



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**PEDECIBA QUÍMICA**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

**DIVERSIDAD MICROBIANA EN ÁNODOS DE  
CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE  
SEDIMENTO**

AUTOR: BC. MARIANA BUADAS

TUTORES: DR. JAVIER MENES

DRA. ANGELA CABEZAS

MONTEVIDEO, OCTUBRE 2017



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar esta tesis con una beca de maestría (POS\_NAC\_2014\_1\_102774) y a PEDECIBA Química por el apoyo económico.

Gracias a mis tutores, compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental y miembros de la Cátedra de Microbiología por su enseñanza, colaboración, buena disposición y apoyo que permitió mi crecimiento a nivel académico y personal.

# CONTENIDO

---

Agradecimientos.....	1
Resumen .....	4
1 Introducción .....	6
1.1 Celda de Combustible Microbiana.....	7
1.1.1 Performance de las celdas de combustible microbianas.....	8
1.1.2 Tipos de celdas de combustible microbianas .....	11
1.2 Celdas de combustible microbianas de sedimento.....	12
1.3 Biofilm Electroactivo.....	14
1.3.1 Comunidad microbiana en biofilms electroactivos .....	15
1.4 Transferencia Extracelular de Electrones .....	17
1.4.1 Mecanismos de Transferencia Electrónica .....	18
1.5 Microorganismos electroactivos .....	19
1.5.1 Caracterización electroquímica de microorganismos electroactivos.....	20
2 Materiales y Métodos .....	22
2.1 Construcción y operación de celdas de combustible microbianas de sedimento (SMFCs).....	22
2.2 Análisis de la comunidad bacteriana de celdas y controles utilizando técnicas de biología molecular (t-rflp y pirosecuenciación).....	25
2.2.1 T-RFLP.....	26
2.2.2 Pirosecuenciación .....	26
2.3 Aislamiento de bacterias Anódicas en diferentes medios de cultivo y caracterización por secuenciación del gen ARNr 16S .....	27
2.4 Determinación de la electroactividad de las bacterias aisladas.....	30
3 Resultados .....	32
3.1 Construcción y operación de celdas de combustible microbianas de sedimento (SMFCs).....	32
3.2 Análisis de la diversidad bacteriana anódica utilizando técnicas de biología molecular (t-rflp y pirosecuenciación).....	34
3.3 Aislamiento de bacterias anódicas en diferentes medios de cultivo y caracterización por secuenciación del gen ARNr 16S .....	52
3.4 Determinación de la electroactividad de las bacterias aisladas.....	57
4 Discusión.....	63
4.1 Construcción y operación de celdas de combustible microbianas de sedimento (SMFCs).....	63

4.2	Análisis de la diversidad bacteriana anódica utilizando técnicas de biología molecular (t-rflp y pirosecuenciación).....	66
4.3	Aislamiento de bacterias anódicas en diferentes medios de cultivo y caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S .....	68
4.4	Determinación de la electroactividad de las bacterias aisladas.....	70
5	Conclusiones .....	73
6	Perspectivas.....	74
	Bibliografía.....	75
	Anexo.....	83
	Anexo 1. Monitoreo de las SMFC R .....	83
	Anexo 2. Cronoamperometría de los ánodos de las SMFCs R1 y R2. ....	85
	Anexo 3. Afiliación filogenética de la cepa DE1 .....	87
	Anexo 4. Cronoamperometría y Voltamperometría cíclica de <i>S.oneidensis</i> .....	88
	Anexo 5. Método de la ferrozina modificado de Lovley and Phillips, 1986.....	89
	Material Suplementario .....	90

## RESUMEN

---

La reciente búsqueda de fuentes de energía renovables ha motivado la investigación en nuevas tecnologías para la producción de energía eléctrica, siendo un ejemplo de ello las celdas de combustible microbianas (MFC). En estos dispositivos se produce energía eléctrica por acción del metabolismo microbiano. Estas celdas constan de una cámara anódica anaerobia, la cual contiene al ánodo, materia orgánica y microorganismos y cámara catódica aerobia, en la cual se encuentra el cátodo. El ánodo y el cátodo se encuentran conectados por una resistencia. Los electrones generados por el metabolismo microbiano son transferidos al ánodo y viajan a través de un circuito al cátodo, donde ocurre la reducción de oxígeno a agua. Este movimiento de electrones a través del circuito genera una corriente eléctrica. Resulta esencial para la producción de corriente eléctrica que la comunidad microbiana desarrollada en el ánodo se encuentre enriquecida en bacterias capaces de utilizar al ánodo como aceptor final en su cadena de transporte de electrones.

Este trabajo se enfoca en un tipo novedoso de MFC, denominado celda de combustible microbiana de sedimento (SMFC), en el cual la energía eléctrica se produce a partir de la actividad metabólica de los microorganismos presentes en suelos o sedimentos. La energía en las SMFC se produce gracias a la capacidad de algunas bacterias (bacterias electroactivas) de transferir los electrones producidos a partir de la oxidación de los compuestos orgánicos del suelo a un ánodo. Hasta la fecha, pese a que los suelos o sedimentos son reservorios de biodiversidad muy importantes, pocos trabajos han estudiado las comunidades microbianas anódicas de este tipo de MFC y el aislamiento de microorganismos electroactivos a partir de estas MFC es casi nulo.

En el presente trabajo se construyeron SMFC con dos suelos de arroz y un sedimento de laguna de nuestro país. Se estudió la comunidad microbiana presente en los ánodos por técnicas independientes de cultivo y se aislaron bacterias electroactivas de los ánodos. Se logró producir energía eléctrica a partir de los dos suelos de arroz y el sedimento de laguna, sin embargo, se observó una mejor performance para las SMFCs construidas con sedimento de laguna. La producción energética observada, se asoció a un cambio en la comunidad microbiana anódica, en la cual se detectó un enriquecimiento en microorganismos pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria*. Se lograron aislar 11

cepas electroactivas a partir del biofilm anódico. La producción de corriente de las cepas aisladas ensayada por cronoamperometría fue variable, observándose una mejor performance para las cepas DE5 (*Shewanella sp.*), DE3 (*Pseudomonas sp.*) y DE2 (*Lysinibacillus sp.*). El análisis por voltamperometría cíclica de estas cepas reflejó la presencia de un pico redox asociado a la transferencia electrones al ánodo. En base a los resultados obtenidos se propone profundizar el estudio de los mecanismos de transferencia electrónica al ánodo que presentan estas cepas, con el fin de lograr un mejor rendimiento energético.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

A nivel global, la demanda energética está creciendo rápidamente. Actualmente, la mayor parte de la energía utilizada proviene de fuentes no renovables (petróleo, gas natural y carbón) constituyendo la principal causa de emisión antropogénica de dióxido de carbono, gas de efecto invernadero que contribuye al cambio climático mundial (Zabihallahpoor et al., 2015).

En la actualidad, las políticas energéticas gubernamentales tienden a la búsqueda de fuentes de energía sustentables acompañadas de un uso racional de la energía a modo de reducir costos, disminuir la dependencia del petróleo y minimizar el impacto medioambiental. No obstante, aun representan una pequeña fracción de la energía consumida a nivel mundial (BP, 2017). Esto se debe a que hasta el momento, ninguna de estas tecnologías puede competir de forma rentable con la generación de energía a partir de combustibles fósiles.

Históricamente, la matriz energética del Uruguay ha estado conformada mayoritariamente por fuentes no renovables como el petróleo, y fuentes renovables en menor proporción (energía hidroeléctrica). Sin embargo, en los últimos años, la política energética de nuestro país se ha transformado siguiendo la tendencia global. Se ha fomentado la incorporación de nuevas fuentes de energía sustentables, logrando una participación de hasta un 57% de fuentes renovables (hidráulica, eólica, biomasa y solar), en la matriz energética primaria al 2015 (“Balance Energético Nacional - Abastecimiento de energía por fuente,” 2015).

La búsqueda de nuevas fuentes de energía, ha impulsado el desarrollo tecnológico. En este contexto, ha aflorado el interés en las celdas de combustible microbianas (MFCs por su sigla en inglés) como una opción innovadora para la producción de energía, representando un nuevo enfoque de generación de electricidad a partir del metabolismo microbiano. En estos dispositivos, los microorganismos convierten la energía química presente en la materia orgánica a energía eléctrica mediante la transferencia de electrones a un ánodo (Lovley, 2006).

El uso de microorganismos para la producción de electricidad fue descubierto a inicios del siglo XX por Potter (Potter, 1911) Sin embargo recién en 1931, Cohen logró producir

energía mediante la conexión en serie de un lote de celdas de combustible microbianas (Logan et al., 2006). Durante los años sesenta, se estudió el fenómeno de respiración microbiana utilizando un electrodo sólido como aceptor final (Lewis, 1966). A principios de los años noventa, se diseñó una celda de combustible como un posible método para la generación de electricidad a partir de carbohidratos (Allen and Bennetto, 1993). Desde ese entonces se ha investigado en diversas áreas enfocadas en optimizar el rendimiento de las MFCs (Liu and Logan, 2004; Bruce E Logan and Regan, 2006; Pham et al., 2005). En 2006, se planteó el uso potencial para la producción de energía sostenible y renovable, a partir de aguas residuales (Lovley 2006). Y aún más aplicaciones han sido establecidas como ser: sensores de la demanda biológica oxígeno (DBO) (Chang et al., 2004; Kang et al., 2003; Kim et al., 2003), indicadores de la aparición de cadmio en suelo (Jiang et al., 2015), sensores para el monitoreo de arsénico (Rasmussen and Minteer, 2015), biorremediación de uranio (Williams et al., 2010) y monitoreo *in situ* de procesos (Liu et al., 2011). A su vez se han diseñado robots autosustentables para el tratamiento de aguas residuales (Ieropoulos et al., 2010), como por ejemplo, el EcoBot-I, conformado por 8 MFCs (Ieropoulos 2003). También se ha demostrado su aplicación como fuente de energía para la iluminación LED y alarmas de humo (Scott et al., 2016).

Recientemente, los estudios en MFCs se han enfocado en optimizar la eficiencia energética. En un futuro esta tecnología podría brindar un tratamiento de aguas residuales sustentable democratizando el acceso al saneamiento y la energía, ya que alrededor de 2.000 millones de personas en todo el mundo no cuentan con un sistema saneamiento adecuado (Scott et al., 2012).

## **1.1 CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA**

En una celda de combustible microbiana, los microorganismos oxidan materia orgánica como parte de su metabolismo energético y transfieren electrones a un electrodo (ánodo), que actúa como aceptor final de la cadena de transporte de electrones. Básicamente una MFC está compuesta por dos compartimentos, denominados anódico y catódico, separados por una membrana permeable al intercambio de protones. Generalmente el compartimiento anódico es anaerobio mientras que el catódico es aerobio. En el compartimiento anódico deberán existir microorganismos capaces de oxidar materia orgánica (dador de electrones) a dióxido de carbono, protones y electrones. Los electrones

generados se transfieren al ánodo y circulan a través de un circuito hacia el cátodo generando una corriente eléctrica. A su vez, los protones generados en la cámara anódica, difunden a través de la membrana permeable al compartimiento catódico. En la mayoría de las MFCs los electrones que alcanzan el cátodo, participan en la reducción del oxígeno ( $2\text{O}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Kim et al., 2002; Lovley, 2006). Los dadores de electrones en la cámara anódica pueden ser simples como la glucosa (Chae et al., 2009; Chaudhuri and Lovley, 2003) o el acetato (Bond and Lovley, 2003; Sun et al., 2015) o complejos, como la celulosa (Ishii et al., 2008), o la matriz orgánica presente en agua residuales (Moon et al., 2006) o sedimentos (Reimers et al., 2001).

### 1.1.1 Performance de las celdas de combustible microbianas

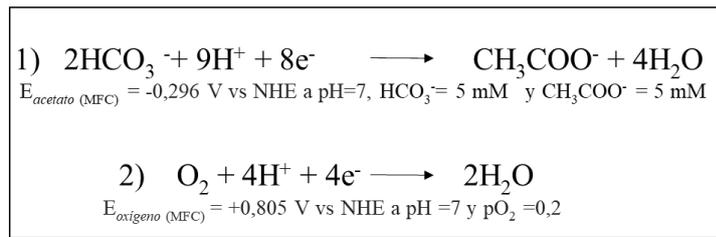
La producción energética teórica en una MFC, se determina a partir de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ). En estos sistemas se puede relacionar la energía libre de Gibbs con el potencial electroquímico o fuerza electromotriz (E), definida como la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo ( $E^\circ$ ).

$$\Delta G^\circ = -nFE^\circ$$

Dónde n representa el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday (96485 Coulomb/mol) y  $E^\circ$  la fuerza electromotriz estándar de la reacción (Bard and Faulkner, 2000).

La energía producida en una MFC dependerá en condiciones ideales solamente del sustrato orgánico reducido y el aceptor final de electrones. A modo de ejemplo, para una MFC con acetato como dador de electrones ( $E_{\text{acetato}} = -0,296 \text{ V}$ ), y con oxígeno como aceptor de electrones ( $E_{\text{Oxígeno}} = +0,805 \text{ V}$ ) (Tabla 1), se obtiene un potencial teórico para la MFC de 1,1 V [ $E_{\text{MFC}} = 0,805 \text{ V} - (-0,2 \text{ V})$ ] (Scott et al., 2016). Sin embargo, en la práctica, el rendimiento energético obtenido resulta ser incierto debido a que existen pérdidas internas que varían según los parámetros operacionales de la MFC (Logan et al., 2006).

