.	- Huang et al. (2011)[a]. - Huang et al. (2010)[b]. - Cha et al. (2010)[c]*
	Tipo y concentración de sustrato	- Acetato 0,02 M - Acetato 0,05 - Acetato 0,1 M*	----
	Cantidad inicial de Cr(VI) (ppm)	----	61
Físicos	Área de superficie de electrodos (cm^2)	10 y 46*	
	Distancia de electrodos (cm)	30 y 13*	
	Resistencia (Ω)	220, 280, 500*	

* Parámetros en los cuales se observó mejor comportamiento en relación a reducción de Cr(VI), remoción de materia orgánica y generación de energía.

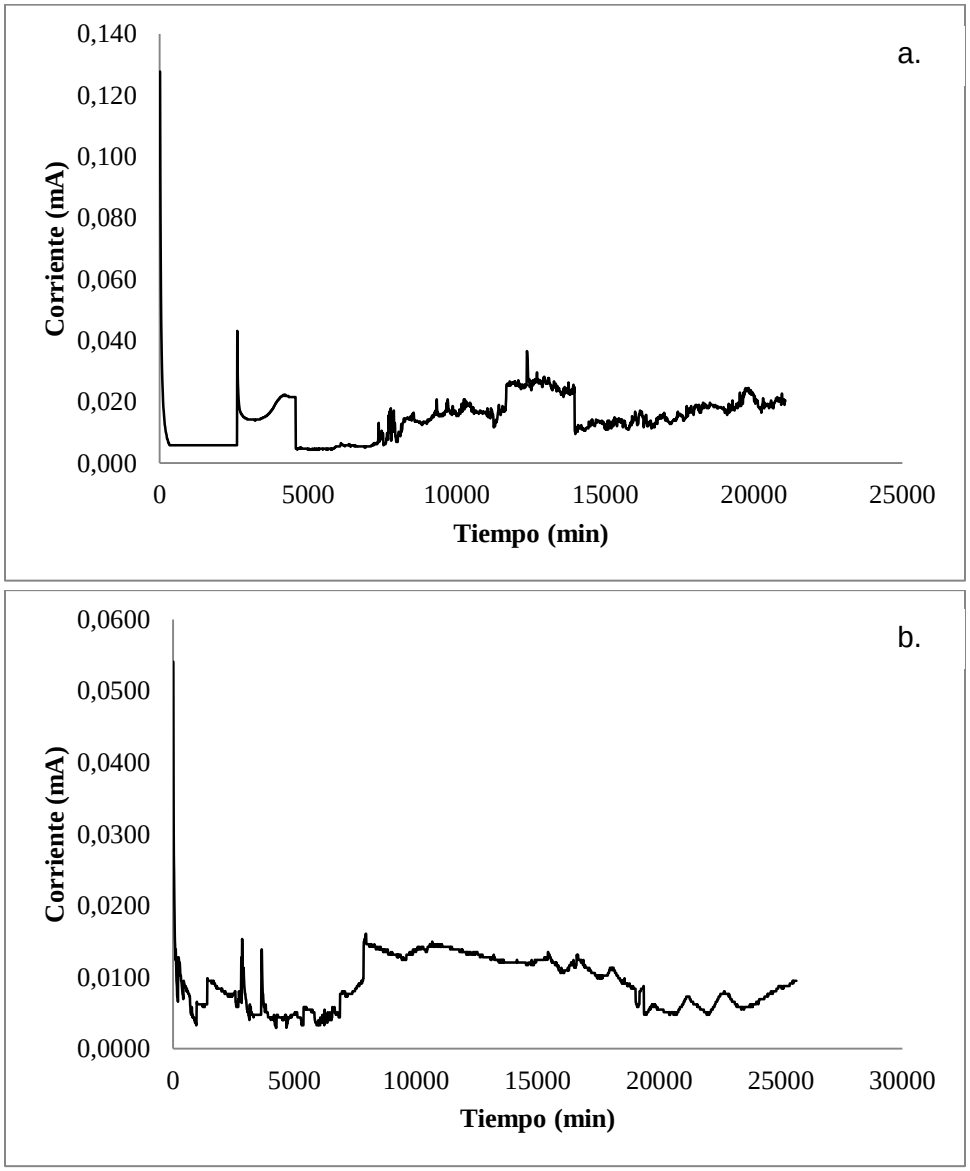
[a] Composición del medio reportado por Huang et al. (2011). Cámara anódica (g/L): KH_2PO_4, 4,4; K_2HPO_4, 3,4; NH_4Cl, 1,3; KCl, 0,78; $MgCl_2$, 0,2; $CaCl_2$, 0,0146; NaCl, 0,5; acetato, 1,0. Cámara catódica: (g/L): KH_2PO_4, 4,4; K_2HPO_4, 3,4; $NaHCO_3$, 1,0; NH_4Cl, 1,3; KCl, 0,78; $MgCl_2$, 0,2; $CaCl_2$, 0,0146; NaCl, 0,5 y $K_2Cr_2O_7$, 50 ppm.

