



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA *Pseudomonas sp.* EN PROCESOS DE
BIORREMEDIACIÓN EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE
MICROBIANA CON METALES PESADOS SINTÉTICOS A
EFECTUARSE EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE
ENERGÍAS ALTERNATIVAS Y AMBIENTE DE LA ESPOCH, 2016**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: ROSA JANETA LONDO

TUTOR: DR. CELSO RECALDE

Riobamba – Ecuador

2018

©2018, Rosa Janeta Londo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: EVALUACIÓN DE LA *Pseudomonas sp.* EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA CON METALES PESADOS SINTÉTICOS A EFECTUARSE EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENERGÍAS ALTERNATIVAS Y AMBIENTE DE LA ESPOCH, 2016, de responsabilidad de la señorita: Rosa Janeta Londo, ha sido prolijamente revisada por los miembros del Tribunal del trabajo de titulación. Quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Celso Recalde

DIRECTOR DEL

TRABAJO DE TITULACIÓN

Dr. Robert Cazar

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Rosa Janeta Londo con Cédula N. ° 060422048-3, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba 14 de noviembre de 2018

Rosa Janeta Londo

C.I. 060422048-3

Yo, Rosa Janeta Londo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Proyecto de Titulación y el patrimonio intelectual del Proyecto de titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ROSA JANETA LONDO

DEDICATORIA

Este trabajo le dedicado especialmente a mi querido hermano José que me apoyó incondicionalmente hasta culminar mis estudios, a mi amada familia; Tía Teresa que ha sido más que una madre, a mi padre Vicente, a mi querido hermano Pablo, a mis queridas hermanas; Eliza y Mercedes que siempre estuvieron conmigo enfrentando juntos las adversidades de la vida para llegar a ser una persona de bien, a mi pareja y a mi hermoso hijo que ha sido mi inspiración para seguir en adelante. A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo en todo momento.

Rosa J.

AGRADEMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por darme la vida; estar presente en este grandioso mundo rodeada de todas aquellas maravillosas personas que me supieron apoyar en esta etapa de culminación de mis estudios, a la institución por fórmanos como excelentes profesionales.

Rosa Janeta Londo

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVOS GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.2. Genero <i>Pseudomonas</i>	6
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.3. Bases Teóricas.....	6
1.3.1. <i>Biorremediación</i>	6
1.3.1.1. <i>Factores a considerar</i>	7
1.3.2. <i>Bioaugmentación o Bioacumulación</i>	8
1.3.3. <i>Biosorción o Bioadsorción</i>	9
1.3.4. <i>Diferencia entre bioacumulación y biosorción</i>	9
1.3.4.1. <i>Tipos de Biosorbentes</i>	11
1.3.4.2. <i>Características para la biosorción</i>	11
1.3.5. <i>Preparación de la bacteria biosorbente</i>	12
1.3.5.1. <i>Biosorbentes modificados genéticamente</i>	13
1.3.5.2. <i>Biosorbentes inmovilizados</i>	14
1.3.6. <i>Procedimientos experimentales de biosorción</i>	15
1.3.6.1. <i>Factores que influyen en la biosorción</i>	15
1.3.7. <i>Celdas de Combustible Microbianas</i>	17
1.3.7.1. <i>Factores influyentes en el desarrollo de la tecnología CCM</i>	18
1.3.7.2. <i>Aportes de las celdas de combustible microbiana en la recuperación de ambientes</i>	19
1.3.8. <i>Pseudomonas en CCMs</i>	20
CAPÍTULO II	
2. METODOLOGÍA.....	22
2.1. Parte experimental.....	22
2.1.1. <i>Lugar y Población de estudio</i>	22

2.2.	Etapas de la Investigación.....	23
2.2.1.	<i>Adecuación y transporte de la Bacteria Pseudomonas sp.....</i>	23
2.2.2.	<i>Identificación morfológica de la cepa bacteriana.....</i>	24
2.2.2.1.	<i>Tinción Gram.....</i>	24
2.3.	Pruebas Bioquímicas de Reconocimiento de Género Bacteriano Pseudomona.....	24
2.4.	Pruebas ensayo previas a la instalación final de las CCMs.....	27
2.4.1.	<i>Procedimiento de la prueba ensayo.....</i>	27
2.4.2.	<i>Preparación del agua residual sintética de los metales pesados a distintas concentraciones para sembrar la Pseudomona aeruginosa.....</i>	28
2.4.2.1.	<i>Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).....</i>	29
2.4.2.2.	<i>Sulfato de zinc (ZnSO₄).....</i>	29
2.4.2.3.	<i>Nitrato de plomo Pb(NO₃)₂.....</i>	31
2.4.3.	Cálculos Utilizados.....	31
2.4.3.1.	<i>Cálculos de medios de cultivo para la reactivación de la Pseudomonas sp.....</i>	31
2.4.3.2.	<i>Cálculos de la solución madre de los metales pesados.....</i>	31
2.4.3.3.	<i>Cálculos de las concentraciones de los metales pesados.....</i>	32
2.4.3.4.	<i>Concentración del metal por la técnica de colorimetría.....</i>	33
2.5	Configuración de las Celdas de Combustible Microbianas.....	33
2.5.1.	<i>Pretratamiento de las Membranas de Intercambio Aniónico.....</i>	34
2.5.2.	<i>Implementación de las CCMs para la producción de bioelectricidad.....</i>	35
2.5.2.1.	<i>Reactivación de la Pseudomona aeruginosa.....</i>	35
2.5.2.2.	<i>Preparación del agua residual sintética de metal plomo.....</i>	35
2.5.2.3.	<i>Implementación del sistema de adquisición de datos para el monitoreo de las CCMs.....</i>	37
2.5.3.	Técnicas de análisis de metales.....	39
2.5.3.1.	<i>Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama “EAA”.....</i>	39
2.5.3.2.	<i>Colorimetría.....</i>	39
2.5.4.	Lugar experimental.....	39
2.5.5.	Materiales Experimentales.....	39
2.6.	Planteamiento de Hipótesis.....	41
2.6.1.	<i>Hipótesis Textual.....</i>	41
2.6.2.	<i>Hipótesis Estadística Causal Bivariada.....</i>	41

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.1.	Tinción Gram.....	43
3.2.	Pruebas bioquímicas.....	43

3.3.	Prueba ensayo previas a la instalación final de las CCMs.....	44
3.3.1.	<i>Análisis del agua residual sintética con metales pesados de la prueba ensayo.....</i>	44
3.4.	Biosorción del metal Plomo por la <i>Pseudomona aeruginosa</i>.....	46
3.5.	Producción de bioelectricidad.....	47
3.5.1.	<i>Adquisición de datos mediante el Software LabVIEW para la producción de bioelectricidad.....</i>	46
3.6.	Análisis estadístico descriptivo.....	48
3.6.1.	<i>Test de Duncan.....</i>	49
3.7.	Discusión de Resultados.....	50
3.7.1.	<i>Prueba de Hipótesis.....</i>	52
3.7.1.1.	<i>Hipótesis Estadística Causal Multivariada.....</i>	52
3.7.1.2.	<i>Análisis de normalidad.....</i>	52
3.7.1.3.	<i>Análisis de homocedasticidad.....</i>	53
3.7.1.4.	<i>Pruebas paramétricas.....</i>	53
	CONCLUSIONES.....	54
	RECOMENDACIONES.....	55
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Resultados importantes de literatura sobre la biosorción de metales por diferentes especies de la <i>Pseudomonas</i>	5
Tabla 2-1:	Comparación de los mecanismos de biosorción y bioacumulación.....	10
Tabla 1-2:	Características de los medios de cultivo.....	26
Tabla 2-2:	Concentraciones de los metales pesados.....	32
Tabla 3-2:	MATERIALES Y EQUIPOS.....	40
Tabla 1-3:	Resultado de pruebas bioquímicas para identificación de la bacteria.....	43
Tabla 2-3:	Interacción de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Metales Pesados.....	44
Tabla 3-3:	Análisis del agua residual sintética del metal plomo de las CCMs.....	45
Tabla 4-3:	Base de datos sobre la producción de bioelectricidad en las CCMs.....	46
Tabla 5-3:	Generación de voltaje de acuerdo a sus medias, mínimos y máximos.....	48
Tabla 6-3:	Análisis de medias de voltaje para la variable día en la Producción de Bioelectricidad.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Vista Lateral de una celda de combustible tipo membrana de intercambio protónico.....	18
Figura 2-1:	Celda de combustible microbiano de Biocatodo.....	20
Figura 1-2:	Planos de las celdas de combustible microbiano.....	34

INDICE DE GRÁFICOS

Figura 1-2:	Producción de bioelectricidad.....	47
--------------------	------------------------------------	----

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2:	Población de estudio. Celdas de Combustible Microbianas.....	23
Fotografía 2-2:	Crecimiento de la <i>Pseudomonas sp</i>	23
Fotografía 3-2:	Realización de pruebas bioquímicas.....	25
Fotografía 4-2:	Crecimiento de la <i>Pseudomona</i> en medio líquido.....	28
Fotografía 5-2:	Crecimiento de la <i>Pseudomana</i> en medio solido.....	28
Fotografía 6-2:	Preparación del Dicromato de potasio.....	29
Fotografía 7-2:	Preparación de la solución y siembra de las bacterias en el sulfato de zinc....	30
Fotografía 8-2:	Pretratamiento de la fibra de carbono.....	34
Fotografía 9-2:	Siembra de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> en agar cerebro corazón.....	35
Fotografía 10-2:	Pasos de la construcción de las CCMs.....	37
Fotografía 11-2:	Implementación DAQ 6900.....	38
Fotografía 12-2:	Alimentación con agua residual sintética preparada.....	38
Fotografía 1-3:	Observación de la cepa bacteriana en el microscopio.....	43

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A.** Identificación de la especie de *Pseudomonas sp.*
- ANEXO B.** Interacción entre metales pesados sintéticos a diferentes concentraciones con la *Pseudomonas sp.*
- ANEXO C.** *Pseudomona sp.* en una Celda de Combustible Microbiana para producir bioelectricidad.

INDICE DE ABREVIATURAS

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
UNACH	Universidad Nacional de Chimborazo
ICITS	Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes
CEAA	Centro de Energías Alternativas y Ambiente
mL	Militros
CCMs	Celdas de combustible microbianas
V	Voltios
°C	Grados Celsius
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potasio
ZnSO₄	Sulfato de zinc
Pb(NO₃)₂	Nitrato de plomo
Cr	Cromo
Zn	Zinc
Pb	Plomo
g	Gramos
mg	Miligramos
L	Litros

RESUMEN

Se evaluó la capacidad que tiene la *Pseudomona aeruginosa* en la biosorción de metales tales como el Cromo, Zinc y Plomo y en celdas de combustible microbiana para producción de bioelectricidad en el Centro de Investigación de Energías Alternativas y Ambiente (CEAA) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. La cepa fue donada por parte del ICITS-UNACH. Las concentraciones estudiadas fueron de 0,5 a 2 de Cromo; 5 a 20 de Zinc y 5 a 20 de plomo (mg/L). Se pudo observar que el pH de la solución y la técnica de análisis fueron factores muy importantes en el rendimiento y capacidad de biosorción de la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa*. Los resultados obtenidos en los ensayos muestran que la bacteria tiene mayor capacidad de biosorción por el Plomo; con un promedio de 36,64% a la concentración más alta del metal en comparación a sus similares Cromo y Zinc respectivamente; considerando que fue una técnica biológica de biorremediación en medio líquido sintético. Se construyeron celdas de combustible microbianas con las cepas de bacterias aisladas y como sustrato se utilizó $Pb(NO_3)_2$, la celda de un volumen total de 125 mL consistía de dos cámaras separadas por tejido de fibra de carbono. Conforme el metal sintético Pb se absorbía por la bacteria en el interior de la Celda de Combustible Microbiana; ésta producía bioelectricidad; la cantidad de voltaje generado fue relativamente proporcional a la cantidad de metal suministrada y se registró en voltios mediante un sistema de adquisición de datos DAQ 6900 directamente hacia un ordenador. Se recomienda el estudio y experimentación de Celdas de Combustible Microbianas en procesos de biorremediación ambiental que involucren una contaminación por industrias que utilicen metales pesados dentro de sus procesos; como es el caso de la minería, la metalurgia, galvanoplastia, industrias petroquímicas, industrias de cueros y/o curtiembres.

Palabras Clave: <BIORREMEDIACIÓN>, <BIOSORCIÓN> <PSEUDOMONAS>, <METALES PESADOS>, <CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS>, <BIOELECTRICIDAD>.

ABSTRACT

It was evaluated, the capacity of *Pseudomona aeruginosa* in biosorption as a process for the bioremediation of metals such as chromium, zinc and lead and in microbial fuel cells for the production of bioelectricity at the Center for Research on Alternative Energies and Environment (CEAA) of the Superior Polytechnic School of Chimborazo. The strain was donated by ICITS-UNACH. The concentrations studied ranged from 0.5 to 2 chromium; 5 to 20 zinc and 5 to 20 lead (mg/L). It was observed that the pH of the solution and the analysis technique were very important factors in the yield and biosorption capacity of the isolated strain of *Pseudomona aeruginosa*. The results obtained in the tests show that the bacterium *Pseudomona aeruginosa* has a higher capacity for biosorption by lead; with an average of 36, 64% at the highest concentration of the metal compared to its similar Cr and Zn respectively; considering that it was a biological technique of bioremediation in synthetic liquid medium. Microbial fuel cells were constructed with strains of bacteria isolated and as substrate was used: lead nitrate, the cell of a total volume of 125 mL consisted of two chambers separated by carbon fiber tissue. As the synthetic lead metal was absorbed by the bacteria inside the Microbial Fuel Cell; it produced bioelectricity; the amount of voltage generated was relatively proportional to the amount of metal supplied and recorded in volts by a DAQ 6900 data acquisition system; directly to a computer. It is recommended the study and experimentation of Microbial Fuel Cells in environmental bioremediation processes that involve a contamination by industries that use heavy metals within their processes; as is the case of mining, metallurgy, electroplating, petrochemical industries, leather industries and / or tanneries.

Keywords: <BIOREMEDIATION>, <BIOSORPTION>, <PSEUDOMONA>, <HEAVY METALS>, <MICROBIAL FUEL CELLS >, <BIOELECTRICITY>.

INTRODUCCIÓN

Debido a la contaminación ambiental generada por fuentes naturales como antropogénicas, especialmente por las actividades mineras e industriales, tenemos a los metales pesados considerando que la presencia de estos en el ambiente tiene efectos negativos, especialmente en el recurso agua, estos metales pesados generalmente ocasionan graves daños a todo ser viviente (Zhou *et al.* 2000), cuando se piensa en un sistema de tratamiento para metales pesados; se considera tratamientos biológicos; por el hecho de que la presencia de las sales de los metales pesados son solubles en agua y como consecuencia podrían ser separados por tratamientos físicos-químicos costosos (Hussein, *et al.*, 2004). Siendo además estos procesos ineficaces, especialmente cuando los iones de metales pesados están en soluciones disueltas (Volesky y Holan, 1995).

Los métodos biológicos han llamado la atención de la comunidad científica por la variedad de métodos detoxificantes de metales pesados. Dentro de ellos, la biosorción representa una alternativa técnica y económicamente viable para la eliminación de los metales pesados la misma que puede llegar a ser una opción atractiva por encima de los tratamientos físico-químico (Kapoor y Viraraghvan, 1995). Para este proceso de biorremediación por biosorción es una de las tecnologías más prometedoras ya que participa en la eliminación de metales pesados en determinados flujos residuales de origen industrial. Es una alternativa potencial biológica que reemplazaría a los procesos convencionales para la eliminación de metales a través de la biosorción, opción económicamente viable frente a los procesos convencionales debido al uso de un material microbiológico absorbente de bajo costo y la reutilización de la misma (Shumate y Strandberd, 1985) y (Volesky, 2003). Los estudios de viabilidad para aplicaciones a gran escala demostraron que los procesos de biosorción son más aplicables con microorganismos para la captación del metal, que se puede dar con biomasa viva o muerta (Zhou *et al.*, 1991).

Desde hace décadas se sabe que los microorganismos son capaces de biosorber metales pesados en su estructura y generar electricidad. Las celdas de combustible microbianas (CCMs), un nombre que se le ha dado al sistema que aprovecha esta característica de los microorganismos. El propósito de este sistema no será competir con las tecnologías existentes para la generación de electricidad a gran escala, sino tratar el agua residual y obtener durante el proceso un producto de valor agregado. (Rabaey *et al.*, 2010). Bajo las condiciones adecuadas de desarrollo tecnológico, este tipo de procesos podría no solamente ser empleado a gran escala para el tratamiento de las aguas residuales de una ciudad o industria, sino también sería factible a pequeña escala en comunidades y barrios aislados del país. Ante lo mencionado surge la siguiente interrogante ¿las celdas de combustible microbiano

serán capaces de biorremediar la carga de metales pesados en aguas residuales y generar electricidad?.