Tabla 1. Potenciales teóricos para las condiciones típicas en una MFC (Logan et al., 2006)



NHE: electrodo normal de hidrógeno

El rendimiento general de una MFC se puede describir a través de la eficiencia coulombica (CE), que se define como la cantidad de electrones recuperados a partir del sustrato orgánico en relación al máximo teórico. El máximo teórico se calcula suponiendo que todos los electrones generados en la oxidación del sustrato son convertidos en corriente eléctrica. (Allen and Bennetto, 1993). Otro parámetro utilizado para comparar la eficiencia de las MFCs, es la intensidad de corriente que representa el número de electrones transferidos por segundo a un electrodo. Frecuentemente se expresa como densidad de corriente a modo de normalizar los datos de intensidad de corriente por la superficie del electrodo ( $\text{mA}/\text{cm}^2$ ), o según el volumen de la cámara del electrodo (en  $\text{mA}/\text{cm}^3$ ) (Koch and Harnisch, 2016). La intensidad de corriente y el potencial de la celda se relacionan en circuito cerrado con la ley de Ohm (Chang et al., 2006).

$$E_{\text{celda}} = IR_{\text{ext}}$$

En la que R representa resistencia externa en Ohm, I la intensidad de corriente en Amperes y  $E_{\text{celda}}$  la diferencia de potencial entre los electrodos en Voltios (Nielsen et al., 2007).

El potencial máximo de una MFC obtenido experimentalmente es siempre inferior al teórico debido a pérdidas óhmicas de todo el sistema y pérdidas de energía del electrodo, a menudo referidas como sobrepotencial ( $\eta$ ) del electrodo (Scott et al., 2016). Los sobrepotenciales son pérdidas debido a la resistencia de transferencia electrónica y resistencias internas (Rabaey and Verstraete, 2005). Las pérdidas de energía, principalmente por una alta resistencia interna, limita la potencia producida por estos sistemas (menor a  $6 \text{ W}/\text{m}^2$  o menor a  $500 \text{ W}/\text{m}^3$ ), afectando en forma significativa el escalado de estos dispositivos (Zhao et al., 2009). A modo de estimar las pérdidas

energéticas producidas por la confección de la celda se realiza un control que opera en circuito abierto (OC). El potencial de circuito abierto se mide en ausencia de corriente externa, cuando los electrodos no han sido unidos aún a la resistencia externa. En la práctica se ha observado que el potencial del cátodo (utilizando oxígeno) es sustancialmente más bajo (por ejemplo de +0,2V) que el teórico (+0,805 V), lo cual indica que la mayor pérdida de energía se produce en el cátodo (Logan et al., 2006).

Con el fin de reducir la resistencia interna, se ha modificado el diseño de las MFCs, por ejemplo minimizando la distancia de los electrodos, aumentando la superficie del ánodo o la conductividad de la solución (Bruce E. Logan and Regan, 2006). Otros estudios de optimización se han enfocado en el biofilm (ya sea mediante la selección de cultivos puros o consorcios bacterianos adaptados a las condiciones del reactor), los mecanismos de transferencia (por adición de mediadores redox solubles o modificación genética de microorganismos) y el desarrollo de materiales (Rabaey and Verstraete, 2005). Recientemente, ha surgido el interés en sustituir los cátodos abióticos por biocátodos en los que los microorganismos catalizan la reacción de reducción (Nimje et al., 2012). Es decir, que la performance de las MFCs, depende de factores biológicos y electroquímicos. Entre ellos se incluyen: el tipo de inóculo, la elección y concentración del sustrato o dador de electrones, el pH, la conductividad, la temperatura, el diseño de la celda y los materiales utilizados para la confección de la MFC (Rabaey and Verstraete, 2005).

#### ***1.1.1.1 Microbiología en ánodos de celdas de combustible microbianas***

El potencial del ánodo determina el potencial redox del aceptor final de electrones y en consecuencia el metabolismo de los microorganismos que se encuentran en el ánodo (Rabaey and Verstraete, 2005). En las MFCs, es posible distinguir diferentes vías metabólicas (oxidativas, fermentativas) y hasta la fecha, los microorganismos reportados en los ánodos, son anaerobios facultativos o anaerobios estrictos (Rabaey and Verstraete, 2005). Por otro lado, se debe considerar que los microorganismos capaces de utilizar el ánodo como aceptor final de electrones, pueden utilizar otros aceptores de electrones, como el oxígeno, nitrato, óxidos de hierro y manganeso, sulfato (Madigan et al., 2015). Por ello la presencia de aceptores electrónicos alternativos en el compartimento anódico, puede ocasionar que parte de la comunidad bacteriana obtenga su energía por procesos que no generen electricidad (Bruce E. Logan and Regan, 2006).

### 1.1.2 Tipos de celdas de combustible microbianas

Varios tipos de MFCs se han creado con el propósito de mejorar la potencia obtenida. Existen varias maneras de clasificar las MFCs. Una de las más comunes se basa en su configuración de acuerdo al número de cámaras que pueden ser una o dos (figura 1). El diseño de dos cámaras, se conforma con una cámara anódica y una catódica separadas mediante una membrana de intercambio de protones (PEM). En las MFCs de una cámara el cátodo no se encuentra en una cámara separada si no que se encuentra en contacto directo con el aire en ausencia o presencia de una membrana de intercambio de protones. Otra clasificación refiere al mecanismo de transferencia de electrones, por lo cual se distinguen dos tipos de MFCs, con y sin mediador agregado. El mediador es un transportador de electrones que se agrega al sistema para mejorar la tasa de transferencia de electrones al electrodo (Bruce E. Logan and Regan, 2006). También se pueden clasificar de acuerdo al sustrato en: celdas de combustible de sedimento, celdas de combustible con planta o celdas de combustible de aguas residuales (Nishio, 2010; Wang and Ren, 2013). Esta tesis se enfoca en el estudio de celdas de combustible de sedimento.

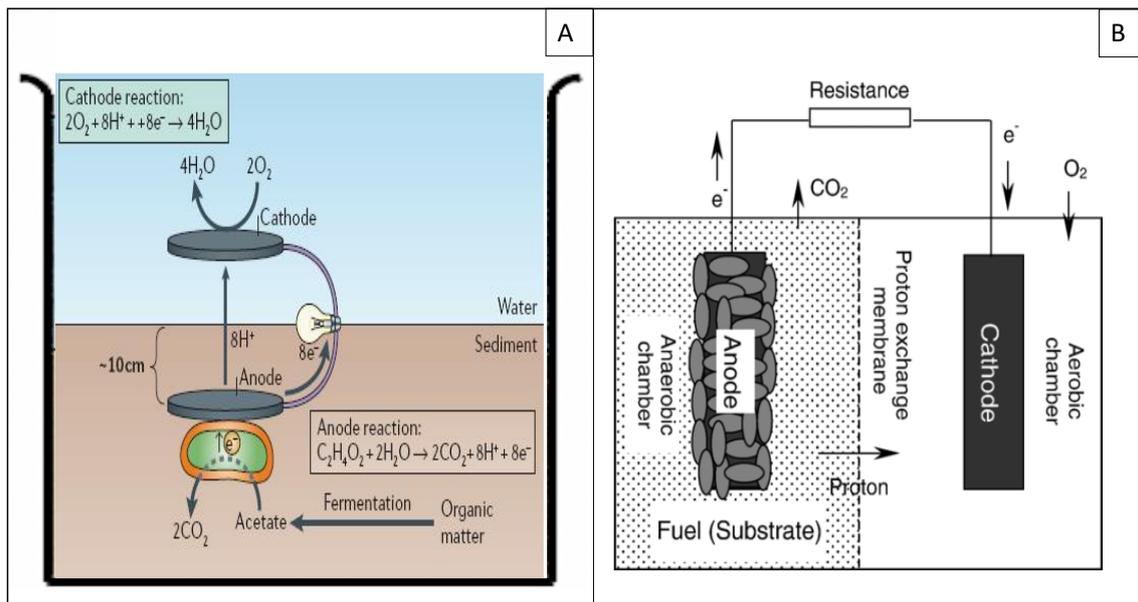


Figura 1. Ejemplos de MFCs. A) MFC de una cámara (Lovley, 2006). B) MFC de dos cámaras (Du et al., 2007).

## 1.2 CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE SEDIMENTO

Las celdas de combustible microbianas de sedimento (SMFCs por su sigla en inglés "Sediment Microbial Fuel Cell"), también conocidas como celdas de combustible bentónicas, constituyen un tipo de MFC, en la cual es posible obtener energía eléctrica a partir del material orgánico presente en suelos o sedimentos acuáticos. Las SMFCs consisten en un ánodo sumergido en un suelo o sedimento anóxico conectado a un cátodo suspendido en agua sobrenadante. En estos sistemas la materia orgánica compleja del suelo es degradada por microorganismos (hidrolíticos y fermentadores) a acetato, u otros compuestos orgánicos producto de la fermentación. Luego, estos compuestos orgánicos más simples son oxidados, por acción del metabolismo microbiano utilizando el ánodo como aceptor final de electrones. Además, se han descrito otros mecanismos que contribuyen a la producción de energía eléctrica, como la oxidación química de compuestos reducidos generados por acción microbiana (ácidos húmicos,  $\text{Fe}^{2+}$ ) y la oxidación microbiana de azufre a sulfato (Bond et al., 2002; De Schamphelaire et al., 2008; Reimers et al., 2001; Ryckelynck et al., 2005).

La transferencia de electrones al ánodo ocurre sólo si la cámara anódica se encuentra en condiciones anaerobias. En la configuración de SMFC de una cámara, esto se logra debido a que la concentración de oxígeno disminuye a medida de que aumenta la profundidad del agua y del sedimento. El oxígeno de la interfase agua-sedimento es removido por parte del metabolismo microbiano oxidativo aerobio, generando un gradiente redox en el sedimento. A su vez, este gradiente se mantiene, por debajo de la superficie del sedimento, con la generación de reductores (como el sulfuro) por parte del metabolismo microbiano oxidativo anaerobio (Froelich et al., 1979; Tender et al., 2008).

Se han utilizado varios inóculos en la construcción de SMFCs, los cuales se caracterizan por poseer una alta densidad de microorganismos y elevada concentración de materia orgánica. Se han confeccionado SMFCs a partir de sedimentos acuáticos de origen marino y de agua dulce (Bond et al., 2002; Holmes et al., 2004), sedimentos de humedal (Dai et al., 2015), suelos de arroz (De Schamphelaire et al., 2010; Kaku et al., 2008) y otros inóculos ricos en materia orgánica (Dunaj et al., 2012; Mei et al., 2015). Los suelos de arroz presentan la ventaja de poseer un elevado contenido de materia orgánica acompañado de un aporte constante de sustancias orgánicas excretadas por las raíces de

la planta. A su vez, el campo de arroz presenta una etapa en la que la parcela es inundada, factor ideal para la aplicación de estos dispositivos (Kaku et al., 2008). En relación al rendimiento energético de las SMFCs construidas con sedimentos acuáticos, se han observado menores rendimientos para las SMFCs construidas con sedimento de agua dulce en comparación con las SMFCs construidas con sedimentos marinos (Holmes et al. 2004). Esto se atribuye a aspectos como la menor conductividad del agua dulce (menor concentración de sales) o menor difusión de oxígeno “*in situ*” (aguas con muy poco movimiento) lo que afecta la reacción catódica (De Schamphelaire et al. 2008).

El desarrollo tecnológico de las SMFCs se ve limitado por la generación de baja energía, con un máximo teórico de aproximadamente 1,2 V. Los principales aspectos que afectan el rendimiento de las SMFCs son: la distancia entre electrodos (a mayor distancia mayor resistencia interna) (Jang et al., 2004), el bajo flujo de reductores en el sedimento debido a la baja transferencia de masa, la presencia de oxígeno disuelto en el ánodo (Yoon et al., 2007) y la disminución de la superficie de los electrodos por deposición electroquímica (ej. azufre) (Reimers et al., 2006). Es deseable que los electrodos sean impermeables a la corrosión biológica o abiótica, pasivación o degradación. Se han utilizado diferentes materiales para la construcción de electrodos como platino; grafito y acero inoxidable. En general, el material más utilizado es el grafito (en forma de hojas, placas o varillas) debido a su estabilidad, alta conductividad, biocompatibilidad, elevada superficie específica y buena relación costo/beneficio (Girguis et al., 2010).

Las SMFCs presentan la ventaja de que pueden generar energía sin la adición de carbono, utilizando la materia orgánica del sedimento como fuente de combustible. Desde el punto de vista medioambiental esta tecnología es ideal debido al mínimo impacto que genera su instalación y operación, no involucra procesos de combustión o etapas de transformación térmica, opera a temperaturas moderadas, como son (20-40°C) y se puede implementar en aquellas regiones donde no llega la red eléctrica convencional (Lovley, 2006). A su vez, la configuración libre de membrana de intercambio de protones es de fácil confección y de bajo costo.

Se consideran interesantes para la generación de energía en áreas remotas, donde el mantenimiento frecuente es inviable. Estos dispositivos se han utilizado para proveer energía a instrumentos desplegados en medios acuáticos a largo plazo (Donovan et al.,

2013; Ewing et al., 2014; Tender et al., 2008) Además podrían disminuir las emisiones de metano (por ej. en los campos de arroz) (Ueno and Kitajima, 2014).

### **1.3 BIOFILM ELECTROACTIVO**

Para la generación de electricidad en una MFC es imperativa la presencia de microorganismos capaces de respirar utilizando el electrodo como aceptor final de electrones. Se ha reportado el crecimiento de biofilms electroactivos (EAB por su sigla en inglés "Electro Active Biofilm") y poblaciones de microorganismos planctónicos en la cámara anódica, que median la transferencia extracelular de electrones al electrodo.