[b] Composición del medio reportado por Huang et al. (2010). Cámara anódica (g/L): Cámara anódica (g/L): KH_2PO_4, 4,4; K_2HPO_4, 3,4; NH_4Cl, 1,3; $MgCl_2$, 0,2; $CaCl_2$, 0,0146; NaCl, 0,5;

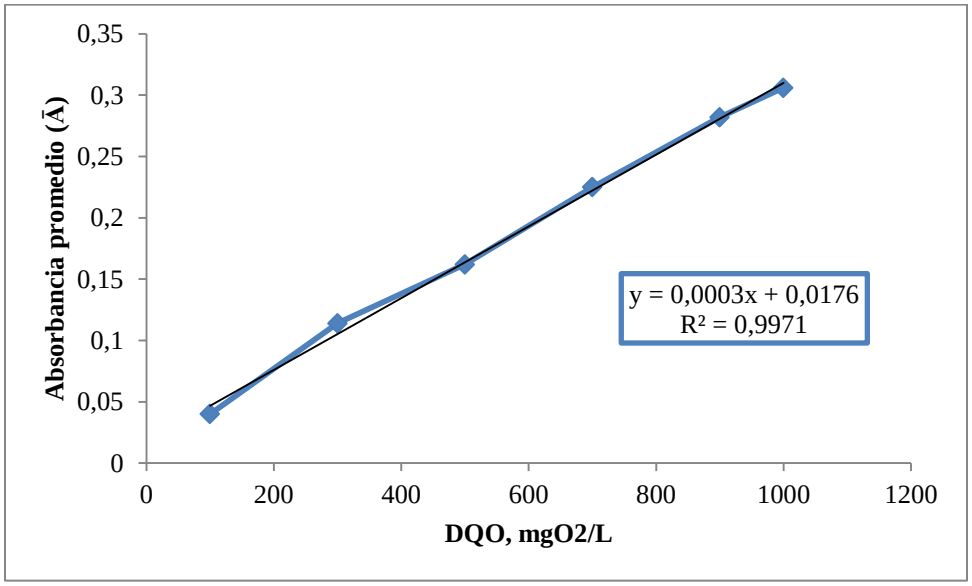
acetato, 1,6. Cámara catódica: (g/L): KH_2PO_4, 4,4; K_2HPO_4, 3,4; $NaHCO_3$, 1,0; NH_4Cl, 1,3; KCl, 0,78; $MgCl_2$, 0,2; $CaCl_2$, 0,0146; NaCl, 0,5 y $K_2Cr_2O_7$, 50 ppm.