Por esta razón la biosorción de Cr, Zn y Pb por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* (Calderón, et al., 2016), en muestras de agua residual sintética y posteriormente introducida en celdas de combustible microbianas ha sido estudiada. Se encontró que para todos los casos las concentraciones de metales pesados disminuyeron con el tiempo; la bacteria fue utilizada como biosorbente reteniendo los metales pesados en marcos de tiempo relativamente cortos en contacto con estas soluciones de metales. En el proceso de biosorción, la biomasa es capaz de extraer fácilmente de los sistemas acuosos los metales presentes en el mismo, dando como resultado deshacer los metales del lugar contaminado. Este trabajo de investigación busca estudiar la biosorción de estos iones de metales pesados por *Pseudomona aeruginosa*, en una celda de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad a medida que se realiza su proceso de biorremediación.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los metales pesados se ha constituido en una de las formas más peligrosas para los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo acumulables en los tejidos animales, vegetales acuáticos, y además permaneciendo en ellos por largos períodos, ocasionando procesos de biomagnificación y acciones toxicodinámicas, generando alteraciones metabólicas, mutaciones y transformaciones anatómicas en las especies animales, incluyendo al hombre (García & Moreno, 2008); cabe resaltar que la vida acuática puede perturbarse a partir de 0.1 mg/L, pudiendo los efectos tóxicos manifestarse en los peces a partir de un 1 mg/L. No obstante, la acción tóxica es variable según las especies y el grado de mineralización del agua, conocidos como efectos de bioacumulación y biomagnificación.

Tomando en cuenta que en el Ecuador esta situación no es diferente observando un deterioro significativo en los ecosistemas, en suelos, agua y aire, ocasionado por las industrias acentuadas dentro del área de influencia directa. Esta investigación se realiza a partir de trabajos previos de aislamiento de cultivos puros de la *Pseudomonas sp.*, realizado por el Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes de la Universidad Nacional de Chimborazo años atrás, contrarrestando estos contaminantes tóxicos, en una celda de combustible microbiana con *Pseudomonas sp.*, ofreciendo una alternativa biológica para el tratamiento de metales pesados, con mecanismos económicos y sencillos que tenga como referencia establecer un método válido, con la finalidad de generar información confiable, que pueda utilizarse para futuros proyectos en la recuperación de suelos y aguas a escala industrial de forma eficiente y que sea amigable con el ambiente; además como valor agregado la obtención de electricidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la *Pseudomonas, sp.* en procesos de biorremediación en una celda de combustible microbiana con metales pesados sintéticos en el centro de investigación de energías alternativas y ambiente de la ESPOCH, 2016.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la especie de *Pseudomonas sp.* potencialmente utilizada en la biorremediación de metales pesados.
- Analizar la interacción entre metales pesados sintéticos a diferentes concentraciones a través de la *Pseudomonas sp.*
- Incorporar y monitorear la Cepa de *Pseudomona* en una Cámara o Celda de Combustible Microbiana para producir bioelectricidad

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la Investigación:

A principios de 1980 se observó la capacidad de algunos microorganismos para acumular elementos metálicos. Numerosos informes de investigación han publicado desde los puntos de vista toxicológico, haciendo referencia a la capacidad de acumulación debido al metabolismo activo de las células vivas, los efectos de los metales en las actividades metabólicas de la célula microbiana y las consecuencias de la acumulación en la cadena alimenticia (Volesky, 1987). Sin embargo investigaciones posteriores han revelado que la biomasa microbiana inactiva/muerta puede unir pasivamente los iones metálicos a través de diversos mecanismos físico-químicos. Con este nuevo hallazgo la investigación sobre la biosorción se volvió activa con numerosos biosorbentes de diferentes orígenes propuestos para la eliminación de metales.

Según investigaciones han empleado métodos abióticos y bióticos para la eliminación de metales pesados del medio acuoso. Los métodos abióticos aplicados frecuentemente incluyen precipitación química, reducción química, adsorción de carbón, intercambio iónico, extracción con solvente, ósmosis inversa, proceso de membrana, evaporación y procesos electroquímicos. Estos métodos se consideran ineficaces debido a algunas restricciones técnicas, como la producción de lodo, la complejidad operativa o las limitaciones económicas (Crini_2006). Por lo tanto, las investigación se ha centrado en los métodos bióticos debido a sus aplicaciones potenciales en la protección del medio ambiente y la recuperación de metales pesados tóxicos (Chang *et al.*, 1997).

Entre los diferentes métodos bióticos, se ha demostrado que la bioacumulación y la biosorción poseen un buen potencial para la eliminación de metales (Volesky y Holan, 1995 ; Das *et al.*, 2008). La bioacumulación es la absorción activa de sustancias tóxicas por las células vivas, sin embargo, el mecanismo de biosorción es la absorción pasiva de sustancias tóxicas por materiales biológicos muertos / inactivos. Los biomateriales microbianos vivos y muertos han ofrecido una alternativa económica potencial a los absorbentes convencionales (Lo *et al.*, 2014).

Según investigaciones han identificado como biosorbentes metálicos potentes a las bacterias del grupo de las *Pseudomonas* (Chang *et al.*, 1997 ; Uslu y Tanyol, 2006). La (Tabla 1-1) muestra información acerca de la biosorción de metales pesados a través de las diferentes especies de *Pseudomona*; en este proceso de biosorción influye fuertemente el pH de la solución; el mismo que puede ser operado en una amplia gama de condiciones de pH.

Tabla 1-1: Resultados importantes de la literatura sobre la biosorción de metales por diferentes especies de la *Pseudomona*

Metal	Organismo	Condiciones de Operación		Biosorción %	Referencias
		pH	T °C		
Aluminio y Cromo ⁺⁶	<i>Pseudomonas sp.</i>	4.0	N.A	95.0	Ziagova et al., 2007
Cobre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.0	N.A	23.1	Chang et al., 1997
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	7.0	30	65.3	Savvaidis et al., 2003
	<i>Pseudomonas putida</i>	6.0	N.A	6.6	Uslu and Tanyol, 2006
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5.0	25	22.9	Nakajima et al., 2001
Cadmio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.0	NA	42.4	Chang et al., 1997
	<i>Pseudomonas putida</i>	6.0	NA	8.0	Pardo et al., 2003
	<i>Pseudomonas sp.</i>	7.0	NA	78.0	Ziagova et al., 2007
Hierro ⁺³	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.5	NA	79.5	Chang et al., 1997
	<i>Pseudomonas putida</i>	5.5	25	70.4	Uslu and Tanyol, 2006
Zinc	<i>Pseudomonas putida</i>	7.0	NA	6.9	Pardo et al., 2003
	<i>Pseudomonas sp.</i>	5.0	30	17.7	Chen et al., 2005

Fuente: (Singh, y Kirrolia, 2013)

Los metales son ampliamente utilizados en varias industrias, incluyendo la minería, la metalurgia, y galvanoplastia. La presencia de iones metálicos en los efluentes industriales finales es extremadamente indeseable, por el hecho de que son tóxicos para los organismos inferiores y superiores. De aquí la importancia del estudio de procesos de biorremediación vinculándose con una celda de combustible microbiana con el propósito de producir bioelectricidad, ya que metales tales como el mercurio, plomo, cadmio y cromo (VI) son considerados como tóxicos; mientras que, otros, como el cobre, el níquel, cobalto y zinc no son tan tóxicos, pero su amplio uso y aumento de los niveles en el medio ambiente son de gran preocupación (Macaskie et al., 2009).

1.2. Genero *Pseudomonas*

Es un grupo muy diverso cuya taxonomía se ha simplificado gracias al RNA 16. Las *Pseudomonas* son bacilos gram negativos, móviles y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. Las *Pseudomonas* tienen una amplia distribución en el suelo, agua, plantas y los animales. Este género puede desarrollarse y crecer en medios líquidos observándose así la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas.

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Su clasificación pertenece científicamente al dominio filo: proteobacteria; clase: gamma proteobacteria; orden: Pseudomonadales; familia: Pseudomonadaceae; genero: Pseudomona; especie *P. aeruginosa*. Hablando de esta especie es termófila, organismo ubicuo que prospera en condiciones difíciles y es resistente a los iones metálicos, los iones metálicos juegan un papel fundamental en la formación de biofilm.

1.3. Bases Teóricas

1.3.1. Biorremediación

Consiste en cualquier técnica que involucre la utilización de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) o plantas, para restaurar o remediar ambientes contaminados, transformando contaminantes orgánicos en compuestos más simples ya sea por atenuación natural, bioacumulación o bioestimulación; a diferencia de los sistemas de depuración esta técnica no utiliza métodos físico-químicos. Su aplicación es muy amplia considerándose como objeto para cada una de los estados de la materia (Rojas, 2011).

La biorremediación puede implicar los siguientes parámetros:

- Características del contaminante
- Optimización microbiológica
- Tecnología Aplicada in situ vs ex situ combinaciones
- Métodos Analíticos
- Muestreo
- Regulación Legal Vigente.

La biorremediación tiene inconvenientes y limitaciones como cualquier otra técnica. Por ejemplo la biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos, con un poder contaminante similar o mayor al producto inicial, de igual forma el tiempo necesario para llevar a cabo el tratamiento respectivo puede ser difícil de predecir; sin embargo entre los tipos de biorremediación se puede indicar que el mejor para efectuar una biodegradación de metales pesados es sin lugar a duda el proceso de bioacumulación en donde se utiliza materia muerta y biosorción cuando se utiliza materia viva.

Al utilizar materia viva los microorganismos degradan los desechos en productos menos tóxicos, además de concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas, metales, minimizando los desechos industriales rehabilitando áreas afectadas por contaminantes.

1.3.1.1. Factores a considerar

Para la aplicabilidad de la técnica de biorremediación se tiene que considerar varios factores:

- La biodegradabilidad de los contaminantes. Las cadenas ramificadas de algunos contaminantes son más difíciles de degradar que las cadenas lineales; de igual forma contaminantes que presenten en su composición dobles enlaces hacen a la molécula más resistente así como un incremento del número de anillos bencénicos; entre estas sustancias químicas están (ácidos dicarboxílicos, nitrilos, metilaciones y halogenaciones; por otra parte la biodegradación de compuestos que contienen N o S se asocia frecuentemente como un nutriente más que un contaminante
- Presencia de comunidades microbianas adecuadas con capacidades enzimáticas para metabolizar compuestos. De aquí se puede mencionar dos principalmente: Microorganismos autóctonos (biorremediación intrínseca) y Microorganismos añadidos al sistema para mejorar la degradación (bioaumentación y biosorción)

- Biodisponibilidad del contaminante. Es un factor importante ya que para que la degradación pueda producirse es necesario que interactúe en un medio acuoso o líquido, que en su inicio lo hará por contacto en su pared celular exterior para luego ser transportado al interior de la misma; siendo la forma más común el transporte por complejación con enzimas extracelulares.

1.3.2. Bioaugmentación o Bioacumulación

Algunas líneas investigativas han llevado a cabo la utilización de microorganismos incluso modificados genéticamente en el medio contaminante con el fin de mejorar la biodegradabilidad (Walter y Unterman, 1997) es lo que se llama el método de bioaugmentación o bioacumulación; esta técnica por lo general funciona en condiciones de laboratorio o en medios externos a través de bioreactores que de igual forma su implementación depende de varios factores:

- El tamaño de la población microbiana. Esta dependerá y crecerá rápidamente de acuerdo a los valores de los contaminantes haciéndose difícil e imposible incrementar la población más allá de los valores establecidos e iniciales de la carga contaminante.
- Capacidad de carga. Generalmente la capacidad de carga de los ambientes contaminados viene determinado por una serie de factores a más del que se espera biorremediar como la presencia de toxinas, nutrientes, movilidad y la presencia de abundante materia orgánica.
- Población autóctona. Los microorganismos incorporados deben tener la capacidad de sobrevivir con sus posibles depredadores y competir además con éxito antes de ocupar los nichos potenciales.
- En definitiva los ambientes y los consorcios microbianos más selectivos favorecerán el proceso de bioacumulación.

En el Mercado hoy en día existen productos comerciales ensayados en laboratorio con un gran potencial de biodegradación (Díaz et al., 2013); sin embargo el utilizar microorganismos indígenas aislados de sitios contaminados y posteriormente cultivados es especialmente más efectivo además cuando se acompaña de un suplemento nutricional y oxígeno; por otra parte el utilizar microorganismos modificados genéticamente podrá en el futuro permitir abordar con éxito la degradación a escala real de compuestos que por sus características químicas son resistentes. (Timmis y Pieper, 2016)

1.3.3. Biosorción o Bioadsorción

La biosorción es un proceso independiente del metabolismo responsable del secuestro selectivo de iones de metales pesados u otras moléculas en ciertos materiales biológicos. (Shumate y Strandberd,

1985). Esta técnica tiene una gran atención debido a su uso sin una gran demanda económica y por la realización en medios líquidos como aguas residuales. (Gadd y Cardew, 1989). La biosorción de metales pesados suele caracterizarse en tres categorías principales:

1. La unión superficial de la célula actuante
2. La acumulación intracelular
3. Acumulación extracelular

Independientemente de su metabolismo, la unión de la superficie celular puede ocurrir en microorganismos vivos o inactivos; mientras que la acumulación intra y extracelular suelen ser un proceso impulsado por la energía y ocurre solamente con células vivas. El campo de la biosorción de metales pesados revisado por (Volesky y Holan, 1995a) mencionan que la capacidad de biosorción considerado ya para un tratamiento de aguas residuales debe ser minuciosamente identificado el uso de las cepas microbianas capaces de captar metales pesados con eficiencia y especificidad; elaborando procesos que eliminen o recuperen los metales de los sistemas acuáticos; que para el criterio de esta investigación se puede desarrollarse con el uso de celdas de combustible microbiano dentro de su proceso de biosorción de iones metálicos.

La especiación, el comportamiento, transporte y el destino decisivo de los metales pesados en los ecosistemas instintivos dependen principalmente de las poblaciones microbianas (Vijayaraghavan y Yun, 2008). De las diferentes poblaciones microbianas, la biomasa bacteriana ha sido uno de los biosorbentes más importantes para el metal teniendo como efecto la eliminación y desintoxicación; por lo tanto la biosorción de metales con bacterianas ha recibido un interés científico e investigativo en estudios experimentales (Daughney, et al., 1998). Para comprender mejor el complejo proceso de la biosorción, los estudios se han dirigido a la estructura de la superficie celular, como también a la identificación de la biomasa utilizada.

1.3.4. Diferencia entre bioacumulación y biosorción

La bioacumulación se define como el fenómeno de las células vivas; mientras que, los mecanismos de biosorción se basan en el uso de la biomasa muerta o viva. Para ser precisos, la bioacumulación puede definirse como la absorción de agentes tóxicos por las células vivas. La sustancia tóxica que se transporta a la célula, se acumula intracelularmente, a través de la membrana y a través del ciclo metabólico celular (Vullo, 2003). A la inversa, la biosorción en cambio se puede definir como la absorción pasiva de tóxicos por materiales biológicos muertos o activos o por materiales derivados de fuentes biológicas. El proceso de biosorción es debido a una serie de procesos de metabolismos independientes que tienen lugar esencialmente en la pared celular, donde los mecanismos

responsables para la captación de los contaminantes eran diferentes en función del tipo de biomasa. En definitiva la biosorción posee ciertas ventajas inherentes sobre los procesos de bioacumulación, que se enumeran a continuación en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Comparación de los mecanismos de biosorción y bioacumulación

Características	Proceso de Biosorción	Proceso de Bioacumulación
Costos	Normalmente bajos; involucra principalmente transporte y otros gastos de procesamiento simples.	Generalmente altos; involucra en todo el proceso la utilización constante de células vivas por lo tanto, el mantenimiento celular es propenso a los costos.
pH	Influye fuertemente en la capacidad de absorción de la biomasa. Sin embargo, puede ser operado bajo una amplia gama de condiciones de pH.	Además de la captación, las células vivas son fuertemente afectadas en condiciones extremas de pH.
Temperatura	La temperatura no influye en el proceso.	La temperatura afecta gravemente al proceso
Mantenimiento Almacenamiento	Fácil de almacenar y usar	La energía metabólica es necesaria para el mantenimiento del cultivo
Selectividad	Pobre. Sin embargo puede mejorarse mediante la modificación de la biomasa	Mejor que la biosorción
Versatilidad	Razonablemente buena. Los sitios de unión pueden acoplarse a una variedad de iones.	No muy flexible. Propenso a verse afectado por sales de los metales.
Grado de absorción	Muy alto. Casi tan alto como el peso de la biomasa en seco.	Debido a que las células vivas son sensibles, la captación es generalmente baja.
Tasa de absorción	La mayoría de los mecanismos de biosorción son rápidos.	Más lento que la biosorción. Ya que la acumulación intracelular requiere mucho tiempo.
Afinidad tóxica	Alta en condiciones favorables	Depende de la toxicidad del contaminante.

Regeneración y reutilización	Alta posibilidad de regeneración de adsorbentes, con posibilidad de reutilización por número de ciclos.	Dado que la mayoría de los tóxicos se acumulan intracelularmente, las posibilidades son muy limitadas.
Recuperación de tóxicos	Con la selección apropiada del eluyente, es posible la recuperación de tóxicos.	Incluso si fuese posible, la biomasa no podría utilizarse para el siguiente ciclo.