En una MFC, la composición microbiana del biofilm anódico dependerá directamente del inóculo aplicado en la cámara anódica, pero también se ve afectada por el diseño y los parámetros operativos de la celda. En el caso de los EABs anódicos, las células bacterianas que lo conforman deberán ser capaces de ceder los electrones derivados de la respiración celular a un electrodo. Sin embargo, se ha observado que los EABs albergan además de microorganismos electroquímicamente activos (EAM por su sigla en inglés "Electro Active Microorganisms") otros que no participan en la transferencia extracelular de electrones. La función de estos microorganismos sería metabolizar compuestos orgánicos complejos mediante la fermentación o respiración utilizando otros aceptores finales de electrones (Borole et al., 2011; Madigan et al., 2015).

Hasta hoy, los mecanismos de interacción microbiana que intervienen en el desarrollo de un biofilm electroactivo no han sido del todo elucidados. Sin embargo, a diferencia de los microorganismos planctónicos que sólo pueden realizar transferencia electrónica indirecta, los microorganismos que componen el EAB podrían transferir los electrones directamente al electrodo; por medio de una matriz conductora; y/o a través de mediadores. La formación de biofilms en una MFC contribuye a una mayor producción energética. El estudio de biofilms puros de *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, ha demostrado la formación de una matriz conductora, conformada por estructuras denominadas pili que participan en los procesos de formación del biofilm, permiten un contacto interespecífico, así como el contacto entre la superficie celular y los aceptores de electrones insolubles. A su vez, *S. oneidensis* es capaz de transferir electrones tanto en el estilo de vida planctónico como en la formación de biofilms. La

formación de EAB en *S. oneidensis* está influenciada por el potencial redox del aceptor de electrones disponible, que regula la expresión de proteínas como la flagelina, proteínas asociadas al estrés oxidativo, proteínas implicadas en el *quorum sensing* (autoinductoras), y proteínas involucradas síntesis de mediadores de la transferencia electrónica (riboflavina, grupo hemo y transportador ABC) (Borole et al., 2011; Sydow et al., 2014).

### **1.3.1 Comunidad microbiana en biofilms electroactivos**

En una SMFC, los EABs están compuestos por una comunidad microbiana de carácter complejo y diverso. Esta característica se ha asociado a una mayor producción energética respecto a los cultivos puros debido a la capacidad de metabolizar diversos sustratos a causa de la gran variedad de vías metabólicas disponibles. El rol de los microorganismos en la comunidad microbiana del EAB no ha sido completamente dilucidado. El análisis de la comunidad microbiana en MFCs, ha demostrado que en los EABs no hay un predominio de una única especie, lo cual puede deberse a la existencia de varias especies capaces de desarrollar la transferencia de electrones al electrodo, y a que posiblemente una parte de la comunidad pueda ser mantenida por metabolismos alternativos, que no generan electricidad. Por otro lado, se ha observado una gran diversidad microbiana en los EABs, con la presencia de microorganismos no identificados como reductores de hierro (Bruce E. Logan and Regan, 2006).

Se han realizado varios estudios de comunidad microbiana en MFC basados en técnicas moleculares. Las técnicas más utilizadas en los estudios de MFC han sido la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), la comparación de los perfiles de restricción de los fragmentos terminales (T-RFLP) y las bibliotecas de clones usando productos de amplificación del gen 16S ARNr. Estas herramientas han permitido estudiar la estructura y dinámica de las comunidades, y caracterizar las especies dominantes en los EABs. Sin embargo no han sido suficientes para abordar la gran diversidad microbiana en EAB. Recientemente, se han utilizado técnicas de secuenciación masiva para el estudio de comunidades microbianas en MFC. Dentro de las plataformas disponibles para realizar la secuenciación masiva se encuentra la pirosecuenciación por 454, cuyo principio se basa en la detección del pirofosfato liberado durante la síntesis de ADN. Esta tecnología permite sintetizar productos de amplificación cuyo promedio es de 400pb. La secuenciación masiva del gen 16S ARNr ha aumentado la sensibilidad de los análisis de

comunidad microbiana, permitiendo identificar miembros menos abundantes (pero posiblemente importantes) de la comunidad. Esta metodología se ha utilizado ampliamente para el análisis de comunidades microbianas ambientales y en diversos organismos (Ringelberg et al., 2011; Zhi et al., 2014).

El análisis de la comunidad microbiana en EAB por técnicas moleculares, indicó que diferentes inóculos (sedimentos de ríos, lodos activados, suelos agrícolas) originaron distintas comunidades en el biofilm anódico (Huan et al., 2014). También se ha demostrado que la comunidad microbiana presente en cada EAB, varió respecto a la comunidad microbiana encontrada en el inóculo inicial (Mei et al., 2015). Otros estudios han reportado una menor diversidad en los ánodos, respecto a su control y el sedimento original; con un enriquecimiento en los ánodos de SMFC de *Deltaproteobacteria*. (Holmes et al., 2004; Zhao et al., 2016). En EAB de SMFC confeccionadas con sedimentos marinos, se ha observado un enriquecimiento en la clase *Deltaproteobacteria*, con un predominio a la familia *Geobacteraceae*, *Desulfuromonadaceae* (Bruce E. Logan and Regan, 2006). En EAB de SMFC construidas con suelos agrícolas, se observó que en las SMFC con mayor densidad de potencia hubo un predominio de microorganismos de la clase *Deltaproteobacteria* (género *Geobacter*), a diferencia del predominio de *Clostridia* en los EAB de las SMFCs con menor densidad de potencia (Dunaj et al., 2012). En el mismo trabajo, se asoció que la presencia de *Clostridium* en los EAB podría estar asociada a la generación de productos de fermentación. Sin embargo, no se descartó la participación de estos microorganismos en la transferencia de electrones al ánodo (Dunaj et al., 2012). En SMFCs alimentadas con lactato como dador de electrones exógeno, se encontró un enriquecimiento en bacterias relacionadas a *Propionibacterium* y *Clostridium* (Futamata et al., 2013). Las SMFC construidas con plantas de arroz y tierra para macetas se observó un enriquecimiento en los ánodos de bacterias pertenecientes al género *Desulfobulbus* y la familia *Geobacteraceae* (De Schamphelaire et al., 2010). Al utilizar suelo de arroz se detectó un enriquecimiento de bacterias de los géneros *Geobacter* y *Anaeromyxobacter* así como de la familia *Anaerolineaeceae* (Cabezas et al. 2015).

A modo general, se ha observado en las SMFCs, un enriquecimiento en EAB de microorganismos de la clase *Deltaproteobacteria*, sin embargo, como se mencionó anteriormente, la comunidad del EAB presenta gran diversidad. La secuenciación masiva

ha permitido un abordaje más detallado de la comunidad, en comparación a las otras herramientas moleculares mencionadas, logrando resultados cualitativos comparables a los obtenidos por técnicas moleculares, en cuanto a los grupos más abundantes. A nivel cuantitativo, se han observado cambios en los porcentajes relativos, con una mayor presencia de grupos minoritarios en los datos obtenidos por secuenciación masiva, lo que ha reafirmado la presencia de una comunidad microbiana compleja en los EABs. Por ello se plantea el análisis de comunidades por esta técnica podría colaborar con la identificación de microorganismos necesarios para la promoción de EAB y mantenimiento de la transferencia de electrones al electrodo.

## **1.4 TRANSFERENCIA EXTRACELULAR DE ELECTRONES**

Los microorganismos son imprescindibles en la generación de energía en una SMFC, ya que mantienen el gradiente redox que se encuentra naturalmente en los sedimentos y participan en la transferencia extracelular de electrones utilizando al electrodo como aceptor final de electrones (Girguis et al., 2010). La transferencia extracelular de electrones (ETT) ha sido reportada en microorganismos que transfieren electrones a óxidos insolubles de Fe (III) o Mn (IV) (Rabaey et al., 2007), en un proceso definido como reducción desasimilatoria de metales.

La reducción desasimilatoria de metales cumple un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos y también participa en la bioatenuación de diversos contaminantes (Wrighton et al., 2011). En ambientes naturales, la mayoría de los aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfato y dióxido de carbono) son solubles, mientras que el Fe (III) y el Mn (IV) predominan como oxohidróxidos insolubles (Gorby et al., 2006). En la naturaleza en condiciones anaerobias, se establece una comunidad compuesta por fermentadores y una variedad de diferentes respiradores anaerobios capaces de usar los diversos aceptores de electrones (Nealson and Myers, 1992). Generalmente el Fe (III) es el aceptor final de electrones de elección, por ser el más abundante en la mayoría de los suelos y sedimentos acuáticos (cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre) y por su alto potencial redox. Las bacterias reductoras desasimilatorias de metal (DMRB) poseen citocromos de la membrana externa que permiten la transferencia de electrones a minerales insolubles. La mayoría de las especies reportadas además de utilizar óxidos de hierro u manganeso, también son capaces de utilizar nitrato, fumarato, compuestos húmicos y/o otros metales como aceptores de electrones. Los dadores de electrones son

típicamente compuestos orgánicos tales como ácidos orgánicos de cadena corta, alcoholes, azúcares y, en algunos casos, incluso compuestos aromáticos e hidrógeno (Madigan et al., 2015). En sedimentos, se ha descrito la formación de consorcios microbianos, conformados por microorganismos fermentativos y microorganismos reductores de Fe III. En estos casos los microorganismos reductores de Fe III oxidan completamente los productos de fermentación y otros compuestos no fermentables (Lovley, 2006). Se han identificado microorganismos reductores de metales (especialmente del hierro) pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Geobacter*, *Aeromonas*, *Rhodoferrax*, *Desulfobulbus* y *Shewanella*, que también presentan la capacidad de transferir los electrones al ánodo (Bretschger et al., 2007). Las DMRB, han desarrollado distintos mecanismos de transferencia extracelular de electrones. Sin embargo, a pesar de la diversidad filogenética de DMRB, el estudio de los mecanismos de transferencia de electrones se ha basado en microorganismos modelo, pertenecientes a los géneros *Geobacter* y *Shewanella*.

#### **1.4.1 Mecanismos de Transferencia Electrónica**

En principio, se distinguen dos mecanismos de transferencia de electrones: transferencia directa de electrones (DET por su sigla en inglés "Direct Electron Transfer") y transferencia indirecta de electrones (IET por su sigla en inglés "Indirect Electron Transfer") (figura 2). En la DET participan proteínas redox activas tales como citocromos presentes en la superficie externa de la membrana celular bacteriana y/o pili o estructuras conductoras (denominadas "nanowires"). En la IET participan mediadores redox solubles endógenos o exógenos. Los mediadores endógenos son secretados por los microorganismos (flavinas, piocianinas, productos metabólicos reducidos), y los exógenos pueden estar presentes en el medio ambiente natural (sustancias húmicas) o ser agregados artificialmente (quinonas, rojo neutro). Varios microorganismos producen mediadores redox para transferir sus electrones a aceptores de electrones que no se encuentran en su cercanía celular. Por ejemplo, *S. oneidensis*, además de poseer en su pared celular citocromos (DET), produce moléculas solubles que actúan como mediadores (riboflavinas) y *Pseudomonas aeruginosa* produce lanzaderas redox tipo fenazina. Los mediadores deben ser capaces de atravesar la membrana celular, aceptar los electrones del transportador de electrones dentro de la célula, salir de la célula en forma reducida y luego transferir los electrones a la superficie del electrodo. La aplicación de

mediadores artificiales ha reportado un mejor rendimiento de la MFC, pero su utilización *in situ* no es recomendada debido a la toxicidad de estos compuestos para los seres humanos y el medio ambiente. A la fecha, se han identificado un gran número de citocromos y proteínas que participan en la transferencia extracelular de electrones (EET por su sigla en inglés "Extracellular Electron Transfer"), pero todavía se desconocen las vías metabólicas que la regulan. Debido a que en la naturaleza no hay necesidad de transferir electrones a un electrodo, se cree que los mecanismos de EET observados se podrían optimizar mediante herramientas como la evolución adaptativa o ingeniería metabólica y genética. (R. Kumar et al., 2016; Rosenbaum and Angenent, 2009; Sydow et al., 2014; Wrighton et al., 2011).

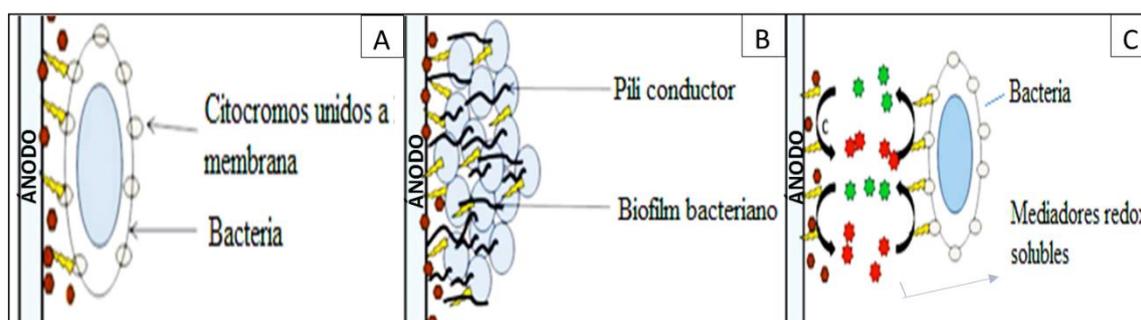


Figura 2. Mecanismos de Transferencia Electrónica al Electrodo. A y B) Transferencia Directa. C) Transferencia indirecta (Kumar et al., 2015)

## 1.5 MICROORGANISMOS ELECTROACTIVOS

Se definen como microorganismos electroactivos (EAM) a aquellos microorganismos capaces de transferir electrones a un ánodo o aceptar electrones de un cátodo. Dentro de las bacterias electroactivas, predominan las Gram negativas pertenecientes al filo *Proteobacteria*. Como se mencionó anteriormente *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis* han sido ampliamente estudiados, pero otras Gram negativas se han identificado como EAM como *Shewanella putrefaciens* (Kim et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey et al., 2004), *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri and Lovley, 2003), *Escherichia coli* (Gradskov et al., 2001), *Aeromonas hydrophila* (Pham et al., 2003), *Citrobacter sp. LAR-1* (Liu et al., 2016), entre otros. Dentro de los Gram positivos se han reportado como EAM: *Clostridium butyricum* (Park et al., 2001), *Enterococcus gallinarum* (Kim et al., 2005), *Thermincola potens* strain JR, (Wrighton et

al., 2011), *Bacillus subtilis* (Nimje et al., 2009) y *Lysinibacillus sphaericus* (He et al., 2014).