[c] Composición del medio reportado por Cha et al. (2010). Cámara catódica (g/L): KH_2PO_4, 8,2; K_2HPO_4, 7,0; NH_4Cl, 0,1; $NaHCO_3$,0,2; $MgSO_4$; 0,01

ANEXO 2. Generación de Corriente en las CCMs operadas: a. CCM-H; b. CCM-PS



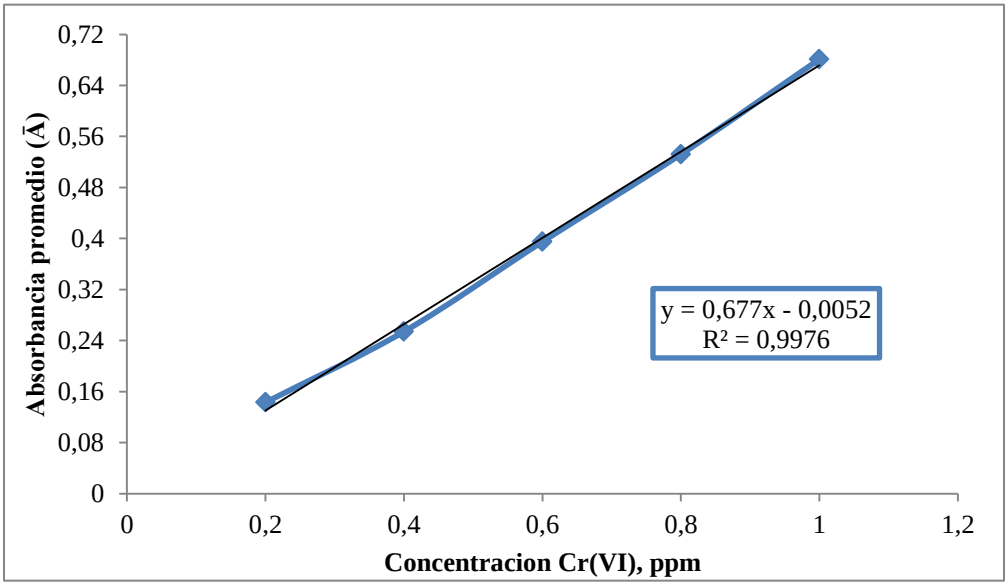
ANEXO 3. Curva de calibración para análisis de DQO



Fuente: López (2014), Fajardo (2014).

Parámetros	Valores
Numero de muestras	3
Desviación estándar	18
Limite de detección	152,22
Limite de cuantificacion	236,10
Rango	100 - 900 mgO_2/L
% Error	1,2

ANEXO 4. Curva de calibración para análisis de Cr(VI)

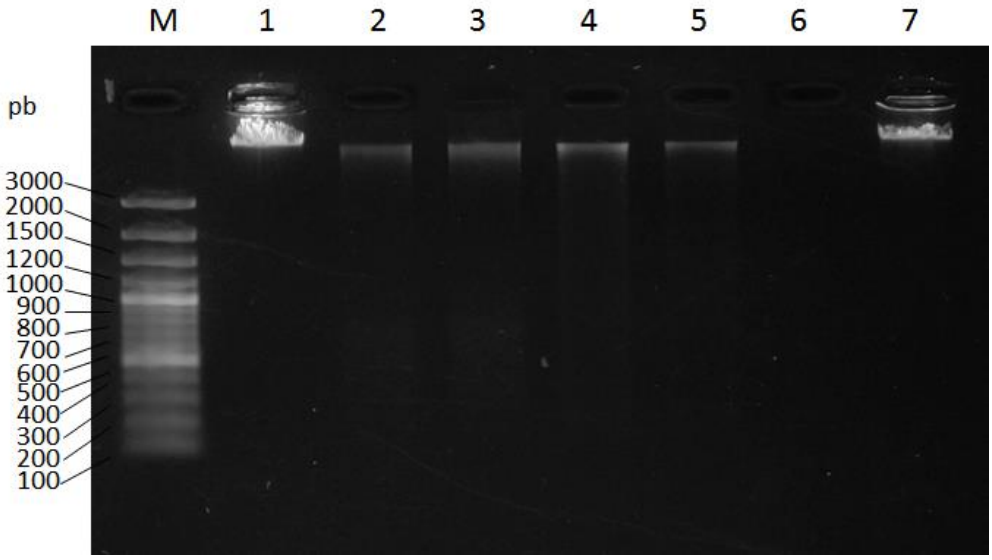


Fuente: López (2014).