Fuente: (Marrero, et al., 2010)

La biosorción o bioadsorción es la acumulación o atrapamiento pasivo y no específico de algunas sustancias especialmente metales tóxicos en las estructuras externas de las células por material biológico (vivo o muerto). Este proceso es independiente del metabolismo celular (Tandazo, 1997). Es uno de los enfoques de bioremediación de metales actualmente empleados y consiste básicamente en procesos de pseudo-intercambio iónico y/o adsorción: los iones metálicos son retenidos en la biomasa por componentes de carga opuesta. Este mecanismo pasivo reduce los costos de remediación, ya que no implica adición de nutrientes, al no requerir un metabolismo activo.

1.3.4.1. Tipos de Biosorbentes

Los biosorbentes para la eliminación de metales son de biomateriales, incluidas bacterias, hongos, algas, productos industriales y desechos agrícolas. En general, todos los tipos de biomateriales han mostrado buenas capacidades de biosorción hacia todos los tipos de iones metálicos, incluyendo géneros de *Bacillus* (Nakajima y Tsuruta, 2004), *Pseudomonas* (Chang y Chang, 1997) (Walter y Unterman, 1997) y *Streptomyces* (Cañizares y Villanueva, 2000). También biosorbentes de hongos importantes incluyen *Aspergillus*, *Rhizopus* (Volesky y Holan, 1995) y *Penicillium* (Sánchez, et al., 2014), etc. Dado que estos microorganismos se utilizan ampliamente en las industrias de alimentos y farmacéuticas, que se generan como residuos, estos se pueden conseguir gratis o a bajo costo a partir de estas industrias.

1.3.4.2. Características para la biosorción

Una de las características de la biosorción es que es un proceso de remoción de los contaminantes muy rápida, pero dependiente de los factores del entorno, por ejemplo, Sánchez, et al., (2014) mencionan que a pH 5,0 se presentó la mayor tasa de biosorción de plomo (85%) en los primeros cinco minutos por parte de la biomasa seca de *Saccharomyces cereviceae*, y que en valores de pH inferiores o superiores a éste, la biosorción de plomo disminuye (Atkinson y Dash, 1998). Su eficacia depende de las características químicas del metal, la concentración de éste, la temperatura, el pH del medio, la presencia de otros cationes y aniones.

Cuando se utiliza la biomasa activa tiene la ventaja que se renueva por sí sola, los productos metabólicos excretados pueden contribuir a una mayor eliminación de metales y el transporte

intracelular da mayor capacidad acumuladora. Cuando se emplea la biomasa inactiva se evita problemas de toxicidad, la biosorción se realiza en las membranas celulares (no conlleva transporte), con lo que es más rápida, es más barata y la recuperación de metales es más sencilla (sin destrucción celular). Debido a la naturaleza de los componentes celulares, son varios los grupos funcionales que están presentes en la pared celular bacteriana, como son los grupos carboxilo, fosfato, amina e hidroxilo (Eleonora, 2016). Como están cargadas negativamente y abundantemente disponibles, los grupos carboxilo participan activamente en la unión de los cationes metálicos.

Según experimentos varias moléculas de colorantes, que existen como cationes de color en soluciones, son también atraídas hacia el carboxilo y otros grupos de cargas negativas, indicaron que el grupo carboxilo y el grupos de peptidoglicano de la pared celular de la bacteria *Streptomyces pilosus* es la responsable de la unión del cobre, además, los grupos amina son muy eficaces en la eliminación de iones metálicos (Hernández, 2003). Yang, et al., (2016) observó que los grupos amina a pH 3 se atraían por interacción electrostática al metal de carga positiva. En general, el aumento del pH aumenta la carga negativa total en la superficie de las células hasta que los grupos funcionales relevantes son desprotonados, lo que favorece la atracción electroquímica y adsorción de cationes. Los aniones interactúan más fuertemente con las células con concentración de cargas positivas, debido a la protonación. Las diferentes especies químicas de un metal que se producen con cambios de pH tendrán cargas variables y adsorbilidad en las interfaces sólido-líquido. En muchas instancias, los experimentos de biosorción conducidos a altos valores de pH alcalinos han complicado la evaluación del potencial biosorbente como resultado de la precipitación del metal (Kotrba, et al., 2011)

1.3.5. Preparación de la bacteria biosorbente

Como la absorción se realiza principalmente en la superficie de la biomasa se ésta activando los sitios de unión en la superficie siendo un enfoque eficaz para mejorar la capacidad de biosorción. Los procedimientos de modificación química incluyen pretratamiento, mejorando la unión del sitio, modificación de la unión del sitio y polimerización. Pretratamientos químicos comunes incluyen ácido, alcalino, etanol y acetona de la biomasa (Alicia., et al, 2016). El éxito de un pretratamiento químico depende en gran medida de los componentes celulares de la propia biomasa. En muchos casos, el pretratamiento ácido ha tenido éxito; esta es porque algunas de las impurezas e iones que bloquean la unión pueden ser fácilmente eliminados (Méndez y Vilas, 2007).

Observaron que la capacidad de captación del metal (Cu^{2+} y Ni^{2+}) por parte de *Pseudomonas Aeruginosa* liofilizadas mejoró cuando se pretrató con NaOH, o tolueno; mientras que los tratamientos con ácido y acetona eran inhibidores. Incluso aunque estos pretratamientos químicos

son casi esenciales para la mayoría de los biosorbentes, especialmente de los desechos industriales grandes la mejora en la capacidad de biosorción no siempre se puede esperar. Por el contrario, la mejora o modificación de los sitios de unión en una biomasa parece mejorar las capacidades de biosorción en múltiples pliegues. Los grupos carboxilos, aminas, fosfatos, sulfatos y los grupos hidroxilo se han establecido bien como responsables para la unión del metal. En general, los grupos funcionales menos importantes pueden convertirse en grupos activos vinculantes a través de métodos de tratamiento químicos. (López y Reyes, 2012) utilizaron cloroacético para introducir carboxilo en lugar de hidroxilo a continuación, la biomasa carboxilada se trató con etil en diamina seguida de carbodimida para formar biomasa aminada. Los autores observaron que el aumento en los grupos amina aumentó en un 47% en comparación con el de control. (López y Reyes, 2012) emplearon ácido cítrico para modificar una solución alcalina saponificada de biomasa, lo que aumentó el total de sitios ácidos, pero una disminución de sitios básicos.

Otra manera eficiente para la introducción de grupos funcionales sobre la superficie de la biomasa es el injerto de cadenas largas de polímero sobre la superficie de la biomasa mediante injerto directo o polimerización de un monómero. Sin embargo, muy pocas investigaciones se han centrado sobre este aspecto trabajaron ampliamente con polietilenamina, compuesto por un gran número de grupos amina primaria y secundaria, que cuando se reticulan con biomasa muestran buenas habilidades de biosorción hacia Cromo (VI), cobre, plomo, níquel y arsénico. Kotrba et al., (2011) copolimerizaron sobre la superficie de la biomasa para mejorar los grupos carboxilo, lo que dio lugar a cinco y siete veces mejoras para la toma de cobre y cadmio, respectivamente, en comparación con la biomasa original.

1.3.5.1. Biosorbentes modificados genéticamente

Es bien sabido que los biosorbentes vírgenes carecen generalmente de especificidad en la fijación de metales, lo que dificulta la recuperación y reciclaje de los metales. La modificación genética es una solución potencial para la selectividad, así como las propiedades de acumulación de las células (Carballo., 2009).

La modificación genética sería factible, especialmente cuando la biomasa microbiana se produce a partir de procesos de fermentación donde se utilizan microorganismos genéticamente modificados. Hoy en día, muchos tipos de aminoácidos y ácidos nucleicos están siendo producidos a escala industrial mediante el uso de células microbianas. La sobreexpresión de metales en células bacterianas resultará en una acumulación mejorada de metales y; por lo tanto, ofrece una estrategia prometedora para el desarrollo de biosorbentes microbianos para la remediación de la contaminación por metales (Tejada, et al., 2016).

Además de la alta selectividad y capacidad de acumulación, (Tejada et al., 2016) demostraron que la biosorción por recombinante *E. coli* (que expresa el gen *Neurospora crassa* metalotioneína del espacio periplásmico) fue rápida, mayor del 75% de Cd en los primeros 20 min, con un máximo de alcance en menos de 1 h. También, se ha encontrado que las PCs (péptidos modificados) exhiben una mayor capacidad de fijación de metales (sobre una base por cisteína) (Alberich, et al., 2008). Sin embargo, el desarrollo de los organismos que sobre expresan PCs requiere un conocimiento de los mecanismos involucrados en la síntesis y cadena de alargamiento de estos péptidos.

Un sistema de visualización de superficie Gram + positivas también posee en comparación con las bacterias Gram-negativa (Mackova et al., 2011): (a) translocación a través de una sola membrana, y (b) las bacterias Gram + positivas han sido demostradas ser más rígidas y; por lo tanto, menos sensible al esfuerzo cortante de fuerzas electrostáticas (Kelemen y Sharpe, 1979), 2000) debido a la pared celular gruesa que rodean las células, lo que potencialmente las hace más adecuadas para aplicaciones de campo, tales como biosorción. (Alberich et al., 2008) generaron *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus* recombinantes con quimérico expuesto a la superficie de las proteínas que contenían péptidos polihistidil. Ambas cepas de *Staphylococcus* obtuvo mejores capacidades de unión al níquel debido a la introducción del péptido H1 o H2 en sus proteínas de superficie. Debido a su alta selectividad, los biosorbentes genéticamente modificados pueden ser muy competitivos para la separación de toxinas y otros contaminantes presentes os metales pesados de soluciones contaminadas diluidas.

1.3.5.2. Biosorbentes inmovilizados

Los biosorbentes microbianos son básicamente partículas pequeñas, con densidad, baja resistencia mecánica y poca rigidez. Aunque tienen ventajas, como una alta capacidad de biosorción, una rápida estabilidad, menor costo de proceso y buena transferencia de masa de partículas, a menudo sufren varios inconvenientes. El más importante problemas de separación sólido-líquido, por posible hinchazón de la biomasa, incapacidad para regenerar, reutilizar y desarrollar (López., 2014).

La elección de la matriz de inmovilización es un factor ambiental de la biomasa inmovilizada. El polímero de la matriz determina la resistencia mecánica y la resistencia de la partícula biosorbente final a ser utilizada para sucesivos ciclos de sorción-desorción (Reeves y Beker., 1999). Sin embargo, se debe tener cuidado para evitar los problemas prácticos generados durante el proceso de inmovilización; en particular, las limitaciones de transferencia de masa y costos de proceso adicionales. Después de la inmovilización, la biomasa normalmente se conservará dentro del interior de la matriz utilizada para la inmovilización; Por lo tanto, la resistencia de la masa a la transferencia desempeñará un papel vital en la biosorción. La presencia de resistencia a la

transferencia de masa usualmente ralentiza el logro del equilibrio; Sin embargo, un éxito de inmovilización de la matriz debe permitir que todos los sitios de unión activa tengan acceso al soluto, incluso a un ritmo más lento.

La biosorción se presenta generalmente como un método de proceso rentable, que a menudo se pone de relieve como una opción a la de otras tecnologías probadas. Aunque la inmovilización de la biomasa con el único propósito de mejorar la biosorción puede aumentar costes del proceso, que a menudo es necesario para la aplicación de biosorción en aplicaciones reales. Una revisión de la literatura relacionada con la biosorción reveló que se han cultivado y explorado varias biomazas microbianas por su potencial de biosorción. El coste de producción de biomasa con el único propósito de su transformación en biosorbentes se ha demostrado que es demasiado caro (Reeves et al). Además, no puede garantizarse el suministro continuo de biomasa, lo que tiene un enorme impacto en su exitosa aplicación en aplicaciones de biosorción.

1.3.6. Procedimientos experimentales de biosorción

Un proceso de biosorción se puede realizar a través de varios modos: por lotes y modos de operación continuos son frecuentemente empleados para llevar a cabo procesos de biosorción a escala de laboratorio. Aunque la mayoría de las aplicaciones industriales prefieren un modo continuo los experimentos por lotes deben utilizarse para evaluar la información fundamental requerida, como la eficiencia del biosorbente, condiciones experimentales óptimas, tasa de biosorción y de regeneración de biomasa.

1.3.6.1. Factores que influyen en la biosorción

Para la evaluación de todo el potencial de biosorción por lotes de cualquier biomaterial. Los factores importantes son:

- Solución pH
- Temperatura
- Fuerza iónica
- Dosificación de biosorbente
- Tamaño de biosorbente
- Concentración inicial de soluto
- Velocidad de agitación.

De estos, el pH de la solución juega generalmente un papel importante en la biosorción, y parece afectar a la solución química de los metales y colorantes y la actividad de los grupos funcionales de

la biomasa. Para los metales, el pH influye fuertemente en la especiación y la disponibilidad de biosorción de los iones metálicos (Yang, et al., 2016); (Volesky, 1987). A pH de solución más alta, la solubilidad de los complejos metálicos disminuye lo suficiente, lo que puede complicar el proceso de biosorción. La actividad de los sitios de unión también puede alterarse mediante el pH (Vegliò y Volesky, 1997).

La temperatura generalmente aumenta la biosorción debido al aumento de la actividad superficial y energía cinética del soluto (Vijayaraghavan y Yun, 2008); sin embargo se puede producir daños físicos del biosorbente, se ha comprobado que un aumento de la temperatura afecta la capacidad de biosorción de la biomasa (Singh, et al, 2015). Siempre es deseable realizar y evaluar la biosorción a temperatura ambiente, ya que esta condición es fácil de manejar.

Otro parámetro importante en la biosorción es la fuerza iónica, que influye en la adsorción del soluto a la superficie de la biomasa (Daughney et al., 1998). El efecto de la fuerza iónica puede atribuirse a la competencia entre iones, cambios en la actividad del metal o a las propiedades de la doble capa eléctrica. Cuando las dos fases, tanto la superficie de la biomasa y el soluto en solución acuosa están en contacto, y por lo tanto están obligados a estar rodeados por una doble capa eléctrica debido a la interacción electroestática; así, la adsorción disminuye con aumento de la fuerza iónica (Rodríguez, et al, 2008).

La dosificación de un biosorbente influye fuertemente en el proceso de biosorción. En muchos casos, las dosis de biosorbentes más bajas producen mayor consumo y menor eficiencia de biosorción porcentual (Vijayaraghavan y Yun, 2008). Un aumento en la concentración de biomasa generalmente aumenta la cantidad de soluto biosorbido, debido al aumento de la superficie del biosorbente, que a su vez aumenta el número de sitios de unión. Por lo tanto, los experimentos preliminares son obligatorios para determinar el tamaño adecuado de un biosorbente. Si un biosorbente está disponible en forma de polvo, como los residuos industriales, deberían mejorar la resistencia mecánica, tal como la granulación, para su uso efectivo en columnas de biosorción.

El tamaño del biosorbente también desempeña un papel vital en la biosorción, las partículas de tamaño más pequeño tienen una superficie más alta, que a su vez favorece la biosorción y resulta en un tiempo de equilibrio más corto (Ahmad y Haseeb, 2017).

1.3.7. Celdas de Combustible Microbianas

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico que genera energía eléctrica a partir de la energía química contenida en un combustible. Un sistema electroquímico está formado básicamente por cuatro componentes: un compartimiento anódico, con reacciones de oxidación-

reducción; un canal iónico, por donde se llevara a cabo el transporte de los iones; y un circuito electrónico para el transporte electrónico (Kim, et al., 2007).

Las celdas de combustible de membrana de intercambio protónico (CCMIP) fueron desarrolladas por general electric en los años 60 para la NASA. Durante los años 70 y comienzos de los 80 el interés por las CCMIP disminuyó debido a su costo comparado con los demás tipo de celdas de combustible. Su alto costo se debía a la gran cantidad de platino (Pt) usado como catalizador (alrededor de 28 mg/cm²). A mediados de los 80 y principio de los 90 renació el interés en las CCMIP puesto que las investigaciones realizadas desarrollaron membranas que requerían menor uso de platino. En la actualidad el uso del platino en las membranas de las celdas de combustible se ha reducido hasta el orden de 0.2 mg/cm². Las CCMIP pueden usarse como fuentes de potencia para dispositivos tan pequeños como teléfonos móviles, computadores hasta grandes sistemas como botes, automóviles, buses o sistemas combinados de generación de calor y potencia. (Rozo Q., 2016).

La membrana de intercambio protónico es una hoja de plástico delgado que funciona como aislante electrónico, pero también como un excelente conductor de protones. Los materiales utilizados para este tipo de membranas son polímeros fluorocarbonados parecidos al teflón, a los cuales se les añaden grupos de ácido sulfónico (SO₃). Estos son conocidos como fluoropolímeros sulfonados. El tipo de membrana más usada es conocida como NAFION.