El aislamiento de EAM, principalmente se ha basado en un primer paso de enriquecimiento de EAB (en un medio rico en hierro o como inóculo en una MFC) o de DMRB (como inóculo de MFC) (Pierra et al., 2015a). El aceptor de electrones más utilizado ha sido el Fe (III) en condiciones anaerobias. Los dadores de electrones más utilizados han sido el acetato y la glucosa, debido a que son fáciles de degradar y a que el acetato no es un sustrato de microorganismos fermentadores. Sin embargo, se sabe que algunas bacterias electroactivas no utilizan acetato como una fuente de carbono (ej. *S. oneidensis*) (Borole et al., 2011). Debido a esto y a que los EAM reportados presentan una gran diversidad de vías metabólicas, otras combinaciones de dadores y aceptores electrónicos podrían utilizarse con el fin de aislar EAM.

### **1.5.1 Caracterización electroquímica de microorganismos electroactivos**

La caracterización electroquímica de los EAM se ha abordado por distintas técnicas. El estudio por cronoamperometría ha permitido monitorear el crecimiento y rendimiento energético de EAB (Marsili et al., 2008). Esta técnica registra la producción de corriente en función del tiempo. El potencial del electrodo se fija y se mide la densidad de corriente como indicador de la actividad bacteriana. En el caso del estudio de EAM se debe aplicar un potencial que asegure la EET pero que no dañe a la célula por estrés oxidativo. Varios ensayos han utilizado un potencial de +200 mV vs Ag/AgCl (Bond and Lovley, 2003; Carmona-Martinez et al., 2011). En experimentos a corto plazo, la curva de producción de corriente presenta una forma similar a una curva de crecimiento, en la cual se observa el rendimiento energético debido a la EET al electrodo. Para su aplicación se deberá tener en cuenta las limitaciones del ensayo debido a fenómenos de difusión y estratificación del biofilm, lo cual resulta significativo en EAB mixtos (Doyle and Marsili, 2015). Esta técnica ha permitido demostrar la formación de biofilm con DET en *G. sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003). También ha permitido comparar el rendimiento de EABs ante la presencia de ánodos modificados (Rosenbaum et al., 2007); y el rendimiento a distintos potenciales (Aelterman et al., 2008).

Luego de verificada la producción de corriente por parte del EAB, se puede utilizar la voltamperometría cíclica (CV) para identificar el potencial al cual los compuestos redox involucrados en la EET son oxidados o reducidos (Babauta et al., 2012). Esta técnica electroquímica se realiza en una celda con una configuración de tres electrodos y consiste en la medición de la intensidad de corriente mientras se aplica un potencial de polarización lineal desde un potencial inicial hasta un potencial final, observándose un pico, al potencial en cual el par redox es reducido u oxidado (Babauta et al., 2012). Los picos redox observados, se han atribuido generalmente compuestos involucrados en la transferencia extracelular de electrones directa (Parot et al., 2009), sin embargo, algunos EAM son capaces de biosintetizar mediadores que participan en la EET, como las fenazinas en *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey et al., 2004) o flavinas en *Shewanella* (Marsili et al., 2008). La corriente y potencial del pico que proviene de las reacciones de la interfase del electrodo no permite diferenciar la transferencia directa de electrones de la indirecta (Zhao et al., 2009) y se debe tener en cuenta que diferentes bacterias, poseen diferentes compuestos involucrados en transferencia de electrones al electrodo (directa o indirecta) (Scott et al., 2016).

En este trabajo se plantea como objetivo el estudio de los biofilms anódicos desarrollados en SMFC construidas con suelos o sedimentos de nuestro país. Se comparará la energía producida con cada suelo y se caracterizarán las comunidades microbianas desarrolladas en los ánodos de cada SMFC por técnicas independientes de cultivo. Además, se aislarán y caracterizarán bacterias potencialmente electroactivas a partir de los biofilms desarrollados en los ánodos. Posteriormente, se realizará una caracterización electroquímica de los aislamientos obtenidos, para confirmar la electroactividad de las cepas aisladas.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 2.1 CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE SEDIMENTO (SMFCs)

Se construyeron celdas de combustible microbianas y controles con suelo de arroz de dos localidades diferentes (José Pedro Varela – departamento de Lavalleja y campo experimental del INIA – departamento de Treinta y Tres) y sedimento de laguna de Rocha (departamento de Rocha) (Tabla 2). La construcción y operación de las SMFCs y los controles se realiza de forma idéntica, salvo que en las SMFCs se conectan el ánodo y el cátodo como se explica en los párrafos siguientes.

Para el armado de las celdas, se construyeron los electrodos (ánodos y cátodos) pegando un cable de cobre a una varilla de carbono grafito (Figura 3A). Luego se unió cada varilla de carbono grafito a una tela de carbono (Alfa Aesar 3.18mm espesor). Para el ánodo y fieltro (SMFCs y controles) se dispuso la tela de carbono en forma de espiral (2.5 cm x 25.0 cm de superficie) (Figura 3B) y para el cátodo la tela de carbono se cortó en forma circular (8 cm de diámetro) (figura 3C).



Figura 3. Construcción de los electrodos. A) Varilla de grafito conectada a un cable de cobre. B) Ánodo. C) Cátodo.

Los suelos de arroz (denominado SA en este trabajo) se disgregaron y tamizaron debido a la agregación y heterogeneidad que presentan y finalmente se hidrataron con agua destilada ya que se utilizaron suelos secos. El sedimento de la laguna (denominado SL en este trabajo) se tamizó para eliminar restos de caracoles, en este caso no fue necesaria la hidratación debido a que se utilizó sin secar.

Para armar las celdas se colocaron 100mL de los suelos o sedimentos en vasos de bohemia de 500mL, se agregó el ánodo y se completó a 370 mL o 330mL de volumen final, para

suelo de arroz y sedimento de laguna respectivamente. Se verificó que el ánodo quede totalmente sumergido en el suelo o sedimento. Posteriormente se agregó una capa de agua destilada completando los 500 mL. El cátodo se ubica en la superficie de la capa de agua en contacto con aire y el agua de la celda (figura 4). La operación de las celdas se realizó en cuarto termostatzado a 20 °C en oscuridad.



Figura 4. Celdas de combustible de sedimento armadas

Todos los sistemas se operaron primeramente sin conectar el ánodo y el cátodo. Se monitoreó la diferencia de potencial con un datalogger (Keithley 2700). Cuando la diferencia de potencial alcanza un valor mayor a 600 mV (asegurándonos condiciones anaerobias), se conectan ánodos y cátodos con una resistencia de 470  $\Omega$ . Se dejan celdas sin conectar como controles negativos (controles de circuito abierto). A lo largo de esta tesis denominamos a las celdas con el término CC (Closed Circuit) y a los controles OC (Open Circuit).

Tabla 2. Identificación de las celdas de combustible microbianas de sedimento.  
 TT= Treinta y Tres. JPV= José Pedro Varela.

<b>Celda</b>	<b>Inóculo</b>	<b>Modo de operación</b>	<b>Tipo</b>
<b>1SA</b>	Suelo de Arroz JPV	CC	SMFC
<b>2CA</b>	Suelo de Arroz JPV	OC	Control
<b>3CA</b>	Suelo de Arroz JPV	OC	Control
<b>4CA</b>	Suelo de Arroz JPV	OC	Control
<b>5SA</b>	Suelo de Arroz TT	CC	SMFC
<b>6CA</b>	Suelo de Arroz TT	OC	Control
<b>7CA</b>	Suelo de Arroz TT	OC	Control
<b>8SA</b>	Suelo de Arroz TT	CC	SMFC
<b>9CL</b>	Sedimento de Laguna de Rocha	OC	Control
<b>10SL</b>	Sedimento de Laguna de Rocha	CC	SMFC
<b>11CL</b>	Sedimento de Laguna de Rocha	OC	Control
<b>12SL</b>	Sedimento de Laguna de Rocha	CC	SMFC

CC= Circuito Cerrado OC= Circuito Abierto

Las SMFCs y controles de suelo de arroz se operaron durante 90 días y las de sedimento de laguna se operaron durante 70 días. El nivel de agua se mantuvo agregando suero fisiológico (SF) (0.9% NaCl). Se monitoreó el potencial de cada celda con un datalogger (Keithley 2700), el cual registra el voltaje automáticamente (cada 30 min) y se graficó el voltaje producido por cada celda en función del tiempo. A partir del potencial medido se calculó la corriente (mA) utilizando la ley de Ohm y considerando el tamaño del ánodo, la densidad de corriente (mA/m<sup>2</sup> ánodo).

$$\text{Ley de Ohm } E_{\text{celda}} = IR_{\text{ext}}$$

En la que R representa resistencia externa en Ohm, I la intensidad de corriente en Amperes y  $E_{\text{celda}}$  la diferencia de potencial entre los electrodos en Voltios (Nielsen et al., 2007).

Los datos de densidad de corriente obtenidos para las SMFCs fueron representados en un diagrama de cajas realizado con el software Past 3.15 (<http://folk.uio.no/ohamer/past/>).

## 2.2 ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE CELDAS Y CONTROLES UTILIZANDO TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN)

Para el análisis de la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana del biofilm anódico de las SMFCs, del fieltro de los controles y del suelo o sedimento (celdas y controles) se utilizó la técnica molecular T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Para estudiar la composición de la comunidad desarrollada sobre los ánodos y comparar la misma con los fieltros de los controles se utilizó pirosecuenciación. Ambos métodos se basan en la amplificación del gen ARNr 16S.

Al finalizar la operación de SMFCs y controles, se desarmaron y se tomaron muestras de los suelos o sedimentos (que no estuvieron en contacto con el ánodo o fieltro), de los ánodos y fieltros. Los ánodos y fieltros de los controles se lavaron con 80 mL de SF anaerobio estéril bajo atmósfera anaerobia (N<sub>2</sub>) y se conservaron a -20°C (2.5 cm x 12.5 cm de tela de carbono). Los suelos y sedimentos también se conservaron a -20°C. La extracción de ADN de las muestras se realizó con el kit *ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™* (Zymo Research, Irvine, USA) (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de las muestras utilizadas para análisis por técnicas de biología molecular

Muestra	Origen	Muestra	Origen
1SA	Ánodo de celda 1SA	SA1	Suelo de celda 1SA
2CA	Fieltro de control 2CA	SA2	Suelo de control 2CA
3CA	Fieltro de control 3CA	SA3	Suelo de control 3CA
4CA	Fieltro de control 4CA	SA4	Suelo de control 4CA
5SA	Ánodo de celda 5SA	SA5	Suelo de celda 5SA
6CA	Fieltro de control 6CA	SA6	Suelo de control 6CA
7CA	Fieltro de control 7CA	SA7	Suelo de control 7CA
8SA	Ánodo de celda 8SA	SA8	Suelo de celda 8SA
9CL	Fieltro de control 9CL	SL9	Sedimento de control 9CL
10SL	Ánodo de celda 10SL	SL10	Sedimento de celda 10SL
11CL	Fieltro de control 11SL	SL11	Sedimento de control 11CL
12SL	Ánodo de celda 12SL	SL12	Sedimento de celda 12SL

La cuantificación de ADN se realizó por triplicado en un espectrofotómetro de microvolúmenes (*Life Science Spectrophotometer Genova Plus, Jenway*) utilizando agua miliQ estéril como blanco.

### **2.2.1 T-RFLP**

La amplificación del gen ARNr 16S para el análisis por T-RFLP se realizó con el par de primers 27F-6FAM (6-Carboxifluoresceína) (5'-/6-FAM/AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, USA) por triplicado. Cada reacción (25µL) contenía 25 ng de ADN extraído (de suelo, ánodo o fieltro), 0.4 mM de cada primer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer Taq, 0.2 mM de cada dNTP y 1.2 U de Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Perkin-Elmer, GeneAmp PCR 2400 siguiendo programa de temperatura conformado por una primer etapa de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 3 min y una última etapa de extensión final a 72 °C por 7 min. Luego de verificado el tamaño del producto de amplificación obtenido (gel agarosa 2%), se juntaron los triplicados y purificaron utilizando el kit *DNA Clean & Concentrator™ -5* (Zymo Research, Irvine, USA). Los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima de restricción *MspI* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Cada reacción (20 µL), que contenía 16 µL de agua miliQ estéril libre de nucleasas, 2µL de Buffer Tango 10X, 1µL de ADN (1 µg/µL) y 1µL de *MspI*, se incubó durante 14 horas a 37°C seguido de un proceso de inactivación de la enzima de 20 minutos a 80°C. Todas las reacciones se analizaron en un secuenciador con el servicio brindado por Macrogen (Corea). Los resultados se visualizaron utilizando el software PeakScanner® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), se estandarizaron (Dunbar et al., 2001) y se analizaron utilizando el software Past 3.15 para el análisis de componentes principales (<http://folk.uio.no/ohamer/past/>).