Parámetros	Valores
Numero de muestras	3
Desviación estándar	0,00545
Limite de detección	0,0318ppm
Limite de cuantificacion	0,0882ppm
Rango	0,2 – 1,0 ppm

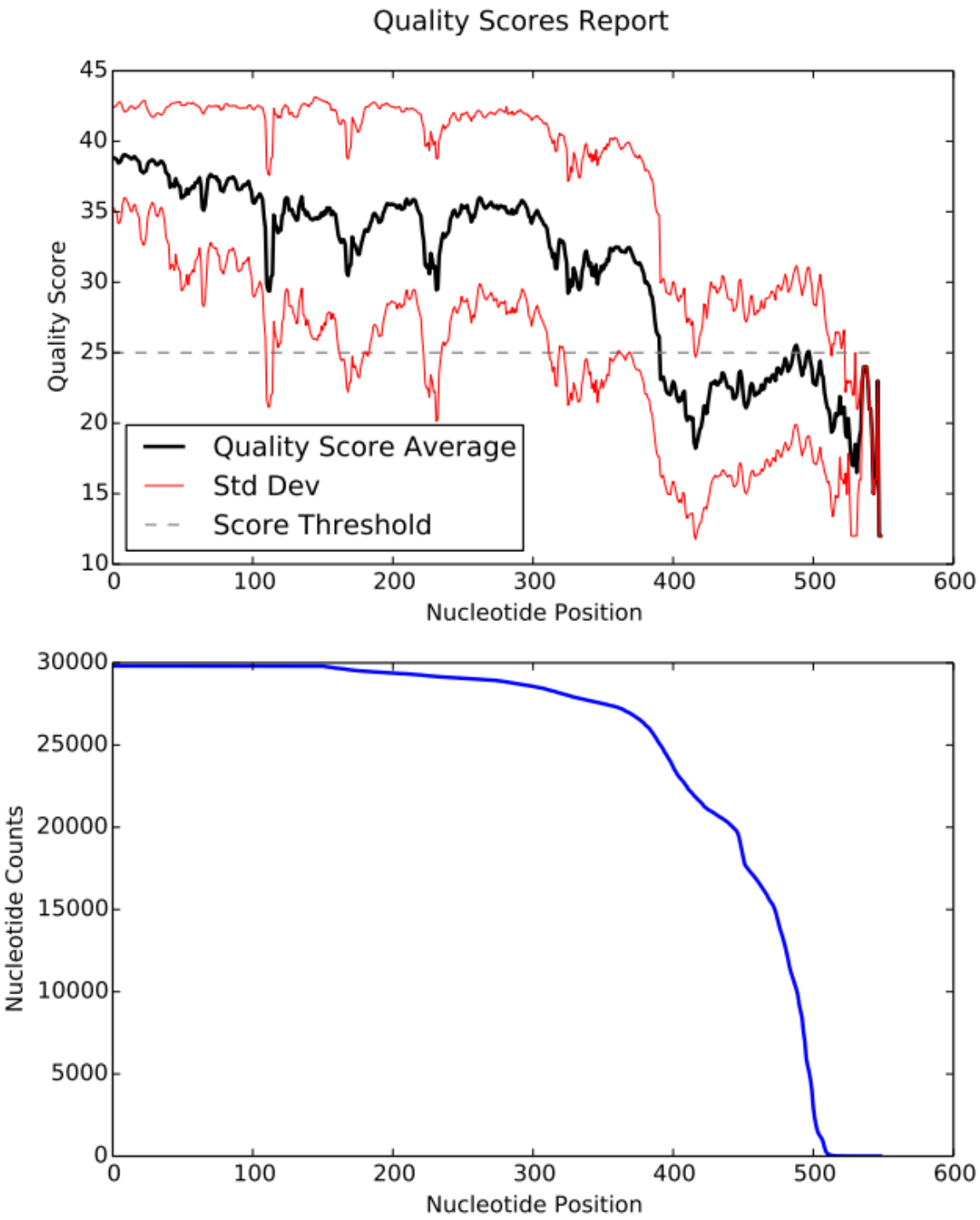
El método utilizado para la cuantificación de Cr(VI) puede emplearse para la detección de Cr(VI) en muestras cuya concentración del mismo se encuentre por encima de 0,0318 ppm y cuantifica con precisión a un 95% de confiabilidad, muestras cuya concentración de Cr(VI) sea igual o mayor a 0,0882 ppm.