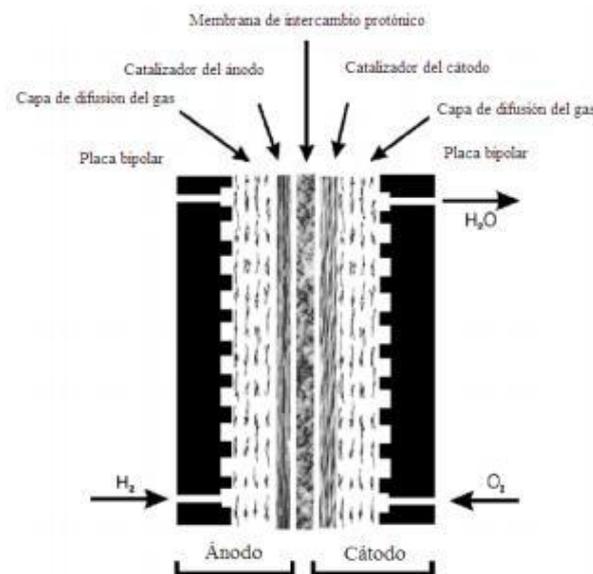


Figura 1-1: Vista Lateral de una celda de combustible tipo membrana de intercambio protónico.

Fuente: Triana, 2013

1.3.7.1. Factores influyentes en el desarrollo de la tecnología CCM

Los principales factores que influyen en la generación de energía son las vías metabólicas que gobiernan el flujo de electrones y protones, la influencia del sustrato y el potencial del ánodo.

Diferentes investigaciones han demostrado la influencia de diversos factores sobre el desempeño de una CCM (Revelo et al., 2013)

- La configuración del reactor.
- El tipo de materiales de los electrodos.
- La distancia entre electrodos.
- El tipo de inóculo.
- La temperatura de operación.
- El pH.
- El mediador del transporte de los electrones entre el microorganismo y el electrodo.
- El área superficial de los electrodos.
- El tamaño del reactor.
- El tiempo de operación.

Los diseños de las cámaras del ánodo y del cátodo por una membrana intercambiadora de protones comúnmente usada es el Nafion117®, la cual se utiliza como una alternativa, considerada como de mejor costo-beneficio (Logan & Regan, 2006). La membrana requiere para su uso ser sometida a un proceso de activación de los canales sulfónicos, empleando acetona y peróxido de hidrógeno al 3% para eliminar residuos orgánicos, y una solución de H₂SO₄ 1M para activar el nafión a su forma ácida antes de ser empleada. (Astiazarán, 2016).

1.3.7.2. Aportes de las celdas de combustible microbiana en la recuperación de ambientes

Una celda de combustible microbiana convierte un sustrato biodegradable directamente a electricidad. Esto se consigue cuando las bacterias, a través de su metabolismo, transfieren electrones desde un donador, tal como la glucosa, a un aceptor de electrones. Las bacterias no transfieren directamente los electrones producidos a su aceptor terminal, sino que éstos son desviados hacia el ánodo. Esta transferencia puede ocurrir de varias formas, bien sea a través de la membrana celular o a partir de un mediador soluble, y los electrones fluyen a través de un circuito externo (Rabaey y Verstraete, 2005). Las celdas de combustible proporcionan una reducción del peso y del tamaño para la misma cantidad de energía disponible respecto a las baterías tradicionales. Para aumentar la producción de energía de una pila de combustible, solo hay que proporcionarle más combustible, mientras que para aumentar la producción energética de una batería, hay que colocar

baterías adicionales, lo cual ocuparía mayor espacio, y aumentaría el peso. La pila de combustible no deja nunca de funcionar mientras haya combustible, mientras que la batería cada vez que se agota, necesita un proceso largo de reposición de energía eléctrica.

En los últimos tiempos se ha logrado desarrollar celdas de combustible microbiana de biocatodo que no son más que electrodos inoculados con microorganismos capaces de aceptar electrones y reducir compuestos que en su forma oxidada suelen ser contaminantes para los ambientes como por ejemplo: nitratos, sulfatos, Cr, arsenato, fumarato, etc. En estos dispositivos la reducción de metales ocurre bajo condiciones ácidas, en la cual los electrones producidos en la cámara anódica a partir de la oxidación de donadores de electrones pueden promover la reducción del metal en la cámara catódica, generándose simultáneamente electricidad (Rabaey y Verstraete, 2005).

En ausencia de oxígeno, el Cr (VI) puede servir como un aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, en la cual enzimas solubles o asociadas a la membrana citoplasmática, median el proceso de reducción bajo condiciones anaeróbicas. Las celdas de combustible microbianas de biocátodo (Ver figura 2-1); han sido poco estudiadas y pese a ello se han convertido en una tecnología potencial para la remediación de metales tales como el cromo en su forma más compleja como es el Cr (VI), dando una propuesta de solución a la contaminación ambiental producida por este metal.

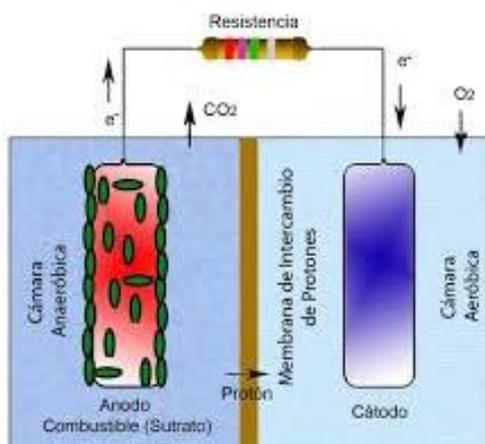


Figura 2-1: Celda de combustible microbiano de Biocatodo

Fuente: Revelo, et al., 2013

1.3.8. *Pseudomonas* en CCMs

Para entender más acerca de las funciones específicas de las bacterias en las CCMs para la generación de bioelectricidad; Liu y Logan, (2004), realizó un estudio que se centró en la producción de bioelectricidad a partir del cultivo puro de *Bacillus tequilensis* MR-5 y *Pseudomonas a eruginosa* DMR-3. Ambos cultivos se aislaron del biofilm anódico de la pre-

ejecución CCM con fluido ruminal como sustancia anódica. Se verificó la producción de energía durante 10 días tanto como aislamientos puros como co-cultivo. *Bacillus tequilensis* y *Pseudomonas aeruginosa* produjeron 250 mV y 20 mA, 310 mV y 10 mA respectivamente. Ambas bacterias, cuando se utilizan como cultivos mixtos y por lo tanto se confirmó la naturaleza electroquímica de las bacterias.

Liting Hao., (2015) realizó un análisis de secuencia del gen rRNA de 16S de alto rendimiento de bacterias resistentes al arsénico como *Actinobacteria*, *Comamonas*, *Pseudomonas* y bacterias oxidantes de arsénico, siendo estas responsables de la oxidación de Al (III) y generación de bioelectricidad en CCMs. *Enterobacter* fue también un representante electrogénico que podría transferir electrones directamente a otros aceptores. Otras bacterias electroquímicamente activas como el género *Lactococcus* de *Firmicutes* tenía la capacidad no sólo de medir la transferencia de electrones a receptores de electrones extracelulares, sino también realizar la transferencia de electrones extracelulares a los ánodos enriquecido y responsable de las mayores potencias con *Enterobacter* en CCM-As. (Li et al., 2015). Este estudio ofreció un potencial atractivo para la remediación de las aguas subterráneas contaminadas con arsénico.

Entre otros estudios se le considero a la *Pseudomona* como un biosensor para p-nitrofenol que es uno de los contaminantes más comunes en aguas residuales industriales. Se probó como un biosensor para in situ en tiempo real en donde se utilizó la *Pseudomona monteilii* (LZU-3), como el elemento de reconocimiento biológico. Los parámetros de operación óptimos del biosensor fueron los siguientes: resistencia externa 1000 Ω , pH 7,8, temperatura 30 ° C, y concentración máxima de 50 mg/ L. Bajo estas condiciones, las tensiones máximas mostraron una relación con concentraciones comprendidas entre 1575 y 4474,5 mg/ L.

En las CCMs se utilizan mediadores que proporcionan una plataforma permeable como aceptor de electrones que transfiere a la superficie del electrodo y que son producidos por los microorganismos electrogénicos. Las *Pseudomonas* son bacterias que pueden transferir electrones a los electrodos a través de mediadores basados en fenazina auto producidos. En un estudio en la CCM se alimentó con acetato donde varias *Pseudomonas sp.* fueron encontradas, las CCM contenía bacteria Gram negativa, la cepa conocida por ser capaz de producir PCN a niveles altos y biosurfactantes, expresaron actividad electroquímica y las corrientes alcanzaban generaciones hasta 8-10 μ A. Hoy en día, las celdas de combustible microbianas (CCMs), ya son capaces de absorber simultáneamente los contaminantes involucrando la generación de bioelectricidad, ofreciendo un camino hacia lo económico. (Li, 2015).

En otro estudio se hicieron co-cultivos entre *Bacillus tequilensis* y *Pseudomonas aeruginosa* en donde se demostró una producción máxima de 450mV y 40mA. Se encontró que la densidad de 254mW / cm² en comparación con los cultivos puros, el cultivo produjo alta densidad de potencia. Los voltammogramas obtenidos para el cultivo individual y cultivo mixto revelaron que la oxidación y reducción ha ocurrido más cuando las bacterias son inoculadas como co-cultivo (conjunto). *Bacillus tequilensis* que produjo menor tensión no mostró picos prominentes en diferentes escalas de tiempos, sin embargo, las *Pseudomonas aeruginosa* produjo un voltaje más alto que el anterior y mostró un pico de oxidación a 0,398 V y pico de reducción a 0,157 V. (Deepika, 2013).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Parte experimental

Este estudio se enmarca dentro del tipo Exploratorio-Descriptivo, dando una visión general, de tipo aproximativo, respecto a una determinada realidad ya que al determinar la capacidad de biosorción de metales pesados a través de las Cepas de *Pseudomonas* se buscará incentivar realizar biorremediaciones ambientales ya en el plano de contaminación ocasionados por ejemplo por hidrocarburos, industrias de curtiembres, la metalurgia, electrónica, galvanoplastia. Además se busca describir situaciones, efectos como es la asimilación bacteriana y su capacidad de biosorción a diferentes concentraciones con tres metales pesados sintéticos distintos, Cr, Zn y Pb.

2.1.1. Lugar y Población de estudio

La población de estudio en esta investigación trata de Celdas de Combustible Microbianas (utilizadas en procesos de generación de bioelectricidad) y Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (bacterias aisladas e identificadas de suelos de Páramo- Mapahuiña Chimborazo).

La identificación y reconocimiento de la Cepa de *Pseudomona aeruginosa* se lo realizó en el Laboratorio Clínico a partir de pruebas bioquímicas; para luego ser utilizadas en Celdas de Combustible Microbiano mediante interacción a diferentes concentraciones del metal que presentó su mejor asimilación y/o biosorción, la adecuación de las Celdas de Combustible Microbianas se lo realizó en el laboratorio de Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias - ESPOCH. Este trabajo parte de investigación previa por el Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes (ICITS-UNACH) denominada: “Monitoring of microbial population of the páramo soil of the charge zoneo flake Mapahuiña in Chimborazo-Ecuador” (Calderón, et al., 2016) publicada en la Revista Perfiles – ESPOCH.



Fotografía 1-2: Población de estudio. Celdas de Combustible Microbianas

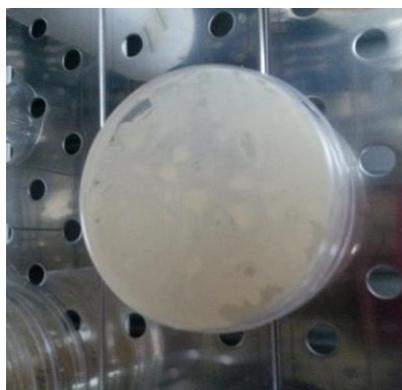
Fuente: Janeta, Rosa, 2016

2.2. Etapas de la Investigación

2.2.1. Adecuación y transporte de la *Bacteria Pseudomonas sp.*

Las Cepas bacterianas almacenadas y posteriormente proporcionadas por parte del Instituto de Ciencia, Innovación, Tecnología y Saberes (ICITS-UNACH), fueron trasladadas realizando réplicas mediante pipetas de 5ml de la solución madre a 4 matraces de 125mL que contenían agar nutritivo de cerebro corazón y soya siendo estos fácilmente asimilables para las bacterias de género Gram negativas, y transportadas mediante un termo conservando la temperatura en la que se encontraban (30-32°C).

Su adecuación y disposición se lo realizó en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias en un incubador a una temperatura de 35°C para su posterior magnificación y replicación bacteriana en Agar Nutritivo; verificando un crecimiento inicial a las 24 horas.



Fotografía 2-2: Crecimiento de la *Pseudomonas sp.*

Fuente: Janeta, Rosa., 2016

2.2.2. Identificación morfológica de la cepa bacteriana

2.2.2.1. Tinción Gram

Para verificar a qué tipo de bacteria pertenece se realizó la tinción Gram para lo cual se preparó el porta objetos mediante un lavado con agua y jabón, se procedió a limpiarlo suavemente con un algodón empapado en alcohol. Luego se procedió a flamear el porta objetos sobre la llama del mechero, para así eliminar restos de suciedad y grasas, todo esto con la finalidad de que la muestra se fije adecuadamente, posteriormente se depositó una gota de cloruro de sodio al 85% sobre el porta objetos y se colocó una muestra de la cepa *Pseudomona sp.* con un asa esterilizada. Se esperó que la muestra se secase al aire libre. Una vez que la muestra este fría se procedió a realizar la Tinción Gram. Se tomaron en cuenta los tiempos para ir adicionando los colorantes de acuerdo a los procedimientos establecidos en la tinción. Visualizar en el microscopio electrónico.

2.3. Pruebas Bioquímicas de Reconocimiento de Género Bacteriano *Pseudomona*

En base a los antecedentes previos de identificación y caracterización microbiana por parte de la UNACH; se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación correspondiente, este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias. Las propiedades de la cepa *Pseudomona* que incluían reacción de Gram -, se hicieron varias pruebas en distintos medios como son: úrea, Kligler, SIM y SIMMONS citrato determinados por los métodos estándar indicados en Álvarez y Boquet, a través de la Galería API 20E, daban como resultado la presencia de un género en específico de la Familia de *Pseudomona* (Ver Tabla 2-3)

Se preparó los 4 medios en tubos de ensayo con un volumen de 5 mL y con sus respectivas replicas obteniendo un total de 8 tubos, la preparación de los medios se realizaron en condiciones estériles (Ver Fotografía 3-2).



Fotografía 3-2: Realización de pruebas bioquímicas

Fuente: Janeta, R. 2016.

Medio Urea.- Se realizó dos procedimientos: primero la urea agar **base:** 0.31gr, disuelto en 15mL de agua destilada; y segundo la urea: 4 gr aforado a 10 mL con agua destilada. Al tener los dos medios ya preparados, se tomó 0.5 mL de la solución de urea aforada; mezclando con toda la solución de urea agar base, para colocarlo en el autoclave durante 30min, después de dicho tiempo se sacó a la cámara de flujo laminar separando en dos tubos de ensayo con 5ml cada uno del **medio urea**, dejándoles reposar en posición inclinada para que se enfrié. Pasado dichos procedimientos se sembró la bacteria utilizando la técnica de punción profunda, procediendo a taponar los tubos e introduciéndolos en la incubadora por 24 horas. Posteriormente se realizó las respectivas observaciones. (Ver tabla 2-3).

Medio SIM.- Esta prueba se basó en la motilidad de la bacteria y producción de H₂S, se pesó 0.45 gr del medio, la misma que se disolvió en 15 ml de agua destilada, añadiendo en un Erlenmeyer que posteriormente se llevó al autoclave durante 30min. La preparación se lo realizó en la cámara de flujo previamente esterilizada, colocando 5 mL del medio en los dos tubos de ensayo, se dejó enfriar completamente en posición recta. Una vez frío el medio se sembró la cepa de la *Pseudomona* con un aza esterilizada mediante la técnica de punción profunda y se tapó el tubo herméticamente. Al transcurrir las 24 horas se anotaron los resultados. (Ver tabla 2-3).

Medio Simmons citrato.- Este medio tiene como finalidad comprobar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo y su crecimiento (Álvarez Benito, 1990).

Se preparo 0.33 g de citrato y se disolvio en 15 ml de agua destilada en un Erlenmeyer, luego se introdujo en el autoclave durante 30 min.La preparación se lo hizo en la cámara de flujo laminar previamente esterilizada, colocando 5 mL de medio en 2 tubos de ensayo, luego este se procedió a

su total enfriamiento en una posición inclinada. Una vez frío el medio se sembró la cepa de la *Pseudomona* con una aza esterilizada mediante la técnica de punción profunda y se tapó el tubo herméticamente. Al transcurrir las 24 horas se anotaron los resultados. (Ver tabla 2-3).

Medio KLIGLER.- Medio de cultivo para la diferenciación de entero bacterias en base a su capacidad para fermentar glucosa y lactosa, y para producir ácido sulfhídrico.

Se preparó 0.78 g de Kligler y se disolvió en 15 ml de agua destilada en un Erlenmeyer, luego se introdujo en el autoclave durante 30 min. La preparación se lo hizo en la cámara de flujo laminar previamente esterilizada, colocando 5 mL de medio en 2 tubos de ensayo, luego este se procedió a su total enfriamiento en una posición inclinada. Una vez enfriado el medio se sembró la cepa de la *Pseudomona* con una aza esterilizada mediante la técnica de punción profunda y se tapó el tubo herméticamente. Al transcurrir las 24 horas se anotaron los resultados. (Ver tabla 2-3).