### **2.2.2 Pirosecuenciación**

Las muestras de ADN extraídas a partir de los ánodos de las SMFCs y los fieltros de los controles se enviaron para su procesamiento al servicio de pirosecuenciación brindado por Mr. DNA (Molecular Research LP, Shallowater, TX). Para la amplificación de una

región del gen ARNr 16S del dominio Bacteria, se utilizaron los primers 357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 926R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'). Los datos fueron analizados utilizando el software Qiime (Caporaso et al., 2010) para el filtrado de calidad ( $Q \geq 25$ ), remoción de identificadores y remoción de quimeras de novo con el método Usearch 61 (Edgar, 2010). Se seleccionaron las secuencias (denominadas lecturas) con una longitud mayor o igual a 250 nucleótidos. Aquellas lecturas que presentaron un 97% de similitud se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs) por el método Uclust (Edgar, 2010). La clasificación taxonómica se realizó a partir de la secuencia más abundante de cada OTU con la base de datos GreenGenes 13\_8 (DeSantis et al., 2006). Luego, se analizó la diversidad alfa con el índice de Chao1 y la diversidad beta con un análisis de agrupamiento jerárquico con el mismo software.

### **2.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANÓDICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNR 16S**

Se realizó el aislamiento de bacterias anódicas a partir de enriquecimientos en medios de cultivo anaerobios inoculados con diluciones seriadas obtenidas a partir de ánodos.

Luego de desarmadas las SMFC, se extrajeron los ánodos (2.5 cm x 6.0 cm de tela de carbono) bajo atmósfera anaerobia ( $N_2$ ), se lavaron con 80 mL de SF anaerobio estéril (0.9% NaCl, 0.2 g/L cloruro de cisteína) y se cortaron en pequeñas piezas (0,2 cm<sup>2</sup>). Se colocaron en un vial con 9 mL de SF anaerobio estéril, el cual se agitó con pastilla magnética durante 10 min. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas hasta la dilución  $10^{-3}$  en tubos con SF anaerobio estéril (volumen final 10 mL).

Se inoculó 1 mL de la dilución (-1,-2,-3) en viales con 9 mL del medio *Geobacter* DSMZ 579 (denominado FE en este trabajo) compuesto por: citrato de Fe(III) 13.70 g/L,  $NaHCO_3$  2.50 g/L,  $NH_4Cl$  1.50 g/L,  $NaH_2PO_4$  0.60 g/L, KCl 0.10 g/L,  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  0.25 mg/L, solución de vitaminas y solución trazas minerales (Touzel and Albagnac, 1983). Se utilizó el medio descrito con distintos dadores de electrones: acetato 30,5 mM (2,5 g/L), una mezcla de acetato/lactato/piruvato 5mM cada uno (denominado APL en este trabajo) o formiato 5mM. Se incubó a 30°C en la oscuridad y monitoreó la reducción de Fe (III) con el método de ferrozina (Lovley and Phillips, 1986a). Aquellos

enriquecimientos donde se detectó reducción de hierro, se seleccionaron para realizar aislamiento de bacterias. El aislamiento se realizó a partir de 0,1 mL del enriquecimiento (FE) a placas con el mismo medio sólido (medio FE con el agregado de 1,5% m/v de agar) y placas de RCM (Reinforced Clostridial Medium, Oxoid, con el agregado de 1,5% m/v de agar) en condiciones anaerobias (Anaerocult ®, Merck). Se incubó a 30°C en la oscuridad. Luego de detectar crecimiento de colonias se reaislaron en el mismo medio y luego se transfirieron a viales con el medio FE para confirmar la capacidad reductora con el método de ferrozina para la determinación de Fe II modificado de Lovley and Phillips, 1986a (Protocolo Anexo 5) y posterior caracterización de las cepas mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

Debido al escaso número de aislamientos obtenidos en medio FE, se construyeron y operaron nuevas celdas con sedimento de laguna de Rocha (denominadas R) (Anexo 1 - Resultados del monitoreo). Se realizaron 3 SMFCs y 3 controles de la misma manera que se construyeron las otras celdas (Materiales y Métodos- 2.1). En base a los datos obtenidos por pirosecuenciación para las SMFCs SL se utilizaron nuevos medios de cultivo para el enriquecimiento, un medio sulfatorreductor y un medio desnitrificante. El medio sulfatorreductor API-RST (denominado S en este trabajo) (McInerney and Sublette, 1997) está compuesto por: lactato de sodio 4.2 g/L, extracto de levadura 0.7 g/L, NaCl 10 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, CaSO<sub>4</sub> 0.04 g/L, TES 1.5 g/L, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, ácido ascórbico 0.1 g/L, cisteína-HCl 0.2 g/L, resarzurina 0.2%, solución de vitaminas y solución de trazas minerales (Touzel and Albagnac, 1983). El medio desnitrificante (denominado DE en este trabajo) (Bellini et al., 2013) está compuesto por: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.7g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3 g/L, extracto de levadura 0.02 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/L, NaCl 1.0 g/L, MgCl<sub>2</sub> 0.11 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.06 g/L, KNO<sub>3</sub> 10 mmol/L, acetato de potasio 20 mmol/L, resarzurina 0.2%, solución vitaminas y solución de trazas minerales (Touzel and Albagnac, 1983).

En este caso, las nuevas celdas (R) (3 SMFC y 3 controles), se monitorearon durante 65 días, luego se sacrificaron y se extrajeron los ánodos de las SMFC (2.5 cm x 25 cm) sin lavado. Se utilizaron dos métodos de aislamiento.

Método A: Una parte del ánodo (de la celda R2) (1.0 cm<sup>2</sup> de tela de carbono) se colocó en un vial con 10 mL de medio de enriquecimiento (FE/S/DE) y posteriormente se diluyó en serie hasta la dilución 10<sup>-6</sup> (inóculo de 1%) en viales con el mismo medio, se incubó en oscuridad a 30°C.

Método B: Otra pieza de ánodo (de las celdas R1 o R2) (1,5 cm<sup>2</sup>) se colocó en medio base, medio DSM 579, sin el agregado de aceptor ni dador electrónico (denominado R en este trabajo) compuesto por: NaHCO<sub>3</sub> 2.50 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1.50 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.60 g/L, KCl 0.10 g/L, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.25 mg/L, solución de vitaminas y solución trazas minerales (Touzel and Albagnac, 1983) en una celda de tres electrodos, electrodo de referencia (Ag/AgCl), electrodo de trabajo (grafito) y electrodo auxiliar (Pt). Para el enriquecimiento, se agregó acetato en una concentración final de 10 mM y se registró la intensidad de corriente (condiciones anaerobias a 20 °C) a un potencial fijo de +0,2 V vs Ag/AgCl utilizando el potenciostato Gamry Interface 1000E (Cronoamperometría en Anexo 2). Luego del enriquecimiento por cronoamperometría, se tomaron alícuotas de medio R y se inocularon en viales (1% inóculo) de cada medio de enriquecimiento (FE/S/DE) a 30°C.

Al igual que con el medio FE, se verificó la reducción en los medios DE y S en forma cualitativa. En el medio DE se utilizó el reactivo de revelado API (bioMérieux) para analizar la reducción de nitrato a nitrito y en el medio S se evidenció la reducción de sulfato por formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro.

El aislamiento se realizó con un inóculo de 0,1 mL del enriquecimiento reductor en el mismo medio sólido (medio FE/DE/S con el agregado de 1,5% m/v de agar) en condiciones anaerobias (Anaerocult ®, Merck) y en TSA (Tryptic Soy Agar, Merck Millipore) en condiciones aerobias. En todos los casos se aisló hasta la obtención de un cultivo puro y se incubó a 30°C en la oscuridad. Las colonias individuales fueron transferidas a viales con el medio basal anaerobio estéril para confirmar la capacidad reductora y posterior caracterización de las cepas mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

Para la caracterización de los aislamientos por secuenciación del gen de ARNr 16S, se extrajo el ADN a partir de las colonias aisladas de acuerdo al protocolo G del kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA). La amplificación del gen ARNr 16S por PCR se realizó con el par de primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, USA) (Xu and Liu, 2011). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL, (ídem a metodología descrita antes para T-RFLP). Luego de verificado el tamaño del producto de amplificación obtenido en gel de agarosa 2%, se secuenciaron los amplicones en el servicio brindado por Macrogen (Corea).

El ensamblado y edición de las secuencias obtenidas se efectuó con el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 (Hall, 1999). Para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis v7.0.21 (MEGA) (S. Kumar et al., 2016). Para ello se seleccionaron secuencias del gen ARNr 16S de cepas de referencia de cada género identificado que presentaban un alto porcentaje de similitud con las secuencias obtenidas de las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>) (Yoon et al., 2016).

## 2.4 DETERMINACIÓN DE LA ELECTROACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Se determinó la electroactividad de las cepas por cronoamperometría en una celda de tres electrodos estéril, electrodo de referencia (Ag/AgCl), electrodo de trabajo (grafito) y electrodo auxiliar (Pt) (figura 5). Se inoculó dicha celda con cultivo fresco de cada cepa aislada en medio base estéril compuesto por:  $K_2HPO_4$  2.7g/L,  $KH_2PO_4$  1.3 g/L, extracto de levadura 0.02 g/L,  $NH_4Cl$  0.5 g/L, NaCl 1.0 g/L, solución de trazas minerales (Touzel and Albagnac, 1983). Se agregó acetato y se registró la intensidad de corriente durante 60hs en condiciones anaerobias (bajo atmósfera de  $N_2$ ) a 20 °C a un potencial fijo de +0,2 V utilizando el potenciostato Gamry Interface 1000E.

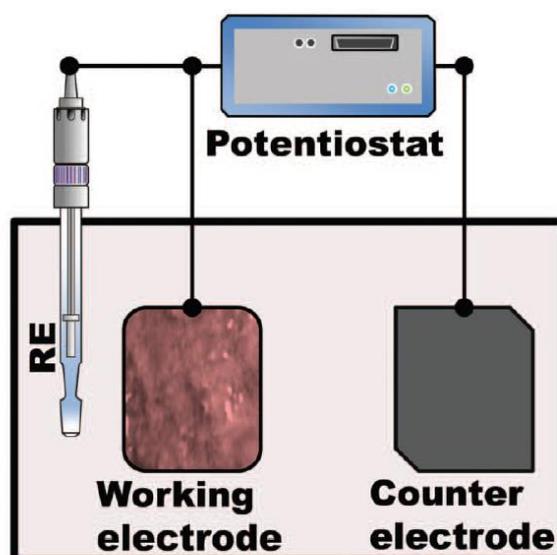


Figura 5 .Diagrama de la configuración de la celda de tres electrodos (Babauta et al., 2012)

Las cepas que presentaron una mejor performance (en términos de densidad de corriente máxima) se seleccionaron para el estudio de consumo de acetato simultáneo a la producción de corriente (cronoamperometría durante 7 días). A su vez se realizó una voltamperometría cíclica para analizar la actividad redox del sistema.

Para la cuantificación de acetato por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se tomó 1 mL de medio base a diferentes tiempos de la cronoamperometría. Las muestras fueron centrifugadas (2 minutos a 10.000 rpm), luego se extrajo el sobrenadante (990 uL) en fase móvil (Volumen final= 1.0 mL). Para el análisis se empleó una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA) en condiciones de: volumen de inyección de 20  $\mu$ L, flujo de 0,6 mL/min, presión de 1000 psi (Waters 510 HPLC Pump) y temperatura de operación de 35°C (Waters Temperature Control Module). Se utilizó una fase móvil de ácido sulfúrico 5mM y detector UV-Vis (Shimadzu SPD-10AV UV/vis Detector), longitud de onda de trabajo = 210nm, tiempo de retención del estándar de acetato= 16,3 min. Los datos se analizaron con el programa PeakSimple v4.44 (SRI Instruments, USA).

La voltamperometría cíclica se realizó en la misma celda de tres electrodos, electrodo de referencia (Ag/AgCl), electrodo de trabajo (grafito) y electrodo auxiliar (Pt), cortando el ensayo de cronoamperometría, se aplicó una velocidad de barrido de 1 mV/s y se registró la intensidad de corriente en condiciones anaerobias a 20 °C de 0,5V a -0,5V utilizando el potencióstato Gamry Interface 1000E.

### 3 RESULTADOS

---

#### 3.1 CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE SEDIMENTO (SMFCs)

Se monitoreó la producción de voltaje de 5 celdas de combustible microbianas de sedimento (SMFCs) y 7 controles (C) (Tabla 2). Luego de 20 días se cerró el circuito de las celdas construidas con suelo de arroz (SA), con un valor mínimo de 600 mV en ese período. Para las celdas de arroz JPV solamente una celda alcanzó el valor mínimo de voltaje, por lo cual solo se trabajó con una SMFC y el resto se monitoreó como control. Las celdas construidas con sedimento de laguna (SL) se cerraron al día 5, luego de registrado un voltaje mínimo de 700 mV.

Luego de cerrar los circuitos de las celdas se observó una disminución drástica del potencial de la celda como se esperaba. Posteriormente se observó un aumento en el voltaje medido en 4 de 5 SMFCs, donde el día 0 representa el día en el cual se cerró el circuito (Figura 6). Los controles se continuaron monitoreando en circuito abierto (Tabla 4).