ANEXO 5. Extracción de DNA utilizando el kit Soil DNA Isolationnorgen y PowerSoil Isolation DNA



Verificación en gel de agarosa al 0.8% del DNA total extraído a partir de las biopelículas de biocátodo usando dos kits de extracción. Líneas: M. Marcador de tamaño molecular GeneRuler 100pb; 1. DNA del fago λ 50 ng/uL; 2 y 3. DNA extraído a partir de las biopelículas con el kit Soil DNA Isolation Norgen; 4 y5. DNA extraído a partir de las biopelículas con kit PowerSoil DNA Isolation; 6. Control negativo; 7. DNA del fago λ 50 ng/uL.

ANEXO 6. Calidad de las secuencias generadas por pirosecuenciación 454.



ANEXO 7. Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las especies que conforman la biopelícula asociada al cátodo de CCMs reductoras de Cr(VI)

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	Abundancia relativa (%)	
						CCM-H	CCM-PS
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas* spp.	21,73	28,51
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	Rhodococcus	*Rhodococcus globerulus*	8,06	1,54
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	*Flavobacterium* spp.	5,79	0,68
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Delftia*	*Delftia spp.*	5,54	1,72
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum anthropi*	5,12	0,23
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Clostridium*	*Clostridium* spp.	5,10	0,93
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas stutzeri*	5,10	0,12
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Brevundimonas*	*Brevundimonas diminuta*	4,07	3,91
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	*Stenotrophomonas maltophilia*	3,38	0,70
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Myroides*	*Myroides* spp.	3,12	0,21
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas mendocina*	2,86	0,40
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	2,13	0,53
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas agarici*	1,99	0,11
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas nitroreducens*	1,93	0,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Arthrobacter	Micrococcaceae	*Arthrobacter*	*Arthrobacter* spp.	1,93	0,16
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Citrobacter*	*Citrobacter freundii*	1,67	1,02
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	*Actinobaculum*	*Actinobaculum* spp.	1,26	0,93
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Myroides*	*Myroides odoratimimus*	1,19	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum*	1,16	3,12

					lupini		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	*Aeromonas*	*Aeromonas salmonicida*	1,06	0,21
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Agrobacterium*	*Agrobacterium tumefaciens*	1,04	1,82
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus*	*Rhodococcus erythropolis*	0,93	1,32
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*	*Comamonas testosteroni*	0,83	0,05
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	*Megamonas*	*Megamonas* spp.	0,78	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Variovorax*	*Variovorax paradoxus*	0,72	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	0,63	3,21
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Gordoniaceae	*Gordonia*	*Gordonia hydrophobica*	0,63	1,61
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Epulopiscium*	*Epulopiscium* spp.	0,63	0,07
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus*	*Rhodococcus* spp.	0,44	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas putida*	0,40	1,18
Bacteroidetes	sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Sphingobacterium*	*Sphingobacterium siyangensis*	0,40	0,00
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	*Flavobacterium succinicans*	0,37	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas rhizophila*	0,35	0,67
proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Devosia*	*Devosia* spp.	0,35	0,33
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Okibacterium*	*Okibacterium* spp.	0,35	0,14
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Pseudochrobactrum*	*Pseudochrobactrum saccharolyticum*	0,34	3,49
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Escherichia*	*Escherichia fergusonii*	0,31	0,28
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	*Camelimonas*	*Camelimonas* spp.	0,31	0,19
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Coprococcus*	*Coprococcus eutactus*	0,31	0,05
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus*	*Rhodococcus*	0,31	0,00