Tabla 1-2: Características de los medios de cultivo.

Medio	Características
<p data-bbox="341 1003 654 1032">Agar- Cerebro, Corazón</p> 	<p data-bbox="794 1032 1337 1167">Utilizado para bacterias Gram Negativas en General; su medio físico de siembra es en estado líquido</p> <p data-bbox="794 1182 970 1211">Composición:</p> <p data-bbox="794 1234 1337 1413">Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona) 27,5; D (+)- glucosa 2,0; cloruro sódico 5,0; hidrogeno fosfatodisódico 2,5.</p>
<p data-bbox="424 1442 568 1471">Agar- Soya</p> 	<p data-bbox="794 1471 1337 1554">Su medio físico de siembra es en estado líquido</p> <p data-bbox="794 1570 970 1599">Composición:</p> <p data-bbox="794 1621 1337 1756">Peptona de caseína 17,0 peptona de harina de soya 3,0; D (+)- glucosa 2,5; cloruro sódico 5,0; hidrogeno fosfatodipotásico 2,5.</p>
<p data-bbox="395 1823 600 1852">Agar- Nutritivo</p>	<p data-bbox="794 1852 1337 1986">Satisface los criterios de rendimiento bacteriano su medio de siembra es en estado acuoso o solidificado.</p>

	<p>Composición: Extracto de Res: 3.0g Peptona: 5.0g Agar: 15.0g</p>
<p style="text-align: center;">Agar – Mueller</p> 	<p>Es un medio de cultivo general, utilizado para el cultivo de microorganismos variados.</p> <p>Composición: Extracto de carne 2,0 g Hidrolizado ácido de caseína 17,5 g Almidón 1,5 g Agar 15 g</p>

Realizado por: Rosa Janeta, 2017

2.4. Pruebas ensayo previas a la instalación final de las CCM

Se realizaron pruebas ensayo para constatar mediante análisis a que concentraciones de los metales resiste la *Pseudomona aeruginosa*, anteriormente identificada por lo que se preparó agua residual sintética a concentraciones 0,5 ppm, 1 ppm y 2 ppm de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se preparó otra de 5ppm, 10 ppm y 20 ppm de Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$), para el Nitrato de Plomo $Pb(NO_3)_2$ se hizo a concentraciones de 5 ppm , 10 ppm y 20 ppm, estas concentraciones de los metales pesados fueron seleccionadas basándose en los límites de descarga a un cuerpo de agua dulce (Tulsma, Anexo I, Libro VI, 2015).(Ver Tabla3-3).

2.4.1. Procedimiento de la prueba ensayo

Para este ensayo se reactivó la cepa de la *Pseudomona* en agar cerebro corazón. Se pesó 0,74 g del medio se diluyo en 20 ml de agua destilada (Ver apartado 2.4.3.1.1.), se esterilizo el medio en el autoclave durante 30 minutos, dicha solución se distribuyó 5 ml en 4 tubo de ensayo previamente esterilizados, esto se lo realizó en una cámara de flujo laminar, se procedió a sembrar las bacterias con una asa esterilizada, los tubos de ensayo ya sembrados se pasó a la incubadora a 30°C durante 24 horas. Se observó el crecimiento de la *Pseudomona* después de las 24 horas.



Fotografía 4-2: Crecimiento de la *Pseudomonas* en líquido

Fuente: Janeta. Rosa, 2017

Verificado su crecimiento de la bacteria en el agar cerebro corazón, se preparó el agar nutritivo, pesando 5,52 g de medio, se adicionó 240 mL de agua destilada en un Erlenmeyer (Ver apartado 2.4.31.2.), se esterilizó en el autoclave durante 30 minutos a 30 °C, este medio se distribuyó 20 mL en las cajas Petri, dejamos que se solidifique, luego mediante la técnica de estriado se sembró con un isopo esterilizado la *Pseudomonas*, en las cajas Petri en una cámara de flujo laminar, finalmente se procedió a la rotulación de las cajas las mismas que se pasó a la incubadora colocando en forma invertida durante 24 horas a 30 °C. Se observó su crecimiento bacteriano después de las 24 horas.



Fotografía 5-2: Crecimiento de la *Pseudomana* en solido

Fuente: Janeta. Rosa, 2016

2.4.2. Preparación del agua residual sintética de los metales pesados a distintas concentraciones para sembrar la Pseudomonas aeruginosa.

La capacidad bacteriana de crecer bajo concentraciones crecientes de metales pesados fueron analizados de acuerdo a la capacidad de tolerancia de la cepa como la biodisponibilidad del metal (Sterritt & Lester, 1980) Los metales seleccionados fueron Cromo, Zinc y Plomo que para determinar la tolerancia las cepas fueron incorporadas en agar nutritivo suplementado con sus respectivos metales en compuestos de: $K_2Cr_2O_7$, $ZnSO_4$ y $Pb(NO_3)_2$. Cada experimento se repitió dos veces y las concentraciones se basaron en los límites de descarga a un cuerpo de agua dulce

(Tulsma, Anexo I, Libro VI, 2015), llegando a duplicar y cuadruplicar su concentración por la capacidad de la asimilación de la cepa bacteriana.

2.4.2.1. Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Se pesó 0,7072g de dicromato de potasio($K_2Cr_2O_7$) se aforo a 250 mL con agua destilada luego con una pipeta graduada succionamos alícuotas de la solución madre (Ver apartado 2.4.3.2.1.) de 0,25 ml; 0,5 ml y 1 ml de dicromato de potasio, cada una se aforo a 500 ml con agua destilada, estas soluciones se distribuyeron en botellas de vidrio con un volumen de 120 ml de los 500 mL que se aforo las mismas tienen concentraciones iniciales de 0.5mg/L; 1 mg/L; 2 mg/L,(ver tabla 1-2)se preparó por triplicado cada concentración; luego de la distribución de las soluciones preparadas se procedió a sembrar las *Pseudomonas* que anteriormente se realizó la reactivación, esta siembra se lo realizó en una cámara de flujo laminar, con una isopo esterilizado untamos las bacterias y le sumergimos en las soluciones preparadas de los metales, una se dejó sin bacterias para analizar y las 2 se sembró las bacterias luego se les paso a la incubadora por 48 horas a 30°C. Se observó el crecimiento bacteriano cada día. Se realizó lecturas iniciales y finales del experimento a las 48 horas por el método de EAA y por colorimetría. (Ver tabla 3-3)



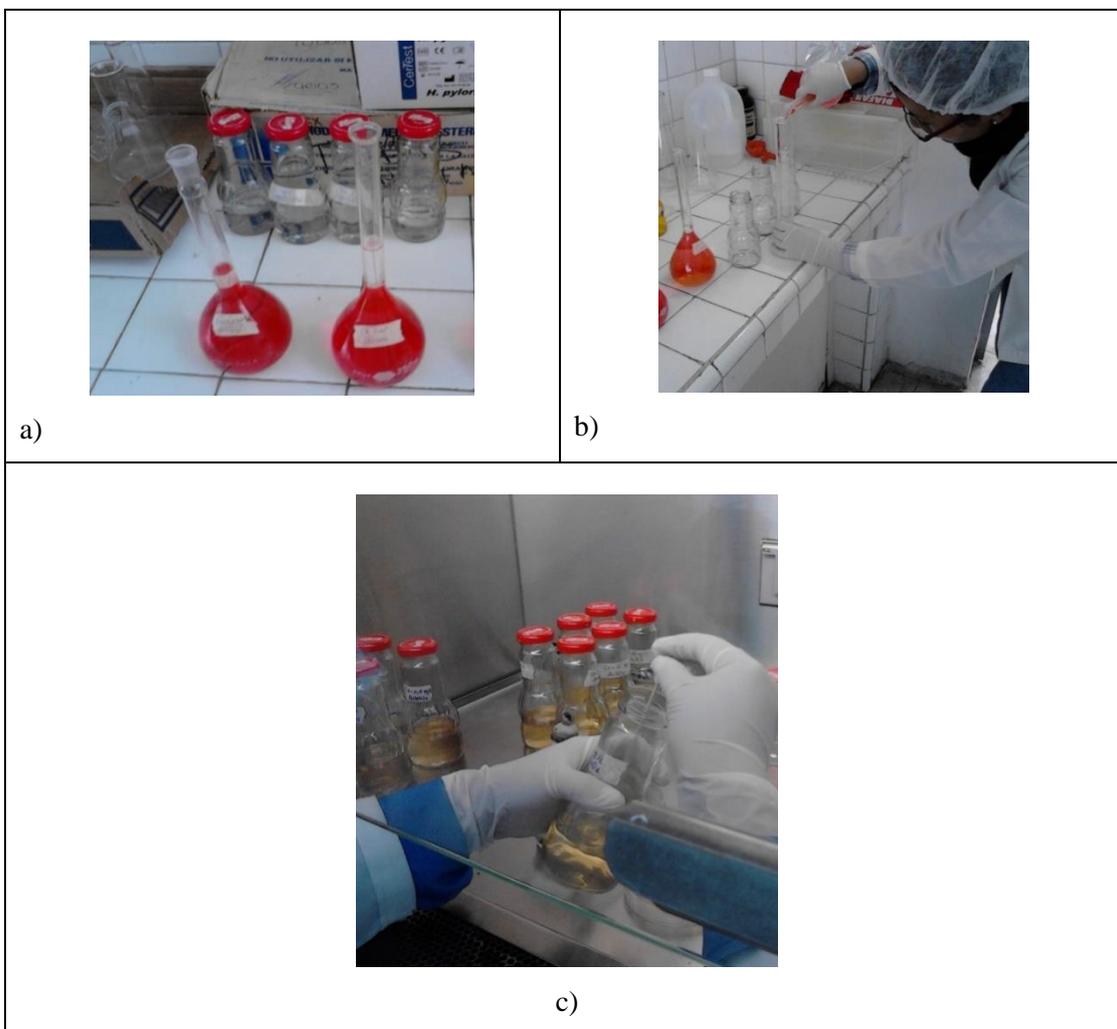
Fotografía 6-2: Preparación del Dicromato de potasio

Fuente: Janeta. Rosa, 2016

2.4.2.2. Sulfato de zinc ($ZnSO_4$)

Se pesó 0,3086 g de $ZnSO_4$ y se aforó a 250 mL con agua destilada luego con una pipeta graduada succionamos alícuotas de la solución madre (ver apartado 2.4.3.2.2.) de 5 ml; 10 ml y 20ml de Sulfato de zinc, cada una se aforó a 500 mL con agua destilada, estas soluciones se distribuyeron en botellas de vidrio con un volumen de 120 ml de los 500 mL que se aforó, las mismas tienen concentraciones iniciales de 5 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L, (Ver tabla 1-2), se preparó por triplicado cada concentración; luego de la distribución de las soluciones preparadas se procedió a sembrar las

Pseudomonas que anteriormente se realizó la reactivación, esta siembra se lo realizo en una cámara de flujo laminar, con un isopo esterilizada untamos las bacterias y le sumergimos en las soluciones preparadas de los metales, una se dejó sin bacterias para analizar las concentraciones iniciales y las 2 restantes se sembró las bacterias, luego se les paso a la incubadora por 48 horas a 30°C. Se observó el crecimiento bacteriano. Se realizó lecturas iniciales y finales de las concentraciones de los metales después de las 48 horas por el método de EAA y por colorimetría. (Ver tabla 3-3)



Fotografía 7-2: Preparación de la solución y siembra de las bacterias en el sulfato de zinc

Fuente: Janeta. Rosa, 2016

En el literal a) se observa las aforaciones de 500 mL que se realizó; b) se observa la distribución de la solución en las diferentes concentraciones en las botellas; c) se sembró las bacterias en las soluciones preparadas.

2.4.2.3. Nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$

Se pesó 0,1914 g de $Pb(NO_3)_2$ se aforo a 250 mL con agua destilada luego con una pipeta graduada succionamos alícuotas de la solución madre (ver apartado 2.4.3.2.3.) de 5 ml; 10 ml y 20ml de Nitrato de plomo, cada una se aforo a 500 ml con agua destilada, estas soluciones se distribuyeron en botellas de vidrio con un volumen de 120 ml de los 500 mL que se aforo las mismas tienen concentraciones iniciales de 5 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L (Ver tabla 1-2), se preparó por triplicado cada concentración; luego de la distribución de las soluciones preparadas se procedió a sembrar las *Pseudomonas* que anteriormente se realizó la reactivación, esta siembra se lo realizó en una cámara de flujo laminar, con un isopo esterilizado untamos las bacterias y le sumergimos en las soluciones preparadas de los metales, una se dejó sin bacterias para analizar y las 2 restantes se sembró las bacterias luego se les paso a la incubadora por 48 horas a 30°C. Se observó el crecimiento bacteriano. También se realizó lecturas iniciales y finales de las concentraciones, después de las 48 horas por el método de EAA y por colorimetría. (Ver tabla 3-3)

2.4.3. Cálculos Utilizados

2.4.3.1. Cálculos de medios de cultivo para la reactivación de la *Pseudomonas sp.*

Agar cerebro corazón

$$\frac{37g \ 1000mL}{x \ 20mL}$$
$$x = 0.74g$$

Agar nutritivo

$$\frac{23g \ 1000mL}{x \ 240mL}$$
$$x = 5,52g$$

Donde

x: es el resultado de la relación del total de la solución de medio

2.4.3.2. Cálculos de la solución madre de los metales pesados

Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

$$250ml \frac{500 \ mgCr}{1000ml} \cdot \frac{2molCr}{51,996 \ mgCr} \cdot \frac{1molK_2Cr_2O_7}{2molCr} \cdot \frac{294,189 \ mgK_2Cr_2O_7}{1molK_2Cr_2O_7}$$

$$= 707,23 \ mgK_2Cr_2O_7 \text{ en } 250 \text{ ml de solvente}$$

Sulfato de zinc ($ZnSO_4$)

$$250ml \frac{500 \text{ mgZn}}{1000ml} \cdot \frac{1 \text{ molZn}}{65,37 \text{ mgZn}} \cdot \frac{1 \text{ molZnSO}_4}{1 \text{ molZn}} \cdot \frac{161,43 \text{ mgZnSO}_4}{1 \text{ molZnSO}_4}$$

$$= 308,6851 \text{ mgZnSO}_4 \text{ en } 250 \text{ ml de solvente}$$

Nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$)

$$100ml \frac{500 \text{ mgPb}}{1000ml} \cdot \frac{1 \text{ molPb}}{207,2 \text{ mgPb}} \cdot \frac{1 \text{ molPb(NO}_3)_2}{1 \text{ molPb}} \cdot \frac{317,2 \text{ mgPb(NO}_3)_2}{1 \text{ molPb(NO}_3)_2}$$

$$= 76,54 \text{ mgPb(NO}_3)_2 \text{ en } 100 \text{ ml de solvente}$$

2.4.3.3. Cálculos de las concentraciones de los metales pesados

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Tabla 2-2: Concentraciones de los metales pesados.

Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	Concentración 0.5 ppm	$V_1 = \frac{0,5 \text{ ppm} * 500 \text{ mL}}{500 \text{ ppm}}$ $V_1 = 0,5 \text{ mL}$
	Concentración 1 ppm	$V_1 = \frac{1 \text{ ppm} * 500 \text{ mL}}{500 \text{ ppm}}$ $V_1 = 1 \text{ mL}$
	Concentración 2 ppm	$V_1 = \frac{2 \text{ ppm} * 500 \text{ mL}}{500 \text{ ppm}}$ $V_1 = 2 \text{ mL}$
Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$)	Concentración 5 ppm	$V_1 = \frac{5 \text{ ppm} * 500 \text{ mL}}{500 \text{ ppm}}$ $V_1 = 5 \text{ mL}$
	Concentración 10 ppm	$V_1 = \frac{10 \text{ ppm} * 500 \text{ mL}}{500 \text{ ppm}}$

		$V_1 = 10 \text{ mL}$
	Concentración 20 ppm	$V_1 = \frac{20\text{ppm} * 500\text{mL}}{500\text{ppm}}$ $V_1 = 20 \text{ mL}$
Nitrato de Plomo Pb(NO₃)₂	Concentración 5 ppm	$V_1 = \frac{5\text{ppm} * 500\text{mL}}{500\text{ppm}}$ $V_1 = 5 \text{ mL}$
	Concentración 10 ppm	$V_1 = \frac{10\text{ppm} * 500\text{mL}}{500\text{ppm}}$ $V_1 = 10 \text{ mL}$
	Concentración 20 ppm	$V_1 = \frac{20\text{ppm} * 500\text{mL}}{500\text{ppm}}$ $V_1 = 20 \text{ mL}$

Realizado por: Rosa Janeta, 2017

2.4.3.4. Concentración del metal por la técnica de colorimetría:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot C$$

Donde:

I = Intensidad de luz que abandona la solución

I₀ = Intensidad de luz que penetra la solución

a = absortividad constante para una solución y una longitud de onda específica

b = longitud de la trayectoria de luz

C = Concentración de la solución.