Tabla 4. Voltaje promedio de los controles, durante un período de 90 días para las celdas CA y 70 días para las celdas CL. CA= Control Arroz. CL = Control Laguna

Suelo/ Sedimento	Controles	Voltaje promedio (mV)
Arroz JPV	2CA	370 ± 19
	3CA	504 ± 23
	4CA	371 ± 253
Arroz TT	6CA	430 ± 73
	7CA	252 ± 15
Laguna	9CL	571 ± 48
	11CL	371 ± 97

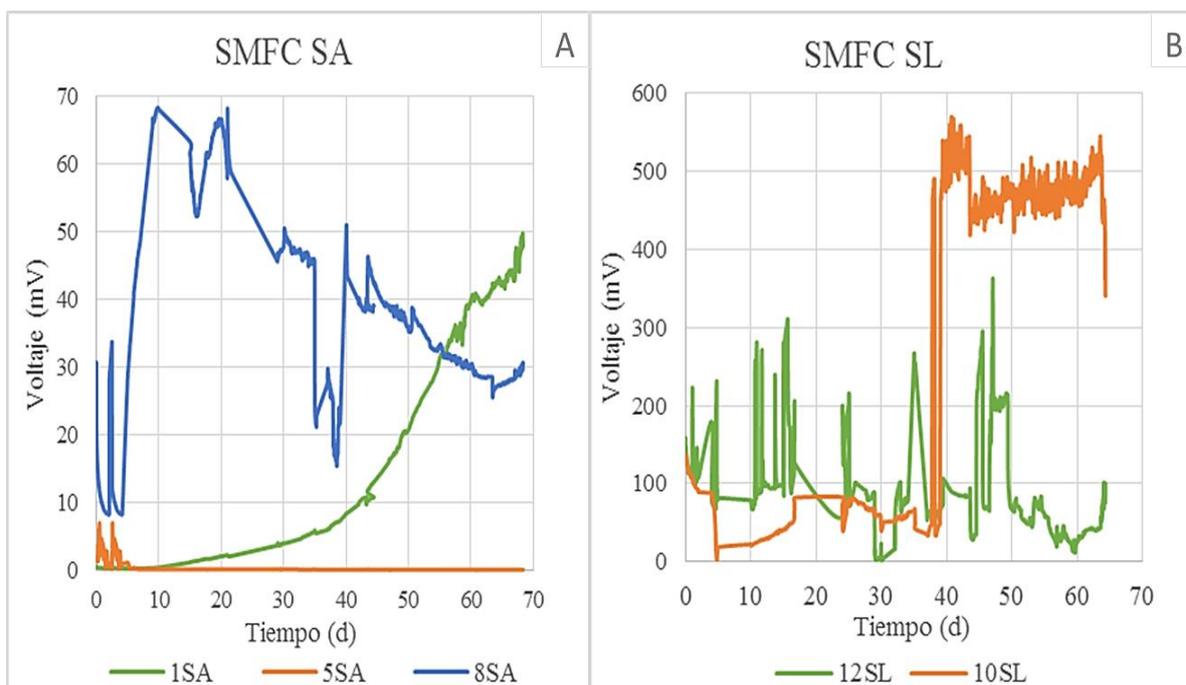


Figura 6. Voltaje registrado para las celdas en modo circuito cerrado con una resistencia externa de  $470 \Omega$ . A) SMFCs de suelo de arroz (SA) monitoreadas durante 70 días. B) SMFCs de sedimento de laguna (SL) monitoreadas durante 65 días.

Para las SMFCs SA el comportamiento fue muy variable, sin embargo para cada celda SA, la producción de voltaje resultó ser más estable en comparación a las SMFCs SL (figura 6). La SMFC JPV (1SA) registró un período de aproximadamente 30 días sin producción de voltaje. Para la celda 8SA se observó una buena performance durante el tiempo de monitoreo, con valores positivos luego de cerrado el circuito. Sin embargo, la celda construida con el mismo suelo (5SA) no registró un producción de voltaje luego de cerrado el circuito (Figura 6A). Aunque se observaron diferencias en el comportamiento de las SMFCs SL, representado por el voltaje registrado durante 65 días (Figura 6B), se registró una mejor performance de estas SMFCs (en términos de densidad de corriente) en comparación a las SMFCs SA. (Figura 7, Tabla 5).

Tabla 5. Performance de las SMFCs. (1SA, 5SA y 8SA) período de monitoreo de 70 días. (10SL y 12SL) período de monitoreo de 65 días.

	<b>Voltaje promedio (mV)</b>	<b>Densidad de corriente promedio (mA/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>)</b>
<b>1SA</b>	26,9 ± 12,9	9,2 ± 4,4	247
<b>5SA</b>	0,3 ± 0,7	0,1 ± 0,2	0,03
<b>8SA</b>	37,4 ± 14,0	12,7 ± 4,8	477
<b>10SL</b>	298,3 ± 212,9	101,5 ± 72,5	30286
<b>12SL</b>	89,0 ± 60,5	30,3 ± 20,6	2698

### **3.2 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA ANÓDICA UTILIZANDO TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN)**

En el análisis de T-RFLP se observaron diferencias en la comunidad presente en las muestras de las celdas de arroz TT (ánodos, fieltro control y suelos) (figura 8). En los perfiles de restricción obtenidos (92 fragmentos en total), se observó un enriquecimiento en los ánodos de los fragmentos de 159 pb (para la celda 5SA y 8SA) y de 156 pb para la celda 8SA en comparación al fieltro control y los suelos. El análisis de agrupamiento de estas muestras, agrupó a los ánodos de las SMFCs (5SA y 8SA), separándolos del fieltro control y los suelos. A su vez se registró una disminución en el número de T-RFs obtenidos para los ánodos (5SA y 8SA) en comparación a los respectivos suelos (SA5 y SA8) (figura 9).

### T-RFLP arroz TT

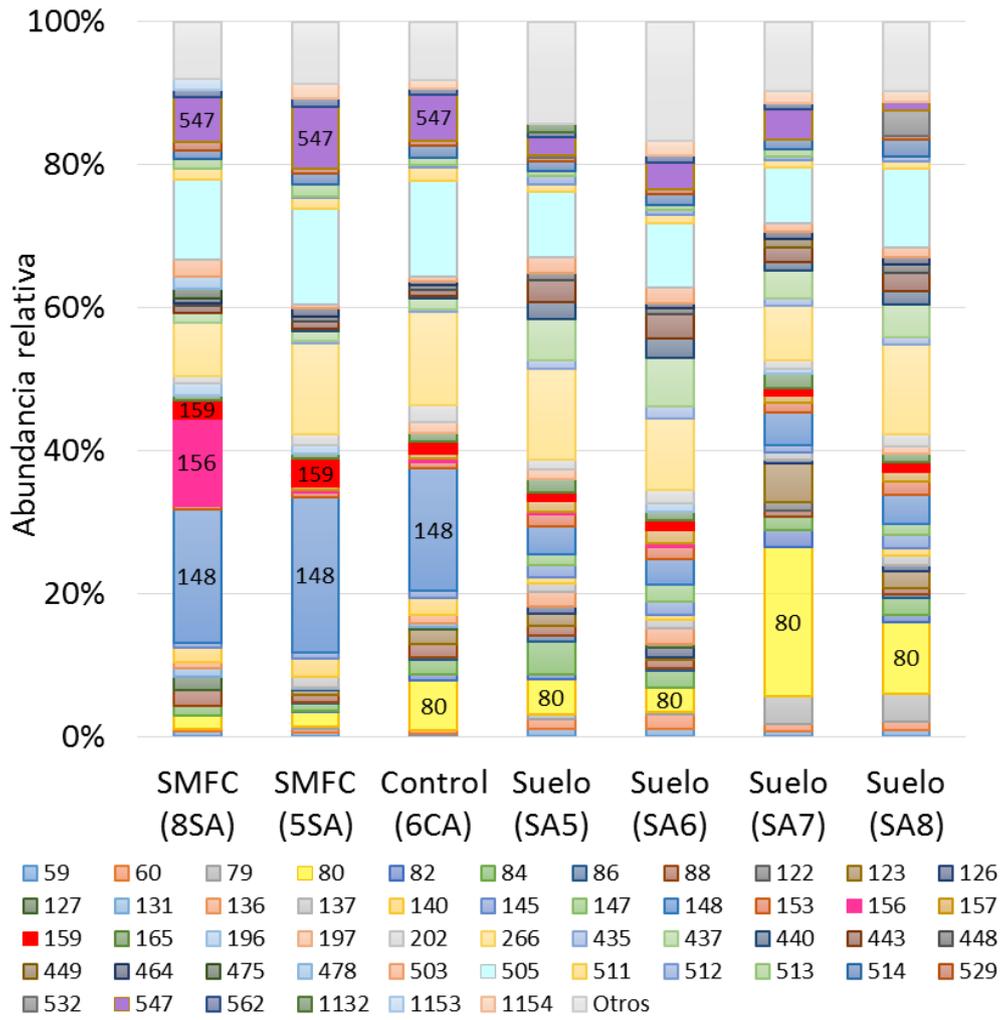


Figura 8. Perfiles de restricción de las muestras de arroz TT. Abundancia relativa de los fragmentos de restricción para cada muestra. T-RFs totales = 92. Otros (T-RFs con abundancia relativa menor al 1%). Se señalan los T-RFs de 80 pb, 148 pb, 156 pb, 159 pb, 547 pb.

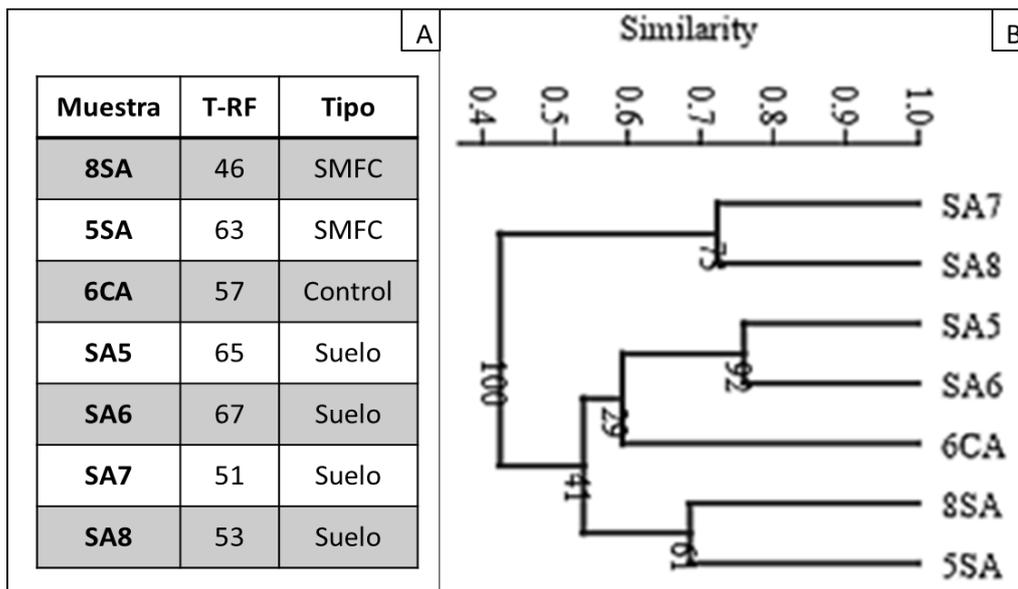


Figura 9. T-RFLP muestras de arroz TT. A) Tabla con el número de T-RF obtenidos para las muestras de arroz TT. B) Análisis de agrupamiento de las muestras de arroz TT, por UPGMA con el índice de similitud Bray –Curtis, bootstrap 1000.

Para las muestras de arroz JPV obtuvieron 73 fragmentos y en los perfiles de restricción no se observaron diferencias entre el ánodo de la SMFC en comparación a los filtros de los controles (figura 10). Sin embargo, en el análisis de agrupamiento se lograron diferenciar estas muestras de la muestra de suelo (figura 11).

### T-RFLP arroz JPV

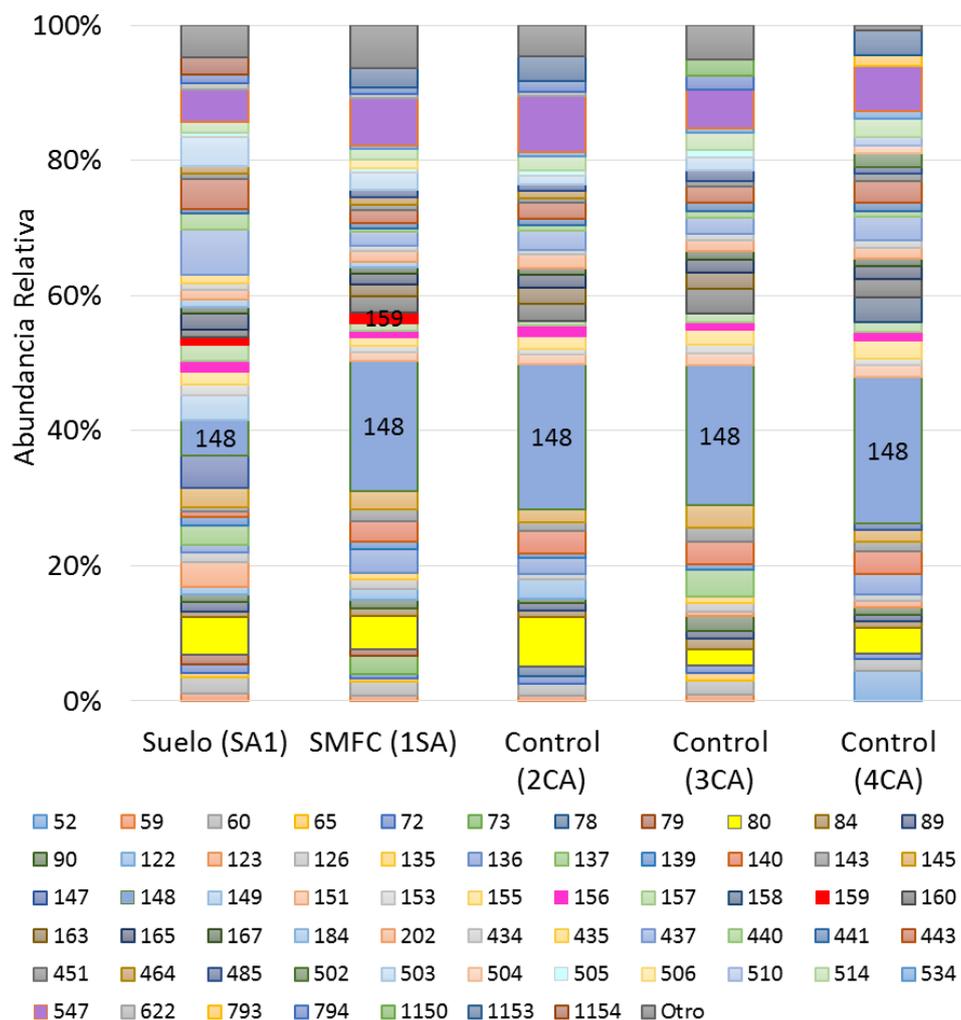


Figura 10. Perfiles de restricción de las muestras de arroz JPV. Abundancia relativa de los fragmentos de restricción para cada muestra. T-RF totales = 73. Otro (T-RF con abundancia relativa menor al 1%). Se señalan los T-RFs de 148 pb y 159 pb.