					coprophilus		
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Devosia*	*Devosia chinhatensis*	0,29	1,25
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Acidovorax*	*Acidovorax delafieldii*	0,29	0,35
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Bosea*	*Bosea thiooxidans*	0,28	0,53
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Rhodobacter*	*Rhodobacter* spp.	0,26	0,65
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Sufflavibacter*	*Sufflavibacter* spp.	0,26	0,11
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	*Leucobacter*	*Leucobacter chromiireducens*	0,25	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Microbacterium*	*Microbacterium oxydans*	0,23	0,12
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Shinella*	*Shinella* spp.	0,21	4,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas nitritireducens*	0,21	1,21
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Yersinia*	*Yersinia massiliensis*	0,20	0,21
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Butyrivibrio*	*Butyrivibrio* spp.	0,20	0,07
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Escherichia*	*Escherichia citrobacter koseri*	0,18	0,21
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Sphingobacterium*	*Sphingobacterium multivorum*	0,15	0,12
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	*Leucobacter*	*Leucobacter* spp.	0,14	0,70
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Fphingobacteriaceae	*Lactococcus*	*Lactococcus* spp.	0,14	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	*Succinispira*	*Succinispira* spp.	0,12	0,23
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Achromobacter*	*Achromobacter bordetella hinzii*	0,12	0,19
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Yersinia*	*Yersinia enterocolitica*	0,12	0,16
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	*Porphyromonas*	*Porphyromonas gulae*	0,12	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Achromobacter*	*Achromobacter* spp.	0,11	0,04
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Telmatospirillum*	*Telmatospirillum* spp.	0,11	0,02
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alishewanella*	*Alishewanella*	0,11	0,00

					jeotgali		
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Simplicispira*	*Simplicispira* spp.	0,09	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas synxantha*	0,06	1,98
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas fragi*	0,06	0,95
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae;	*Ferruginibacter*	*Ferruginibacter* spp.	0,06	0,18
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	*Propionispora*	*Propionispora hippei*	0,06	0,07
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	*Agromyces*	*Agromyces* spp.	0,06	0,02
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus*	*Rhodococcus fascians*	0,06	0,02
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Trabulsiella*	*Trabulsiella citrobacter farmeri*	0,06	0,02
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	*Flavobacterium hydatis*	0,06	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Aquamicrobium*	*Aquamicrobium* spp.	0,05	0,98
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	*Alkaliphilus*	*Alkaliphilus* spp.	0,05	0,54
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	*Bacteroides*	*Bacteroides* spp.	0,05	0,07
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	*Leucobacter*	*Leucobacter komagatae*	0,05	0,05
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	*Flavobacterium frigoris*	0,05	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Clostridium*	*Clostridium sphenoides*	0,05	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Blastomonas*	*Blastomonas* spp.	0,05	0,00
No definido	No definido	No definido	No definido	No definido	No definido	0,03	0,12
Tenericutes	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	*Erysipelothrix*	*Erysipelothrix rhusiopathiae*	0,03	0,12
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Pedobacter*	*Pedobacter* spp.	0,03	0,12
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Clostridium*	*Clostridium celerecrescens*	0,03	0,11
proteobacteria	Alphaproteobacteria	rhizobiales	hyphomicrobiaceae	*Devosia*	*Devosia limi*	0,03	0,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Kerstersia*	*Kerstersia gyiorum*	0,03	0,09
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	*Defluviicoccus*	*Defluviicoccus* spp.	0,03	0,07

Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	*Thalassospira*	*Thalassospira* spp.	0,03	0,02
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*	*Comamonas denitrificans*	0,02	1,25
Proteobacteria	Betaproteobacteria	burkholderiales	comamonadaceae	*Acidovorax*	*Acidovorax facilis*	0,02	1,14
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	*Hyphomonas*	*Hyphomonas neptunium*	0,02	0,46
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	*Methylobacillus*	*Methylobacillus glycogenes*	0,02	0,30
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Rhodobacter*	*Rhodobacter capsulatus*	0,02	0,19
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Acholeplasma*	*Acholeplasma laidlawii*	0,02	0,16
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Chryseobacterium*	*Chryseobacterium caeni*	0,02	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Serratia*	*Serratia grimesii*	0,02	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Papillibacter*	*Papillibacter* spp.	0,00	3,96
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Hydrogenophaga*	*Hydrogenophaga palleronii*	0,00	2,88
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	*Fluviicola*	*Fluviicola* spp.	0,00	2,35
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Alcaligenes*	*Alcaligenes faecalis*	0,00	2,30
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Oscillibacter*	*Oscillibacter* spp.	0,00	0,84
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Phenylobacterium*	*Phenylobacterium* spp.	0,00	0,82
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Arcobacter*	*Arcobacter cryaerophilus*	0,00	0,77
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	*Pseudomonas poae*	0,00	0,77
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Bradyrhizobium*	*Bradyrhizobium elkanii*	0,00	0,54
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinilabiaceae	*Alkaliflexus*	*Alkaliflexus* spp.	0,00	0,53
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	*Janthinobacterium*	*Janthinobacterium lividum*	0,00	0,40
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio*	*Desulfovibrio desulfuricans*	0,00	0,35
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Sphingobacterium*	*Sphingobacterium mizutaii*	0,00	0,33

Verrucomicrobia	Opitutae	Puniceicoccales	Puniceicoccaceae	*Cerasicoccus*	*Cerasicoccus* spp.	0,00	0,32
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	*Proteiniphilum*	*Proteiniphilum* spp.	0,00	0,30
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Achromobacter*	*Achromobacter bordetella avium*	0,00	0,26
Bacteroidetes	Cytophagia;	Cytophagales	Cytophagaceae	*Dyadobacter*	*Dyadobacter ginsengisoli*	0,00	0,26
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Rhodopseudomonas*	*Rhodopseudomonas palustris*	0,00	0,25
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	*Paenibacillus*	*Paenibacillus* spp.	0,00	0,19
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Moryella*	*Moryella* spp.	0,00	0,19
Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae;	*Acholeplasma*	*Acholeplasma modicum*	0,00	0,18
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Pseudobutyrivibrio*	*Pseudobutyrivibrio* spp.	0,00	0,16
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum* spp.	0,00	0,14
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	*Marinospirillum*	*Marinospirillum megaterium*	0,00	0,14
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	*Spirochaeta*	*Spirochaeta* spp.	0,00	0,14
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*	*Comamonas spp.*	0,00	0,14
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Aminobacter*	*Aminobacter aminovorans*	0,00	0,12
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	*Robinsoniella*	*Robinsoniella* spp.	0,00	0,09
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Saccharofermentans*	*Saccharofermentans* spp.	0,00	0,09
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Flavonifractor*	*Flavonifractor* spp.	0,00	0,09
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	*Lewinella*	*Lewinella* spp.	0,00	0,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Pusillimonas*	*Pusillimonas* spp.	0,00	0,09
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Hyphomicrobium*	*Hyphomicrobium* spp.	0,00	0,09
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	*Marinospirillum*	*Marinospirillum* spp.	0,00	0,07
Actinobacteria;	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioidaceae	*Aeromicrobium*	*Aeromicrobium fastidiosum*	0,00	0,07
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	*Dysgonomonas*	*Dysgonomonas* spp.	0,00	0,07

Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	*Proteiniphilum*	*Proteiniphilum acetatigenes*	0,00	0,07
Firmicutes	Bacill	Bacillales	Paenibacillaceae	*Cohnella*	*Cohnella hongkongensis*	0,00	0,07
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	*Paenibacillus*	*Paenibacillus ginsengarvi*	0,00	0,05
Firmicutes	Clostridia	Clostridiale	Veillonellaceae	*Succiniclasticum*	*Succiniclasticum* spp.	0,00	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	*Pseudochrobactrum*	*Pseudochrobactrum* spp.	0,00	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Rhizobium*	*Rhizobium giardinii*	0,00	0,05
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	*Herminiimonas*	*Herminiimonas* spp.	0,00	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Aminobacter*	*Aminobacter spp.*	0,00	0,05
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	*Sporotalea*	*Sporotalea* spp.	0,00	0,05
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*	*Comamonas terrigena*	0,00	0,04
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Escherichia*	*Escherichia coli*	0,00	0,02
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	*Trichococcus*	*Trichococcus collinsii*	0,00	0,02