2.5. Configuración de las Celdas de Combustible Microbianas

Se construyeron seis celdas de combustible microbianas de un volumen de 125mL de una sola cámara con el cátodo expuesto parcialmente al aire. Fueron elaboradas a partir de acrílico de 6mm de grosor y 5,5 cm de diámetro respectivamente, siendo un material plástico, que puede soportar periodos de tiempo a la intemperie, no es afectado por el sol, lluvia, frío o calor extremos, este material además es inerte a muchas sustancias corrosivas, considerado ecológico 100% reciclable. (Ver figura 1-2)

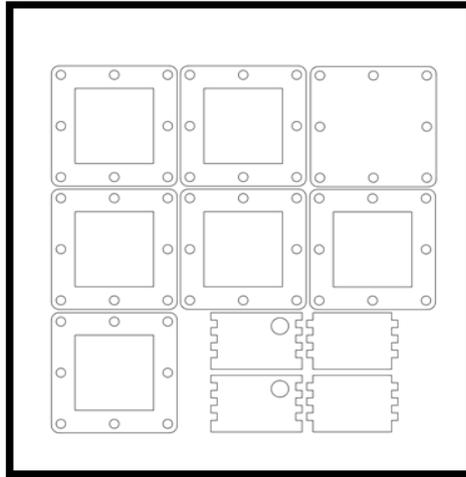


Figura 1-2: Planos de las celdas de combustible microbiano

Realizado por: Janeta, R. 2017

2.5.1. Pretratamiento de las Membranas de Intercambio Aniónico

El pre-tratamiento se lo realizo con el fin de mejorar la formación de biopelículas en la parte del ánodo para la biorremediación de los metales pesados en las celdas de combustible microbiano este tratamiento consistió en remojar en acetona (durante la noche) al día siguiente se lavó 5 veces en agua con destilada o desionizada; luego se remojó en peroxidisulfato de amonio (200 gr / L) y ácido sulfúrico concentrado (100 mL/L) durante 15 minutos; después del pre-tratamiento la fibra de carbono se calentó en una mufla a 450 °C por 30 minutos (Feng, Yang, Wang, & Logan, 2010), para su respectivo uso se debe lavar la fibra de carbono con agua destilada 5 veces , mientras que para el cátodo; este se deja remojar toda la noche en agua destilada con el fin de eliminar impurezas.



Fotografía 8-2: Pretratamiento de la fibra de carbono

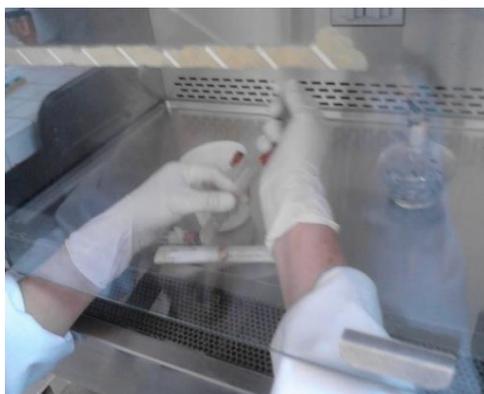
Fuente: Janeta. R. 2016

2.5.2. Implementación de las CCMs para la producción de bioelectricidad

Mediante los ensayos previos a la instalación de las CCMs, los resultados de los análisis que se realizaron anteriormente (Ver tabla 3-3) de los metales pesado cromo zinc y plomo el metal que tuvo mayor eficiencia fue el metal plomo.

2.5.2.1. Reactivación de la *Pseudomona aeruginosa*

Para la prueba final se reactivó la *Pseudomona aeruginosa* en agar cerebro corazón. Se pesó 0,74 g del medio se diluyo en 20 ml de agua destilada, se esterilizo el medio en el autoclave durante 30 minutos, dicha solución se distribuyó 5 ml en 4 tubos de ensayo previamente esterilizados, esto se lo realizó en una cámara de flujo laminar, se procedió a sembrar las bacterias con una asa esterilizada en los tubos de ensayo, luego de la siembra se pasó a la incubadora a 30°C durante 24 horas.



Fotografía 9-2: Siembra de la *Pseudomona aeruginosa* en agar cerebro corazón

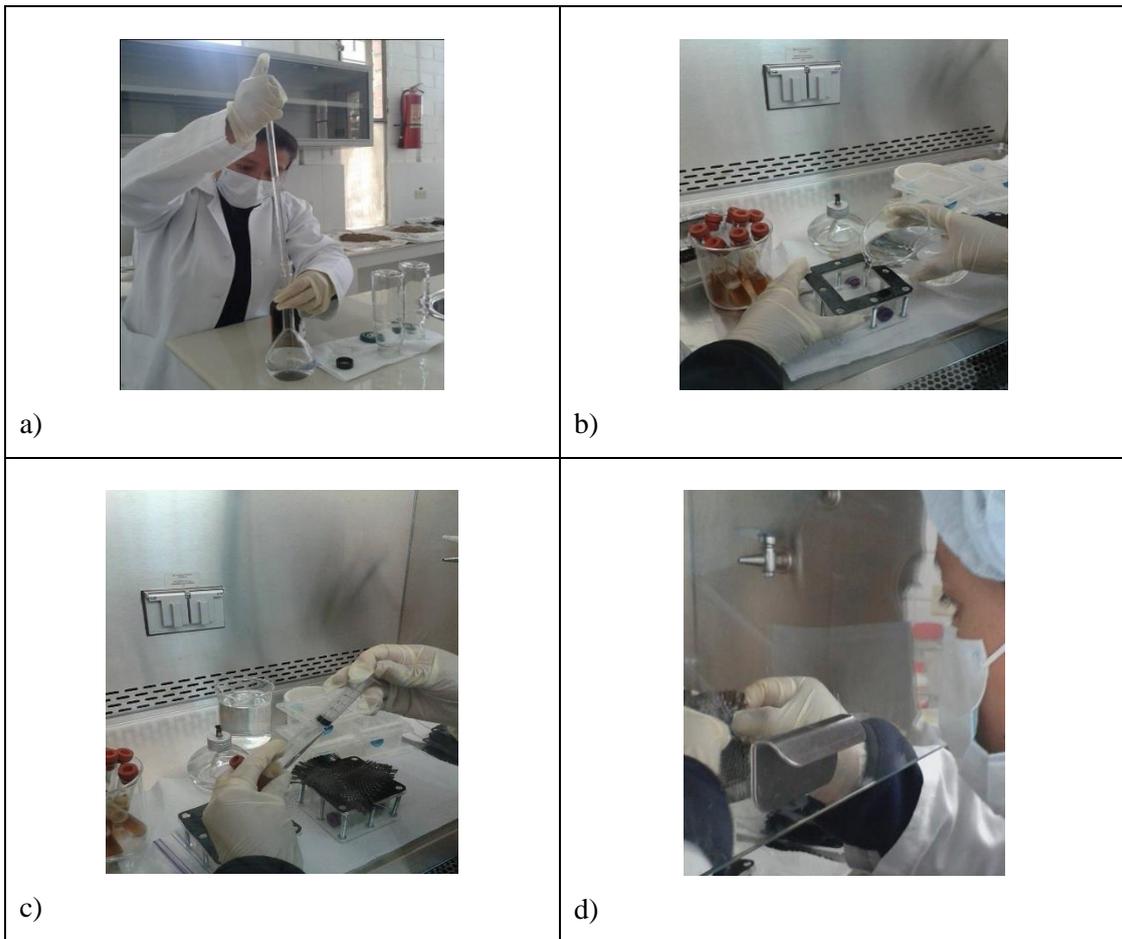
Fuente: Janeta. Rosa, 2016

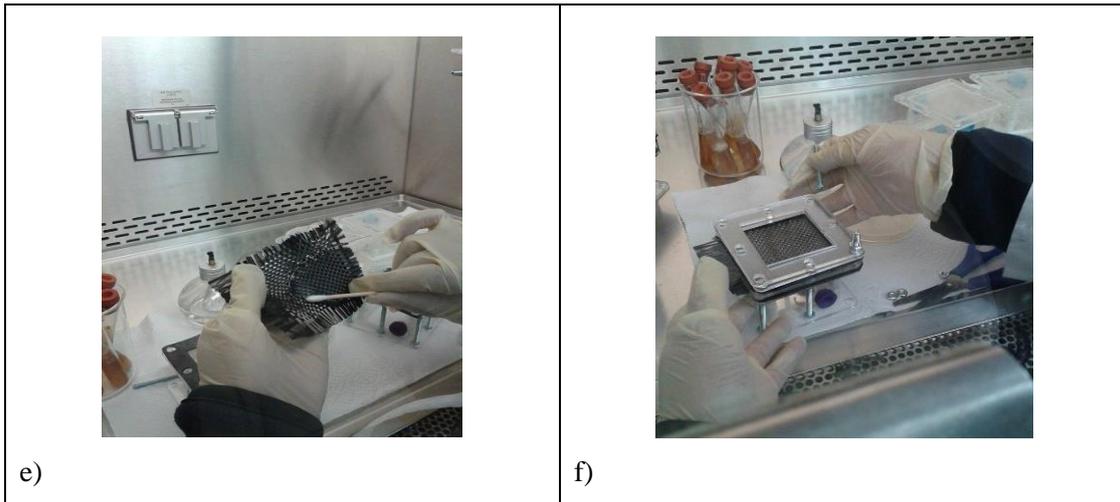
2.5.2.2. Preparación del agua residual sintética de metal plomo

Verificando su crecimiento bacteriano en el agar cerebro corazón procedemos a preparar las soluciones de nitrato de plomo a concentraciones de 5 ppm y 20 ppm, se pesó 0,1914 g de $Pb(NO_3)_2$, se aforo a 250 mL con agua destilada luego con una pipeta graduada succionamos alícuotas de la solución madre 5 ml y 20mL de Nitrato de plomo, cada una se aforo a 500 mL con agua tesalia, estas soluciones preparadas se distribuyeron 125 mL a concentraciones de 5 ppm por duplicado en 2 CCMs mientras que para el blanco se adicionó agua tesalia y bacteria en las CCMs, para la concentración de 20 ppm se adiciono 125 mL de la solución preparada en dos CCMs las mismas que se preparó por duplicado mientras que para el blanco se adiciono en la CCMs agua tesalia y bacteria; luego de la distribución de las soluciones preparadas se procedió a sembrar 2 mL

de bacterias que anteriormente se realizó la reactivación, esta siembra se lo realizó en una cámara de flujo laminar, luego en la fibra de carbono tratada ponemos un alambre de titanio y con un isopo esterilizado colocamos las bacterias empapando la fibra tratada para que se forme una biopelícula.

Sellamos las CCMs con capas diferentes de acrílico y caucho para evitar derrames, para el ánodo: 1 capa de acrílico, caucho, fibra tratada, caucho y 2 capas de acrílico; para el cátodo: caucho, papel celofán, fibra sin tratar, caucho y 2 capas de acrílico, finalmente aseguramos con tornillos alrededor de las CCMs. Se realizó análisis iniciales y finales de las concentraciones del metal después de los 15 días del experimento por el método de EAA. (Ver tabla 4-3)





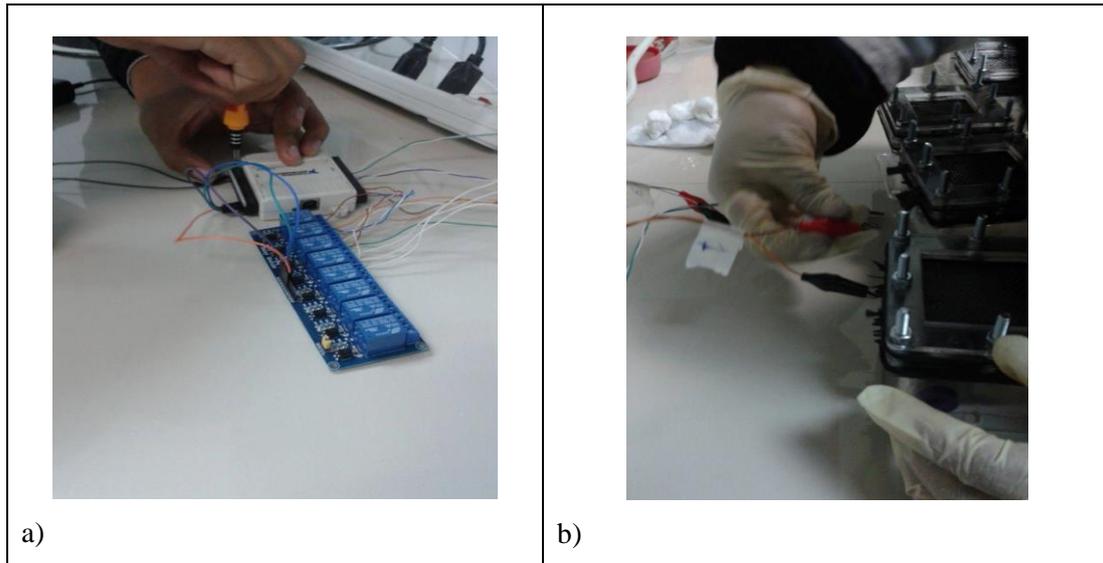
Fotografía 10-2: Pasos de la construcción de las CCMs

Fuente: Janeta. Rosa, 2016

a) Preparación del agua residual sintética (agua tesalia) con el nitrato de plomo a concentraciones de 5ppm y 20ppm; b) Adición del agua residual sintética en las CCMs; c) Adición de las bacterias en las CCMs; d) Incorporación del alambre de titanio en la parte del ánodo; e) Adhesión de la bacteria en la parte del ánodo para la formación de la biopelícula; f) Sellado completo de las CCMs.

2.5.2.3. Implementación del sistema de adquisición de datos para el monitoreo de las CCMs

Para el monitoreo de las CCMs se instaló el equipo DAQ 69000 para la adquisición de datos, los mismos que son enviados a una computadora para su almacenamiento automático, los datos son recopilados en el Software LabVIEW, en un tiempo de 5 min, se observó en la pantalla del computador el registro la generación del voltaje en cada una de las celdas instaladas (ver tabla 5-3), el voltaje se midió en línea con el sistema de adquisición de datos DAQ 69000 (Ver fotografía 9-2).



Fotografía 11-2: Implementación DAQ 6900

Fuente: Janeta, Rosa, 2016

a) Instalación del equipo DAQ 69000; b) Conexión del equipo DAQ 69000 a las CCMs.

El modo de alimentación se lo realizó en modo semi-continúo, es decir se añadía agua residual sintética cuando había una disminución de volumen lo que impedía el contacto del agua residual con la membrana de intercambio de protones. La membrana de intercambio desempeñaba el rol de bio-film previniendo la entrada de oxígeno, el tiempo de alimentación variaba de acuerdo a las condiciones climatológicas del día, en día calurosos se producía mayor evaporación.



Fotografía 12-2: Alimentación con agua residual sintética preparada

Fuente: Janeta. Rosa, 2016

2.5.3. Técnicas de análisis de metales

Para el análisis de metales pesados se utilizó técnicas ESTÁNDAR en Espectroscopia de Absorción Atómica por Llama y/o la Técnica por Colorimetría.

2.5.3.1. Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama “EAA”

La EEA consiste de una técnica empleada más comúnmente para la determinación de más de 60 elementos de metales pesados en rangos que van desde $\mu\text{g/mL}$ - ng/mL ; debido a su especificidad, sensibilidad y facilidad de operación, esta técnica valoró las concentraciones de metales pesados con y sin la presencia de bacterias *Pseudomonas sp.*, determinando así los niveles de concentraciones iniciales y finales en una muestra en estado líquido a través de la función de la flama o llama que tiene como función generar átomos en su estado fundamental de los elementos presentes en la muestra.

2.4.5.2. Colorimetría

Esta técnica relaciona la absorción de la luz con la profundidad de la solución con color, por lo tanto cuando un haz de luz monocromático pasa a través de un medio absorbente su intensidad decrece a medida que la longitud de onda aumenta; por lo tanto al suministrar el metal correspondiente a la muestra con *Pseudomonas* emitirá un determinado color el cual será leído por el fotómetro de acuerdo a la cantidad de concentración que bioabsorba o degrade cierto microorganismo.

2.5.4. Lugar experimental

La adecuación y el monitoreo de las CCMs, se lo realizó en el laboratorio de Protección Ambiental de la Facultad de Ciencias – ESPOCH.

2.5.5. Materiales Experimentales

En la Tabla 2-2, se identifica y se detalla los materiales como: las cantidades y equipos utilizados para el desarrollo de esta investigación tomando en cuenta las etapas que lo componen.