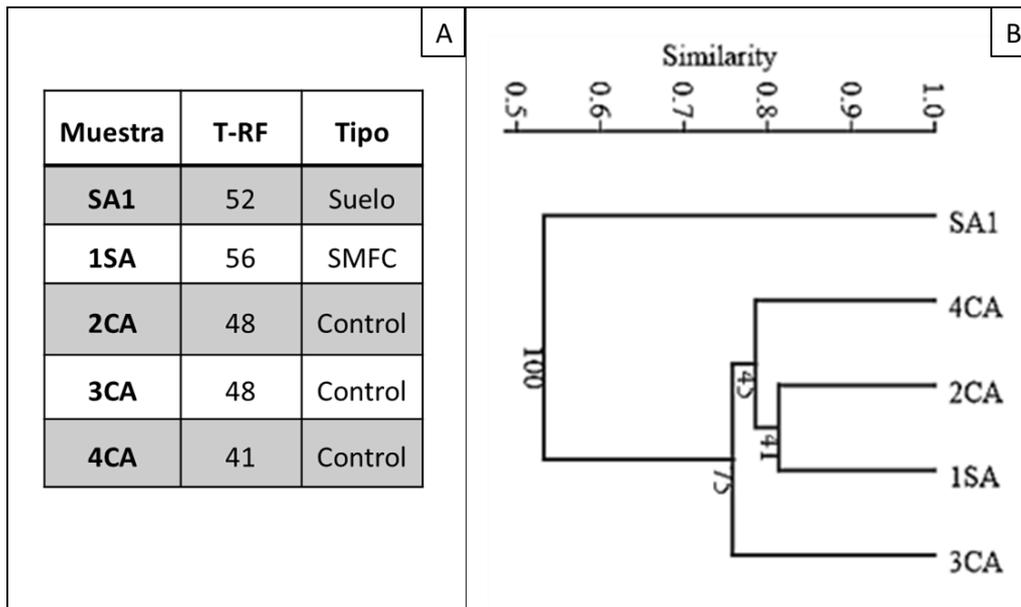


Figura 11. T-RFLP muestras de arroz JPV. A) Tabla con el número de T-RF obtenidos para las muestras de arroz JPV. B) Análisis de agrupamiento de las muestras de arroz TT, por UPGMA con el índice de similitud Bray –Curtis, bootstrap 1000.

En el análisis de componentes principales para las celdas SA (124 fragmentos en total), se observó un agrupamiento de los ánodos de las celdas (5SA y 8SA) y fieltro control TT, separándose del grupo conformado por el ánodo de la celda (1SA) y fieltros de los controles JPV (2CA, 3CA y 4CA) y del grupo conformado por los suelos TT y JPV (SA1, SA5, SA6, SA7, SA8) (figura 12).

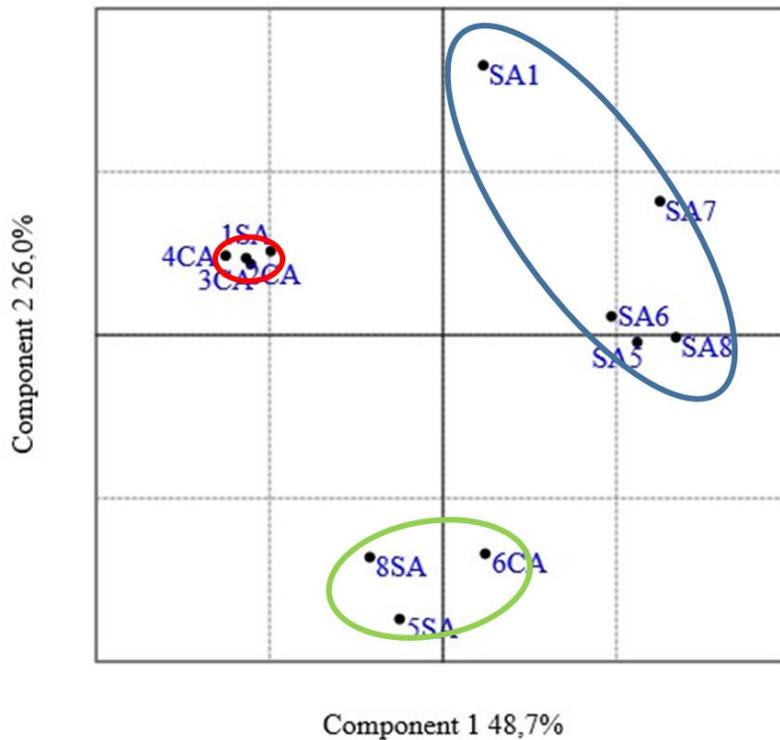


Figura 12. Análisis de componentes principales de los T-RFs de las muestras de celdas de arroz. Se señalan en elipse roja: muestras de ánodo JPV (1SA) y fieltros control JPV (2CA, 3CA y 4CA); elipse verde: muestras de ánodos TT (5SA y 8SA) y fieltro control TT (6CA); y elipse azul: muestra de suelo TT (SA1) y muestras de suelos JPV (SA5, SA6, SA7 y SA8).

En el análisis de los perfiles de restricción de las celdas L (51 fragmentos en total), se observó un aumento en la abundancia relativa de los fragmentos 90 pb, 148 pb, 151 pb, 156 pb y 172 pb para el ánodo respecto al fieltro control (figura 13). A su vez, se observó que el número de T-RFs obtenidos para estas muestras fue menor respecto a las muestras de arroz. También se registró una disminución de este valor en el ánodo (12SL), comparado al sedimento de la misma celda (SL12). Asimismo, en el análisis de agrupamiento, se logró diferenciar el ánodo (12SL), del fieltro control (11CL) y los sedimentos (Figura 14).

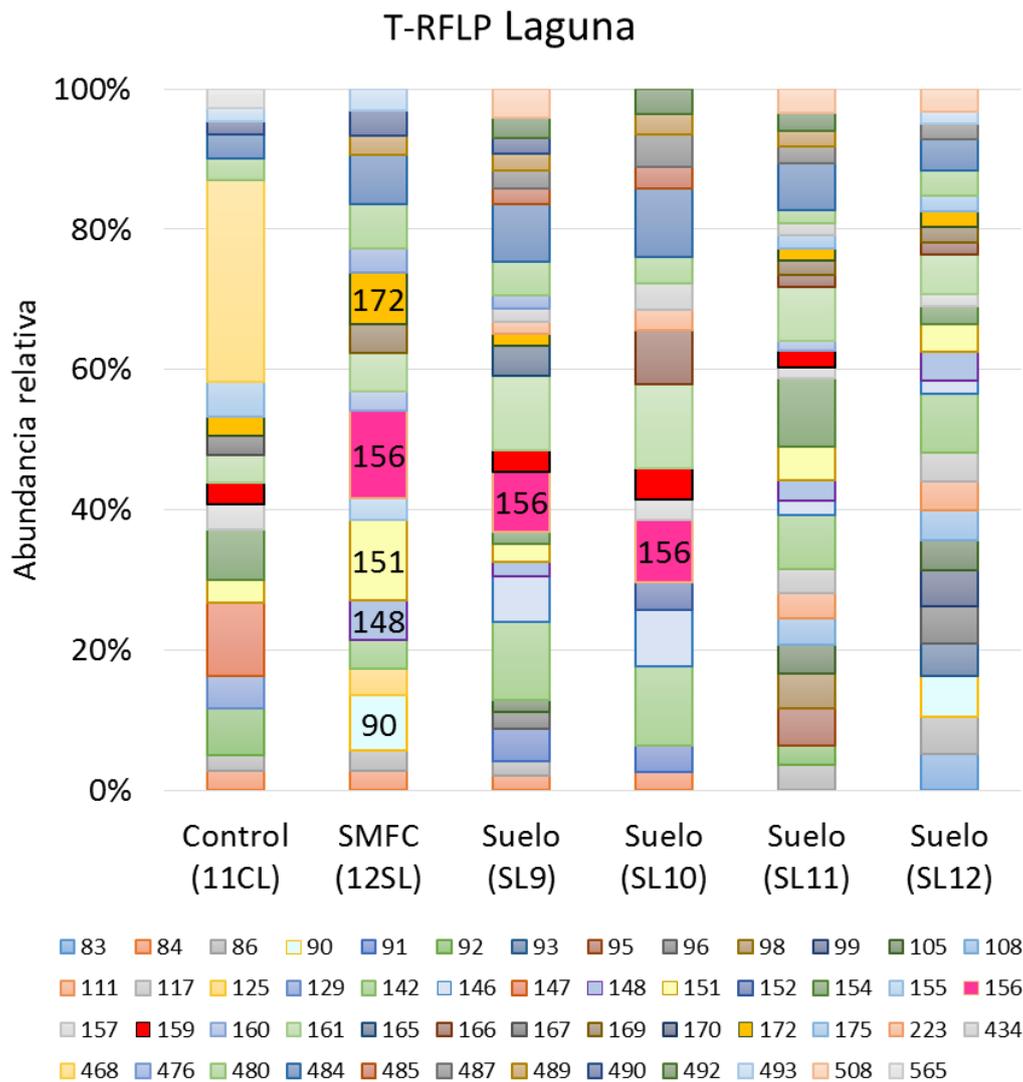


Figura 13. Perfiles de restricción de las muestras de laguna. Abundancia relativa de los fragmentos de restricción para cada muestra. T-RF totales = 51. Se señalan los T-RFs de 90 pb, 148 pb, 151 pb, 156 y 172 pb.

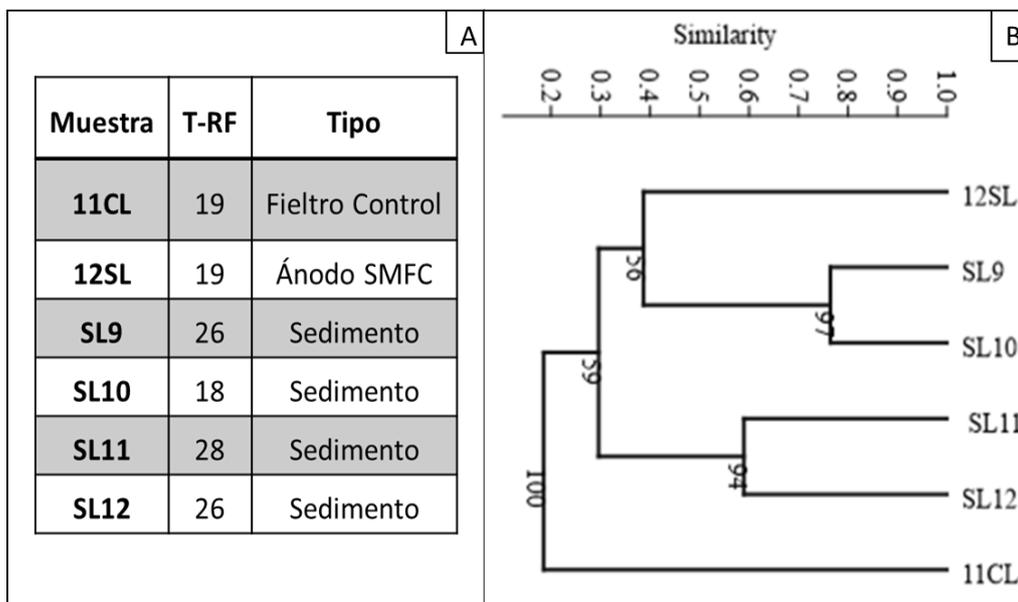


Figura 14. T-RFLP muestras de laguna. A) Tabla con el número de T-RF obtenidos para las muestras SL. B) Análisis de agrupamiento de las muestras SL, por UPGMA con el índice de similitud Bray –Curtis, bootstrap 1000.

Con el objetivo de estudiar la composición de las bacterias presentes en los ánodos de las celdas, y como se diferencian con los filtros de los controles se realizó secuenciación masiva del gen de ARNr 16S. Se obtuvieron en total 159351 lecturas las cuales fueron separadas por muestra con remoción de barcodes, filtradas en cuanto a calidad y tamaño, se eliminaron quimeras quedando un total de 95740 lecturas (tabla 6). Se obtuvieron 14326 OTUs en total (curvas de rarefacción en material suplementario).