Tabla 3-2: MATERIALES Y EQUIPOS

ETAPAS	EQUIPOS Y MATERIALES	CANTIDAD
TRANSPORTE Y ADECUACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA	Cooler	1
	Papel Aluminio	1rollo
	Matraz	2
	Termo	1
	Pipetas	2
	Algodón	1 paquete
	Mandil	1
	Guantes	2 pares
	Mascarilla	1
	Incubadora	1
	Autoclave	1
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN	Balones de aforo 250 mL	3
	Pipetas graduadas	1
	Kits de Identificación	7
	Erlenmeyer	1
	Probetas	1
	Tubos de ensayo	10
	Bombas de succión	2
	Cámara de Flujo Laminar	1
PRUEBAS DE ENSAYO DE LA PSEUDOMONA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS METALES PESADOS	Balones de aforo 500 mL	3
	Botellas de vidrio de 200 mL	27
	Pera de succión	1
	Pipetas graduadas	3
	Autoclave	1
	Cámara de Flujo Laminar	1
	Cajas petri	12
	Tubos de ensayo	6
	Recipientes de acrílico de volumen de 125ml, 6 mm de grosor y 5.5 cm de diámetro	6
	Tejido de fibra de carbono de 0.009 plg de espesor	1,2 m ²
	Alambre de cobre para	2 m

CONFIGURACIÓN DE LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS	conexiones de timbre	
	Lagartos de conexiones	12
	Papel celofán	3m ²
	Tornillos	48
	Pernos	48
	Cauchos como empaques de sellado	12
	Alambre de titanio	6
MONITOREO DE LAS CCMs	Sistema de adquisición de datos DAQ 6900	1
	Cable USB Explorer	1
	Multímetro Digital SDA-201 para comprobación	2
	Computador de escritorio	1
ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS	Cámara de flujo Laminar	1
	Membranas de digestión	9
	EAA	1
	Fotómetro	1
	Autoclave	1
	Incubadora	1

Realizado por: Janeta Rosa, 2016

2.6. Planteamiento de Hipótesis

2.6.1. Hipótesis Textual

Las *Pseudomonas sp.* tienen la capacidad de interactuar con diversas concentraciones de metales pesados durante el proceso de experimentación en una celda de combustible microbiana para la producción de bioelectricidad y biorremediar.

2.6.2. Hipótesis Estadística Causal Bivariada

“Las concentraciones de metales pesados influye en la producción de bioelectricidad en una Celda de Combustible Microbiana inoculada con *Pseudomona aeruginosa*”

Por consecuencia:

Variable dependiente.- Generación de bioelectricidad en una Celda de Combustible Microbiana en Voltaje.

Variable independiente.-Cepa de *Pseudomona aeruginosa* en concentraciones de metales pesados sintéticos en ppm.

$$H_0: \delta C_{mp} = \delta P_{ev}$$

$$H_a: \delta C_{mp} \neq \delta P_{ev}$$

Donde:

δC_{mp} = Concentración de metales pesados

δP_{ev} = Producción de energía en voltios

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tinción Gram

Mediante la observación realizada en el microscopio (Ver fotografía 1-3) se verifico efectivamente que se trataba de una bacteria Gram negativa, ya que presentaba características propias en su estructura, en forma de bastoncillos alargados y además la coloración final que tuvo fue de color rosácea.



Fotografía 1-3: Observación de la cepa bacteriana en el microscopio

Fuente: Janeta, R, 2016

3.2. Pruebas bioquímicas

Tabla 1-3: Resultado de pruebas bioquímicas para identificación de la bacteria.

Reactivo	Reacción	
Urea	Detección de Ureasa	(+)
SIM	Movilidad de Especie	(+)
Medio Simmons	Citrato como única fuente de C.	(-)
Kligler	Presencia de fermentación de glucosa	(+)

Realizado por: Rosa Janeta, 2016

En la (**Tabla 1-3**), las reacciones producidas por una especie de género Gram- hacen referencia en específico al género *aeruginosa*.

3.3. Prueba ensayo previas a la instalación final de las CCMs

3.3.1. Análisis del agua residual sintética con metales pesados de la prueba ensayo

Los análisis realizados de la prueba ensayo fueron los siguientes:

Tabla 2-3: Interacción de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* y Metales Pesados.

CONCENTRACIONES DE METALES SIN BACTERIAS			CONCENTRACIONES DE LOS METALES CON BACTERIAS A LAS 48 HORAS				
METAL	CONCENTRACIÓN TEORICA ppm	CONCENTRACION EXPERIMENTAL PRELIMINAR Ppm	TÉCNICA DE ANALISIS	CONCENTRACION EXPERIEMTAL (ANALISIS POR DUPLICADO) ppm		CONCENTRACION EXPERIEMNTAL MEDIA ppm	PORCENTAJE DE BIOSORCION
CROMO	0,5	0,8	Colorimetría por Fotometría	0,745	0,49	0,618	22,87%
	1	1,636	Colorimetría por Fotometría	1,60	1,475	1,538	6,04%
	2	2,65	Colorimetría por Fotometría	2,5	2,11	2,30	12,83%
ZINC	5	9,2	Colorimetría por Fotometría	6,4	6,0	6,2	32,6%
	10	11,5	EAA	10,31	9,17	9,74	15,3%
	20	17	EAA	14,69	13,04	13,86	18,47%
PLOMO	5	4,59	EAA	3,14	4,08	3,61	21,35%
	10	9,86	EAA	7,70	8,75	8,23	16,53%
	20	17,60	EAA	10,70	11,60	11,15	36,64%

Realizado por: Janeta Rosa 2018.

Fuente: Tulsma, Anexo I, Libro VI, 2015.

La interacción de la bacteria *Pseudomona, aeruginosa* en los metales pesados (Cr, Zn, Pb) en agua residual sintética en tres concentraciones, nos da valores de biosorción en porcentajes de: 22,8%, 6,04%, 12,83%; 32,6%, 15,3%, 18,47; 21,35, 16,53, 36,64 respectivamente; en relación a las tres concentraciones experimentales preliminares; tenemos que la biosorción es eficiente en: Cromo a 0,5 ppm; Zinc a 5 ppm y Plomo a 20 ppm.

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales muestran que la bacteria *Pseudomona aeruginosa* tiene la capacidad de biosorber los metales pesados en soluciones acuosas. El mayor porcentaje de biosorción por la *Pseudomona aeruginosa* fue para el Plomo con 36,6 % a 20 ppm; Si realizamos una comparación con estudios anteriores podemos decir que coincidimos con Chang, 1997 quien utilizo *Pseudomona aeruginosa* para biosorber Plomo y demostrar la capacidad de la bacteria para la biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados; sin embargo se debe tener en cuenta el pH de las soluciones puesto que existe un rango óptimo de 5 a 8.

3.4. Biosorción del metal Plomo por la *Pseudomona aeruginosa*.

Los resultados experimentales de las concentraciones iniciales y finales en las Celdas de Combustible Microbiana para el metal plomo fueron las siguientes:

Tabla 3-3: Análisis del agua residual sintética del metal plomo de las CCMs

CONCENTRACION DEL METAL SIN BACTERIAS			CONCENTRACION DEL METAL CON BACTERIAS A LOS 15 DÍAS (ppm)				
Met al	Concentración teórica(ppm)	Concentración inicial(ppm)	Técnica de análisis	Concentración final (análisis por duplicado)(ppm)		Concentración final media(ppm)	% de biosorción
Plo mo	5	4,38	EAA	1,88	1,580	1,73	60,50
	20	17,60	EAA	6,30	5,38	5,84	66,81

Realizado por: Janeta Rosa, 2017

La (tabla 3-3) muestra la capacidad que tiene la bacteria para biosorber metales pesados y al mismo tiempo producir bioelectricidad, para este experimento se seleccionó al metal plomo, del cual se preparó soluciones con agua tesalia de 5 y 20 ppm, dichas soluciones fueron añadidas en las Celdas de Combustible Microbianos junto con las bacterias; Luego de realizar los cálculos con las concentraciones experimentales iniciales y finales obtuvimos valores de 60,50% y 66,81% respectivamente, demostrando que la bacteria *Pseudomona aeruginosa* tiene la capacidad de biosorber metales pesados en soluciones acuosa; la concentración inicial de soluto parece tener un impacto en la biosorción, a una concentración más alta resulta tener mayor captación de solutos (Ho et. 1999).

3.5. Producción de bioelectricidad

3.5.1. Adquisición de datos mediante el Software LabVIEW para la producción de bioelectricidad

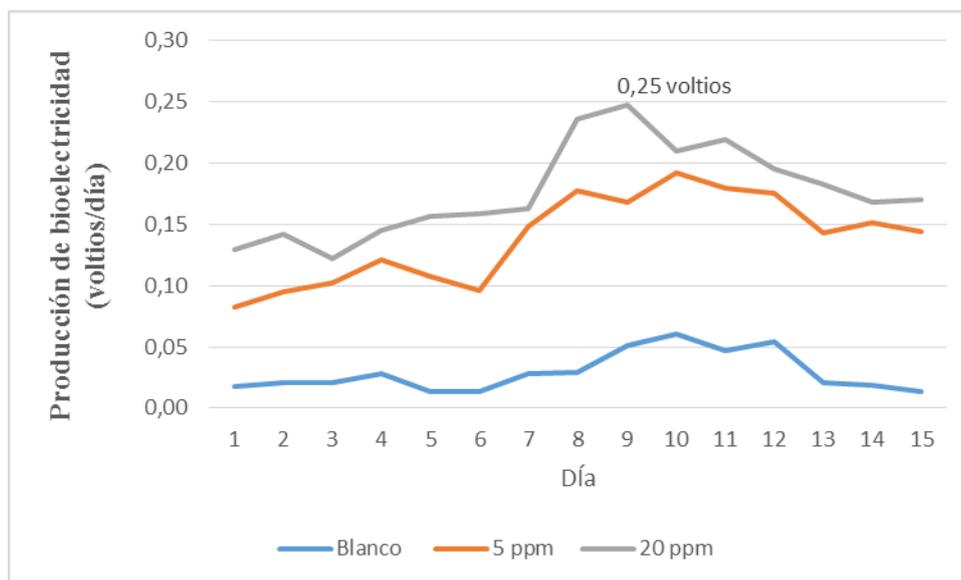
Tabla 4-3: Base de datos de la generación del voltaje en las Celdas de Combustible Microbiana

CONCENTRACIÓN DEL METAL PLOMO 5 PPM				CONCENTRACIÓN DEL METAL PLOMO 20 PPM		
Días	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6
	Blanco 1	CCMs.1.Rep.1	CCMs.2.Rep.2	Blanco 2	CCMs.1.Rep.1	CCMs.2.Rep.2
DIA 1	0,01442567	0,09146164	0,07421502	0,02015792	0,1055993	0,15237093
DIA 2	0,02097185	0,11620578	0,07406902	0,021108744	0,11916683	0,16479863
DIA 3	0,01406461	0,09787187	0,10753736	0,026695521	0,10787187	0,13551491
DIA 4	0,04340448	0,13228943	0,11056086	0,012695678	0,14695048	0,14325012
DIA 5	0,01367626	0,1137148	0,10045439	0,012922089	0,1491986	0,16439089
DIA 6	0,01328448	0,08166275	0,07136963	0,013779301	0,16173617	0,15579156
DIA 7	0,02414136	0,16834405	0,12733295	0,031103901	0,16432638	0,16084477
DIA 8	0,02904571	0,2137993	0,14117218	0,028918175	0,25007829	0,22232307
DIA 9	0,05608018	0,22853664	0,16345679	0,04638513	0,26343497	0,23200548
DIA 10	0,06167759	0,17025328	0,16599753	0,058731256	0,19025328	0,18599753
DIA 11	0,04942557	0,20800145	0,19048351	0,045081443	0,22800145	0,21048351
DIA 12	0,05372896	0,18778763	0,16250998	0,055053434	0,20778763	0,18250998
DIA 13	0,02380305	0,19031681	0,13515908	0,018467825	0,21031681	0,15515908
DIA 14	0,01126974	0,14601423	0,14019085	0,02617776	0,16601423	0,16019085
DIA 15	0,01246951	0,16160993	0,14742816	0,014714251	0,18160993	0,16742816

Realizado por: Janeta Rosa, 2017

Los valores presentados en la (Tabla 4-3), son datos promedios de voltaje por día de las Celdas de combustible microbiana en el transcurso de los 15 días del experimento, los mismos que fueron almacenados automáticamente en un computador con el **Software LabVIEW**.

Con la base de datos de la (Tabla 4-3) se hizo una gráfica de líneas en el Excel 2013, haciendo una relación; los días, concentración de los metales de 5 y 20 ppm de Pb con respecto a los voltajes generados por cada concentración durante los 15 días de experimentación, para la producción de bioelectricidad (Ver grafica 1-3). Según se indica.



Grafica 1-3 Producción de bioelectricidad

Fuente: Janeta L, R. 2018

Como se observa en la (Gráfica 1-3) se evaluó la tendencia que tiene los voltajes generados con respecto a los días; concentración del metal, en los 15 días del experimento a concentraciones de 5 y 20 ppm del metal plomo; observándose gráficamente la mayor generación de voltaje fue de 0,25 voltios en el día 9 a la concentración de 20 ppm.

3.6. Análisis estadístico descriptivo

Comparación de la generación de voltajes con respecto a las concentraciones según sus medias, los mínimos y los máximos de cada experimento.

Tabla: 5-3 Generación de voltaje de acuerdo a sus medias, mínimos y máximos

VOLTAJE	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Blanco	30	,02911538197	,016619152854	,011269745	,061677586
Pb (5 ppm)	30	,14066022973	,043618579277	,071369632	,228536637
Pb (20 ppm)	30	,17484685597	,039211479113	,105599299	,253434975

Realizado por Rosa Janeta

De acuerdo a la (Tabla 5-3) se observa que la mayor generación de voltaje fue siempre la concentración de 20 ppm; según sus medias genero 0,17 voltios y según sus máximos en datos brutos fue de 0,25 voltios.

3.6.1. Test de Duncan

El test de Duncan se utiliza para hacer comparaciones entre las medias según las variables que se requiera; en este caso se va a verificar con la variable día la generación de mayor voltaje Para esta prueba de análisis de varianza se procesaron los datos (Tabla 4-3) en el programa estadístico infoStat 2017 para saber en qué días hubo mayor producción de bioelectricidad obteniendo los siguientes resultados (Ver tabla 6-3).

Tabla: 6-3: Análisis de medias de voltaje para la variable día en la Producción de Bioelectricidad

Días	Medias	E.E.							
1	0,08	0,01	A						
3	0,08	0,01	A						
6	0,08	0,01	A						
2	0,09	0,01	A	B					
5	0,09	0,01	A	B	C				
4	0,10	0,01	A	B	C	D			
14	0,11	0,01		B	C	D			
7	0,11	0,01			C	D			
15	0,11	0,01			C	D			
13	0,12	0,01				D	E		
10	0,14	0,01					E	F	
12	0,14	0,01					E	F	G

8	0,15	0,01						F	G
11	0,17	0,01						F	G
9	0,17	0,01							G

Realizado por: Rosa Janeta, 2017

De acuerdo a los resultados obtenidos en la (tabla 8-3) se puede observar que en los días 9 y 11 generaron promedios de voltaje de 0,17 V, según Wajda, 2017 se puede afirmar que la captación de plomo (II) aumenta con el tiempo debido a que las bacterias se encontraban activas y que su capacidad de biosorción de Pb es óptima en la fase estacionaria temprana, mientras que a partir del día 12 comienza a disminuir los voltajes, generando 0,14 V, por lo que se presume este descenso de voltaje debido a que las bacterias biosorbieron todo el metal en la parte celular interna saturándose de esta manera. Según Li D, 2015 demostraron que la acumulación de Pb intracelular se contribuyó principalmente a la clara actuación entre biosorbentes vivos.

3.7. Discusión de Resultados

Recientemente, las celdas de combustible microbiano han llamado una atención global por convertir energía electroquímica a energía eléctrica a partir de compuestos orgánicos y poseer la capacidad de reducción de metales pesados, esta reacción ocurre espontáneamente debido a los potenciales del cátodo (oxígeno-reacción del metal pesado) son positivos y el potencial del ánodo (cámara anaeróbica, bacterias) son negativos y el mediador (tejido de fibra de carbono) conduce los electrones del ánodo al cátodo.

La bacteria *Pseudomona sp* a utilizar en el proceso de biorremediación fue de un estudio previo de la (UNACH) que tenían como objetivo realizar un conteo e identificación del número de especies características y endémicas de la zona, fue aislada utilizando la técnica de diluciones sucesivas de muestras de suelos de páramo en la zona de recarga de la Laguna Mapahuiña, Ecuador. Se llevaron a cabo pruebas de tinción de Gram, donde se observó que son bacilos Gram negativos, mientras que para esta investigación se hicieron pruebas bioquímicas para identificar a que especie pertenece.

La presencia de iones metálicos en efluentes industriales finales es extremadamente indeseable, ya que son tóxicos para los organismos inferiores y superiores. En determinadas condiciones ambientales, los metales pueden acumularse a niveles tóxicos y causar daño ecológico (Jefferies y Firestone, 1984). De los metales importantes, mercurio, plomo, cadmio y cromo, están en proceso de comercialización (Prasad y Freitas, 2003).

Más tarde, se analizó la interacción entre metales pesados y bacterias en diferentes concentraciones. La capacidad bacteriana de crecer bajo concentraciones cada vez mayores de metales pesados se analizó de acuerdo con la capacidad de tolerancia de la cepa, como la biodisponibilidad del metal (Singh R., 2013), (Silva R., 2009). Los metales seleccionados fueron: cromo, zinc y plomo, para determinar la tolerancia de la cepa; se incorporaron en agua tesalia suplementado con los metales correspondientes en compuestos de: $K_2Cr_2O_7$, $ZnSO_4$ y $Pb(NO_3)_2$. Cada experimento se repitió dos veces y las concentraciones se basaron en los límites permisibles según la constitución actual de Ecuador (Tulsma, Anexo I, Libro VI, 2015) duplicando y cuadruplicando su concentración debido a la buena capacidad de biosorción de la cepa bacteriana.

Hay tres ventajas principales de las tecnologías biológicas para la eliminación de contaminantes; primero, los procesos biológicos pueden llevarse a cabo de forma in situ (en el sitio contaminado); En segundo lugar, las tecnologías de bioprocesos son usualmente ambientalmente benignos (sin contaminación secundaria) y tercero, son rentables.

Las células activadas de *P. aeruginosa* fueron capaces de biosorber iones Pb^{+2} , Cr^{+6} y Zn^{+2} con capacidades considerablemente altas. La biomasa mostró diferentes capacidades de absorción para Cr y Zn, mientras que el efecto para la etapa de biosorción de Pb se adaptó muy bien en la cámara anódica de un CCM que ayudaba a la transferencia de electrones, produciendo electricidad a medida que disminuía la concentración de Pb, lo que sugiere que el plomo la eliminación se debió no solo a la biosorción, sino también a la reacción redox en el sistema CCM.

La pared celular bacteriana es el primer componente que entra contacto con iones metálicos, donde los solutos pueden depositarse en la superficie o dentro de la estructura de la pared celular (Beveridge y Murray, 1976; Doyle et al., 1980). Desde el modo de captación de solutos por las activas es intracelular, los grupos funcionales de la pared celular desempeñan un papel vital en la biosorción. Debido a la naturaleza de los componentes celulares, varios grupos funcionales son presente en la pared celular bacteriana, que incluye carboxilo, fosfato, grupos amina e hidroxilo (Doyle et al., 1980; Van der Wal et al., 1997). Como están cargados negativamente y abundantemente disponibles, los grupos carboxilo participaron activamente en la unión de cationes metálicos.

En general, células vivas y no vivas pueden eliminar metales por biosorción principalmente debido a los grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, fosfato, amina y sulfato) de polisacáridos, proteínas y lípidos en las paredes de las células bacterianas (Vullo et al., 2008). Fosfolípidos y los lipopolisacáridos se consideran los principales moléculas que contribuyen a la biosorción en bacterias Gram negativas (Masoudzadeh et al., 2011), la absorción aumenta con el aumento de la concentración, y alcanzará la saturación en concentraciones más altas. A concentraciones de 20 ppm de plomo se consiguió una biosorción de 36,64% a las primeras 48 horas, y al ser

incorporadas en una CCM se logra una biosorción del 66,81% del mismo metal y una producción simultánea de voltaje de 0,25V en el mejor de los casos.

3.7.1. Prueba de Hipótesis

El intervalo de confianza para un estimador, es un rango dentro del cual los valores no pueden ser considerados estadísticamente diferentes unos de otros, y se encuentran sujetos a un nivel de confiabilidad del 95% para este caso.

3.7.1.1. Hipótesis Estadística Causal Multivariada

Esta hipótesis hace la relación entre la variable independiente (Cepa de *Pseudomona aeruginosa* en concentraciones de metales pesados sintéticos en ppm) con respecto a la variable dependiente que es la (Generación de bioelectricidad en una Celda de Combustible Microbiana en V)

$$H_0: \delta C_{mp} = \delta P_{ev}$$

$$H_a: \delta C_{mp} \neq \delta P_{ev}$$

La hipótesis planteada nula nos menciona que las varianzas de los niveles totales de Concentración de metales pesados son iguales a los niveles de producción de energía; mientras que la hipótesis alterna nos dice que los niveles de concentración de metales pesados no son iguales a los niveles de producción de energía. Con las hipótesis planteadas se conocerá estadísticamente si existe una correlación entre las variables.

3.7.1.2. Análisis de normalidad

El análisis de normalidad nos ayuda a verificar si los datos siguen una distribución normal de tal forma nos permitió escoger el test adecuado para la interpretación de resultados

H₀: Los datos siguen distribución normal

H₁: Los datos no siguen distribución normal

Nivel de significancia “ α ”= 0.05

A través del análisis del test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov proyectó un p-value de 0,200; siendo mayor al nivel de significancia de 0,05; es decir aceptamos la hipótesis nula H₀ y

rechazamos la H1; indicándonos que los datos de voltaje en las celdas siguen una distribución normal al 95 % de confiabilidad.

3.7.1.3. Análisis de homocedasticidad

El análisis de homocedasticidad comparando con el análisis de normalidad nos ayuda a elegir un test adecuado para la interpretación de la hipótesis general planteada.

Con el análisis del test de Levene dio un p-valor 0,552, siendo mayor al nivel de significancia de 0,05%, los valores presentan homocedasticidad de datos, por lo que se aplicaría pruebas paramétricas.

3.7.1.4. Pruebas paramétricas

Anova de un factor

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Nos sirve para la comprobación de las variables; en este caso sería la concentración de los metales pesados con respecto a la cantidad de bioelectricidad producida.

Ho: $\delta C_{mp} = \delta P_{ev}$ Los niveles de concentración de metales pesados no son diferentes a la producción de energía.

Ha: $\delta C_{mp} \neq \delta P_{ev}$ Los niveles de concentración de metales pesados son diferentes a la producción de energía.

El p-value = 0.000 mediante ANOVA nos dice que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; indicándonos que los niveles de concentración de metales pesados si afecta directamente a la producción de bioelectricidad.

CONCLUSIONES

La cepa bacteriana proveniente de los Suelos de Páramo de la Laguna de Mapahuiña, provincia de Chimborazo del Género *Pseudomona* se identificó a partir de pruebas bioquímicas corresponde a la especie *aeruginosa*; con potencial para la biosorción de metales pesados en procesos de biorremediación.

De los análisis químicos realizados del agua residual sintética con Cr, Zn y Pb con dosis que duplican y cuadriplican a las propuesta por el TULSMA para aguas de descargas a un cuerpo de agua dulce, antes y después del tratamiento con la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, se observó que tiene una importante capacidad de biosorción principalmente para el Pb que sextuplico el porcentaje biosorbido del Cr. Por otro lado, se inoculó en las Celdas de Combustible Microbiana la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en agua residual sintética a dos concentraciones de Pb alcanzando un 66 % en la muestras de 20 ppm

En el monitoreo de las Celdas de Combustible Microbiana muestra con gran eficacia la generación de voltaje; al observar los resultados, la generación de voltaje tiene una relación directa con la concentración de Pb; en el ensayo experimental a altas concentraciones de Pb genero 0,25 voltios.

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas con aguas de descarga de industrias que contengan metales pesados, para conocer si la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se podría adaptar.
- Buscar aplicaciones de las CCMs como biosensores ambientales, estudiando su asimilación y su tiempo de respuesta a diversas concentraciones para monitoreo in situ de contaminantes.
- Analizar CCMs de flujo continuo ya que se podría determinar diversas concentraciones de un mismo metal, conociendo el grado de tolerancia y toxicidad del contaminante como el tiempo de permanencia del voltaje producido con las bacterias.

BIBLIOGRAFÍA.

- AHMAD, R., y HASEEB, S.** Adsorption of Pb(II) on Mentha piperita carbon (MTC) in single and quaternary systems. *Arabian Journal of Chemistry*, [en línea]. vol. 10 (2017), pp. 412-421. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.09.013>
- AINIA, P. R.** Metales pesados en alimentos, [en línea]. 2003. Recuperado 5 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.ainia.es/noticias/seguridad-alimentaria/metales-pesados-en-alimentos-como-se-analizan/>
- ALBERICH, A; et al. ARIÑO, C.** Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems. *The Analyst*, [en línea]. Vol. 133 (2008), pp. 112-125. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/b715667g>
- ÁLVAREZ, Benito.** Pruebas Bioquímicas de Identificación Bacteriana., [en línea]. (1990). Recuperado 5 de abril de 2018. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/50402732/Pruebas-Bioquimicas-De-Identificacion-Bacteriana-26-pp>
- BROWN, & LESTER, Pedro.** Studies on removal of toxic metals from waste water using pseudomonas species, [en línea]. Vol. 4 (2009). pp 7-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>
- CALDERÓN, C., et al.** "Monitoring of Microbial Population of the Páramo Soil of the Charge Zone of Lake Mapahuíña In Chimborazo-Ecuador", vol. 1, (2016). pp. 8.
- CARBALLO, M.** Biosorción de Cinc y Cadmio [en línea]. (2009). Recuperado 5 de abril de 2018, Disponible en: <https://es.scribd.com/document/362162084/Biosorción-de-Cinc-y-Cadmio-de-Carballo-Valdes-Maria-Elena>
- CARDONA G., et al.** Evaluación del poder biosorbente de cáscara de naranja para la eliminación de metales pesados, Pb (II) y Zn (II). *Ingeniería*, Vol. 17 (2013). pp 25-35.
- CASCARET, C., et al.** Determinación de la capacidad de adsorción de cromo (VI) por biomasa bacteriana. *Revista Cubana de Química*, Vol. 3 (2014), pp 215-224.
- DAUGHNEY, M., KHAN, M. S., & ZAIDI, A.** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, [en línea]. Vol. 2 (1998), pp 121-129. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.006>
- DOLLY, Hurtado.** Celdas de Combustible Microbianas un reto para la remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Información tecnológica*, [en línea]. Vol. 6 (2013), pp 17-28. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>

- FENG, Y., et al.** Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, [en línea]. Vol.7 (2010), pp 1841-1844. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.030>
- GARCIA, & MORENO.** Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Vol. 3 (2008), pp 192-207. Disponible en: <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>
- HEGAZI, H. A.** Removal of heavy metals from wastewater using agricultural and industrial wastes as adsorbents. *HBRC Journal*, [en línea]. Vol. 3 (2013), pp 276-282. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2013.08.004>
- HUSSEIN, H., et al.** Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, [en línea]. Vol. 7 (2004). pp 25-37 Disponible en: <https://doi.org/10.2225/vol7-issue1-fulltext-2>
- KIM, M., et al.** A novel biomonitoring system using microbial fuel cells. *Journal of Environmental Monitoring*, [en línea]. Vol. 12 (2007), pp 13-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/b713114c>
- KUYUCAK, & VOLESKY.** Desorption of cobalt-laden algal biosorbent. *Biotechnology and Bioengineering*, [en línea]. Vol. 7 (2004), pp 815-822. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bit.260330704>
- LEDIN, MO, LIAN, MURTHY, & SARANGI.** Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Revista internacional de contaminación ambiental*, Vol. 3 (2008), pp 107-115.
- LI, Y., et al.** Self-sustained reduction of multiple metals in a microbial fuel cell–microbial electrolysis cell hybrid system. *Bioresource Technology*, [en línea]. Vol. 2, (2015), pp 238-246. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.030>
- LIU, H., RAMANATHAN, & LOGAN, B. E.** Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*, [en línea]. Vol. 7, (2004), pp 2281-2285. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es034923g>
- LOGAN, B. E., & REGAN, J. M.** Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, [en línea]. Vol. 12, (2006), pp 512-518. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>
- LÓPEZ-REYES, L.** Adsorción de ácidos carboxílicos de origen vegetal y bacteriano en un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*, Vol. 3, (2012), pp 50-10.
- MACASKIE, L., TANGAROMSUK, & DOMINGO.** Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology*, [en línea]. Vol. 4, (2009), pp 1533-1538. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.057>

- MANIKANDARAJA, P., & SENTHILKUMARAN, R.** Research Article A Study on degradation and characterization of heavy metals in industrial effluents waste using *Pseudomonas* sp. isolated from soil samples. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research*, Vol. 10, (2014), pp 34-55.
- MARRERO-COTO, J., DÍAZ-VALDIVIA, A., & COTO-PÉREZ, O.** Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación, Vol. 1, (2010), pp 13.
- POSADA, N. B. M., & NIÑO, G.** Sistema de electrocoagulación como tratamiento de aguas residuales galvánicas. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, [en línea]. Vol. 1, (2010), pp 33-44. Disponible en: <https://doi.org/10.18359/rcin.282>
- RABAEY, K., & VERSTRAETE, W.** Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, [en línea]. Vol. 6, (2005), pp 291-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>
- REVELO, D. M., HURTADO, N. H., & RUIZ, J. O.** Celdas de combustible microbianas (ccms): un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información tecnológica*, [en línea]. Vol. 6, (2013), pp17-28. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>
- RODRÍGUEZ, M. E., MIRANDA, R. C., OLIVAS, R., & SOSA, C. A.** Efectos de las Condiciones de Operación Sobre la Biosorción de Pb²⁺, Cd²⁺ y Cr³⁺ en Solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual. *Información tecnológica*, [en línea]. Vol. 6, (2008), pp 47-55. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642008000600006>
- RUBIO, D. I. C., CALDERÓN, R. A. M., GUALTERO, A. P., & ACOSTA, D. R.** Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión Treatments for Removal of Heavy Metals Commonly Found in Industrial Wastewater. A Review, (2015), pp 18.
- SHUMATE, & STRANDBERD.** The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, [en línea]. Vol.1, (1985), pp 17-40. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00036-5](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00036-5)
- SINGH, R., BISHNOI, N. R., & KIRROLIA, A.** Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* an innovative bioremediation tool in multi metals ions from simulated system using multi response methodology. *Bioresource Technology*, [en línea]. Vol. 8, (2013), pp 222-234. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.100>
- SONG, H., et al.** Simultaneous Cr (VI) reduction and phenol degradation in pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095. *Bioresource Technology*, [en línea]. Vol. 1, (2009), pp 5079-5084. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.060>

- SOTO, C., et al.** Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA*, Vol. 14 (2010), Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/161>
- STERRITT, & LESTER.** Interactions of heavy metals with bacteria. *Science of The Total Environment*, [en línea]. Vol. 1, (1980), pp 5-7-12. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(80\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(80)90122-9)
- SUÁREZ, P., & REYES, R.** La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, [en línea]. Vol. 4, (2002). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=33906702>
- TANDAZO F.** Review Final (Fundamentos de Microbiología) - Documents - The Best Way to Share & Discover Documents. (1997). Recuperado 5 de abril de 2018, a partir de https://bitedoc.org/philosophy-of-money.html?utm_source=review-final-fundamentos-de-microbiologia
- TEJADA, C., HERRERA, A., & RUIZ, E.** Utilización de biosorbentes para la remoción de níquel y plomo en sistemas binarios, Vol. 6 (2016).
- VIJAYARAGHAVAN, K., & YUN, Y.-S.** Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, [en línea]. Vol. 3, (2008), pp 266-291. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
- VOLESKY, B., & CIMINELLI, V.** Assessment of interference in biosorption of a heavy metal. *Biotechnology and Bioengineering*, [en línea]. Vol. 4, (1997), pp 344-350. Disponible en: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970520\)54:4<344::AID-BIT7>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970520)54:4<344::AID-BIT7>3.0.CO;2-K)
- VOLESKY, B., & HOLAN, Z. R.** Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11(3), (1995), pp 235-250. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bp00033a001>
- VULLO D.** MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS, (2003). Recuperado 5 de abril de 2018, Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>
- WAJDA, L., DUDA-CHODAK, A., TARKO, T., & KAMIŃSKI, P.** Application of principal component analysis for the optimisation of lead (II) biosorption. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, [en línea]. Vol. 10, (2017). pp 193. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2358-7>
- WALTER, & UNTERMAN.** Fundamentos_ biorremediacion.pdf. (1997, 1999). Recuperado 5 de abril de 2018, Disponible en: http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf
- YANG, J., ZHOU, M., HU, Y., & YANG, W.** Cost-effective copper removal by electrosorption powered by microbial fuel cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, [en línea]. Vol. 3, (2016), pp 511-519. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1533-1>

ZHOU, K., et al. Adsorption of lauryl benzyl sulphonate on algae. *Bioresource Technology*, [en línea]. Vol. 2, (1991), pp 111-115. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00000-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00000-3)

ANEXOS

ANEXO A: Identificación de la especie de *Pseudomonas sp.*



ANEXO A.1. Reactivación de la bacteria en Agar Cerebro Corazón



ANEXO A.2. Siembra de las bacterias en Agar Muller

ANEXO B: Interacción entre metales pesados sintéticos a diferentes concentraciones con la *Pseudomonas sp.*



ANEXO B.1. Preparación de las soluciones a diferentes concentraciones de los metales Cr, Zn y Pb



ANEXO B.2. Siembra de las bacterias en las soluciones preparadas de las diferentes concentraciones del Cr, Zn y Pb



ANEXO B.3. Incubación de las bacterias por 48 horas a 30°C

ANEXO C: *Pseudomona sp.* en una Celda de Combustible Microbiana para producir bioelectricidad.



ANEXO C.1. Pretratamiento de la fibra de carbono



ANEXO C.2. Reactivación de la bacteria en Agar Cerebro Corazón



ANEXO C.3. Preparación del Agar Muller para sembrar las *Pseudomonas*



ANEXO C.4. Siembra de la *Pseudomona*



ANEXO C.5. Preparacion de celdas para sembrar las bacterias.



ANEXO C.6. Construccion de las celdas



ANEXO C.7. Monitoreo de las Celdas de Combustible Microbiana