Tabla 6. Número de lecturas obtenido por muestra

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas</b>	<b>Muestra</b>	<b>Lecturas</b>	<b>Muestra</b>	<b>Lecturas</b>
<b>1SA</b>	10461	<b>5SA</b>	7995	<b>9CL</b>	9464
<b>2CA</b>	6791	<b>6CA</b>	11985	<b>10SL</b>	5858
<b>3CA</b>	7904	<b>7CA</b>	13992	<b>11CL</b>	4125
<b>4CA</b>	2854	<b>8SA</b>	7023	<b>12SL</b>	7288
<b>Total de lecturas = 95740</b>					

Para el estudio de diversidad se normalizaron los datos, seleccionando en número de lecturas a analizar correspondiente a la muestra para la cual se obtuvo el número menor (n=1900). El estudio de diversidad alfa, demostró que las muestras de laguna (tanto celdas como controles) presentaron una comunidad menos diversa en comparación con las muestras de arroz (Índice de Chao, Tabla 7).

Tabla 7. Índice de Chao observado para los ánodos de las SMFCs y filtros de los controles basados en el análisis de pirosecuenciación del gen ARNr 16S

<b>Muestra</b>	<b>Chao</b>	<b>Muestra</b>	<b>Chao</b>	<b>Muestra</b>	<b>Chao</b>
<b>1SA</b>	2048	<b>5SA</b>	1893	<b>9CL</b>	1216
<b>2CA</b>	2021	<b>6CA</b>	2307	<b>10SL</b>	952
<b>3CA</b>	1873	<b>7CA</b>	2321	<b>11CL</b>	735
<b>4CA</b>	1180	<b>8SA</b>	1841	<b>12SL</b>	929

El análisis de agrupamiento de las muestras demostró que existen diferencias en la composición de la comunidad microbiana de los ánodos; agrupándolos según el origen (suelo de arroz o sedimento de laguna). A su vez, para las celdas TT y L la comunidad microbiana de los ánodos se diferenció de los fieltros control (Figura 15).

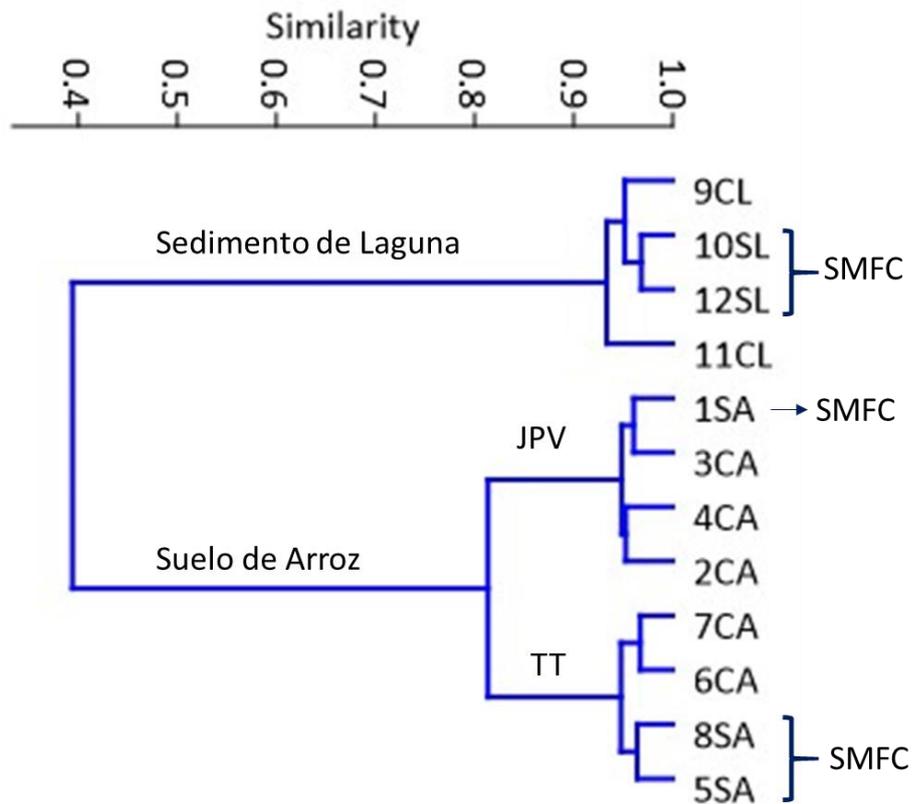


Figura 15. Análisis de agrupamiento de las lecturas derivadas de la pirosecuenciación de los ánodos de las celdas y fieltros de los controles por UPGMA, métrica de distancia ponderada UniFrac.

Para el análisis de composición se agruparon las muestras por tipo de suelo y sedimento, se normalizaron los datos en base a la selección al azar de un número de lecturas correspondiente a la muestra con menor registro de lecturas por grupo, se eliminaron las OTUs representadas por una lectura y aquellas clasificadas por la base de datos como pertenecientes al dominio *Archaea* (Tabla 8).

Tabla 8. Número de lecturas considerado para el análisis de composición microbiana de las muestras

JPV		TT		L	
Muestra	Lecturas	Muestra	Lecturas	Muestra	Lecturas
1SA	1583	5SA	5352	9CL	2751
2CA	1635	6CA	5176	10SL	2806
3CA	1624	7CA	5128	11CL	2875
4CA	1810	8SA	5353	12SL	2807

En cuanto a la composición microbiana, en los ánodos de las SMFCs TT se registraron 21 y 20 fillos (5SA y 8SA) mientras que para los controles se detectaron 19 y 17 fillos (6CA y 7CA). El fillo más abundante fue *Firmicutes* seguido del fillo *Proteobacteria*, enriquecido en las SMFCs respecto a los controles. Dentro del fillo *Proteobacteria*, la clase *Alphaproteobacteria* fue la más abundante, seguida de la clase *Deltaproteobacteria* enriquecida en las SMFCs (SA = 5,4% y 7,0% vs. CA = 1,7% y 1,6%) (figura 16). Se observó un aumento en la abundancia relativa del género *Geobacter* en las SMFCs (SA = 3,2% y 4,3% vs CA = 0,2% y 0,08%), con un predominio de las OTU10060 (SA = 0,8% y 1,2% vs CA = 0,2% y no detectada), OTU3919 (SA = 0,4% y 0,7% vs CA= no detectada) y OTU4061 (SA= 0,3% y 0,3% vs CA= no detectada). Para los otros fillos, a los distintos niveles taxonómicos, no se observó un enriquecimiento en los ánodos de las SMFCs respecto a los fieltros de los controles.

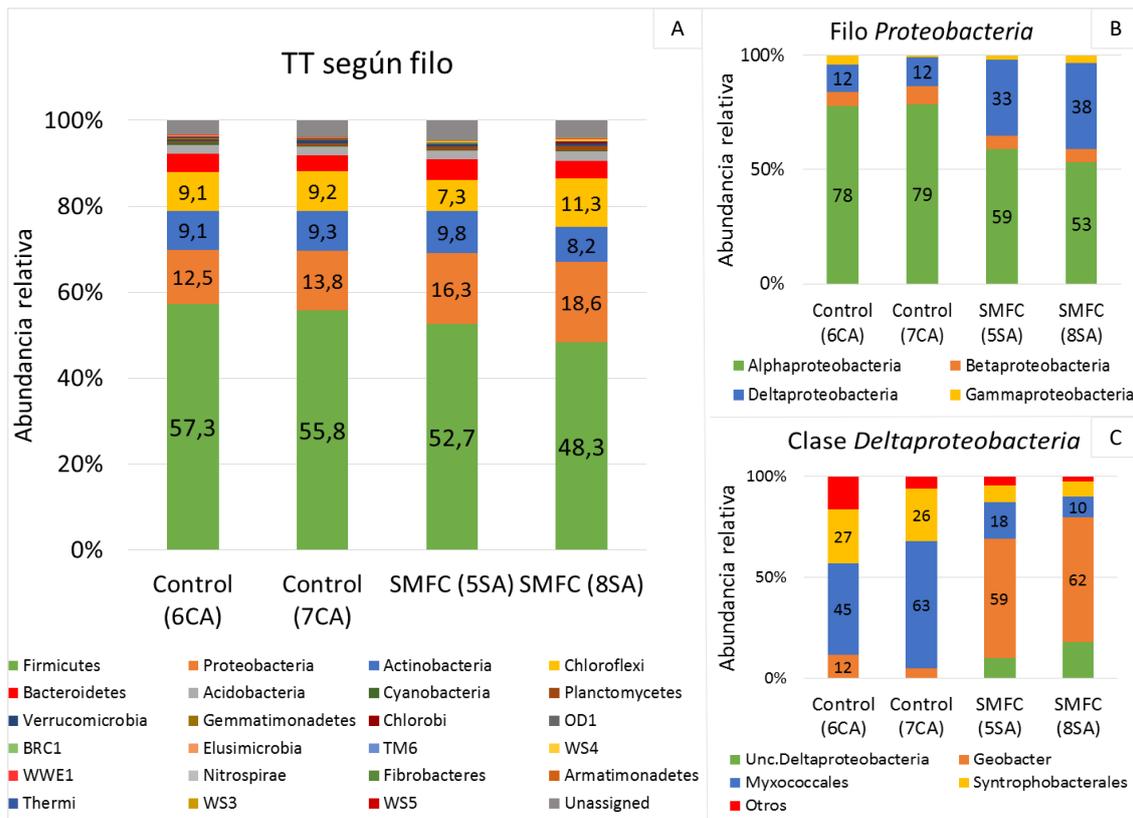


Figura 16. Composición microbiana de los ánodos de las SMFC y fieltros de los controles TT. (A) Composición microbiana según filo, porcentajes relativos al total de las lecturas analizadas. (B) Composición microbiana del filo *Proteobacteria*, porcentajes relativos al filo. (C) Composición microbiana de la clase *Deltaproteobacteria*, porcentajes relativos a la clase. Unassigned= no asignada al dominio bacteria comparar con la base de datos. Unc.= No clasificada.

Debido a que la mayoría de las OTUs presentaban una abundancia relativa menor al 1%, se analizó la composición de las OTUs presentes en ambos ánodos y ausentes en los fieltros control. Se encontraron 149 OTUs no detectadas en los fieltros control (SA = 5,8% y 6,5 % vs CA= no detectada). La mayoría fueron clasificadas como pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* (SA = 2,2% y 3,1%) y del género *Geobacter* (SA= 1,7% y 1,9%) (figura 17).

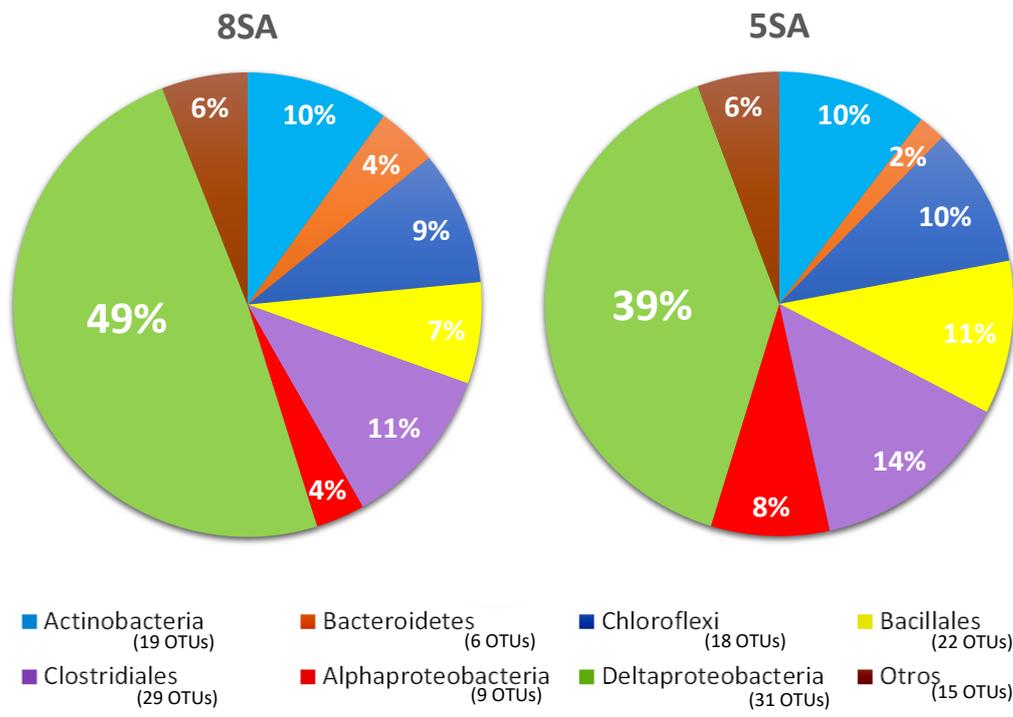


Figura 17. Clasificación taxonómica de las OTUs detectadas solamente en SMFCs TT, porcentajes relativos al 5,8% y 6,5% de las lecturas totales obtenidas para las SMFCs 5SA y 8SA respectivamente. Total de 149 OTUs.

Respecto a la composición microbiana del ánodo de la celda JPV, no se observaron grandes diferencias a nivel de filo respecto a los fieltros control (figura 18). En el ánodo de la celda se detectaron 17 filos mientras que para los controles se obtuvieron 17, 14 y 16 filos bacterianos. En todas las muestras se observó un predominio del filo *Firmicutes*, seguido de *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (figura 18). Se observó un enriquecimiento de la clase *Deltaproteobacteria* en la SMFC comparada con los controles (SA= 2,2% y CA= 1,6%, 1,1% y 1,5%), La abundancia relativa de la familia *Desulfobulbaceae* aumentó en la celda (SA= 0,6 % vs CA = no detectado o 0,06%) con un predominio de la OTU 10274 (SA =0,5% vs CA= no detectada). Para los otros filos, a los distintos niveles taxonómicos, no se observó un aumento en la abundancia relativa en el ánodo de la SMFC respecto a los fieltros de los controles. A falta de un duplicado para el ánodo de la SMFC, no se realizó el análisis de las OTUs presentes en el ánodo y ausente en los fieltros control.

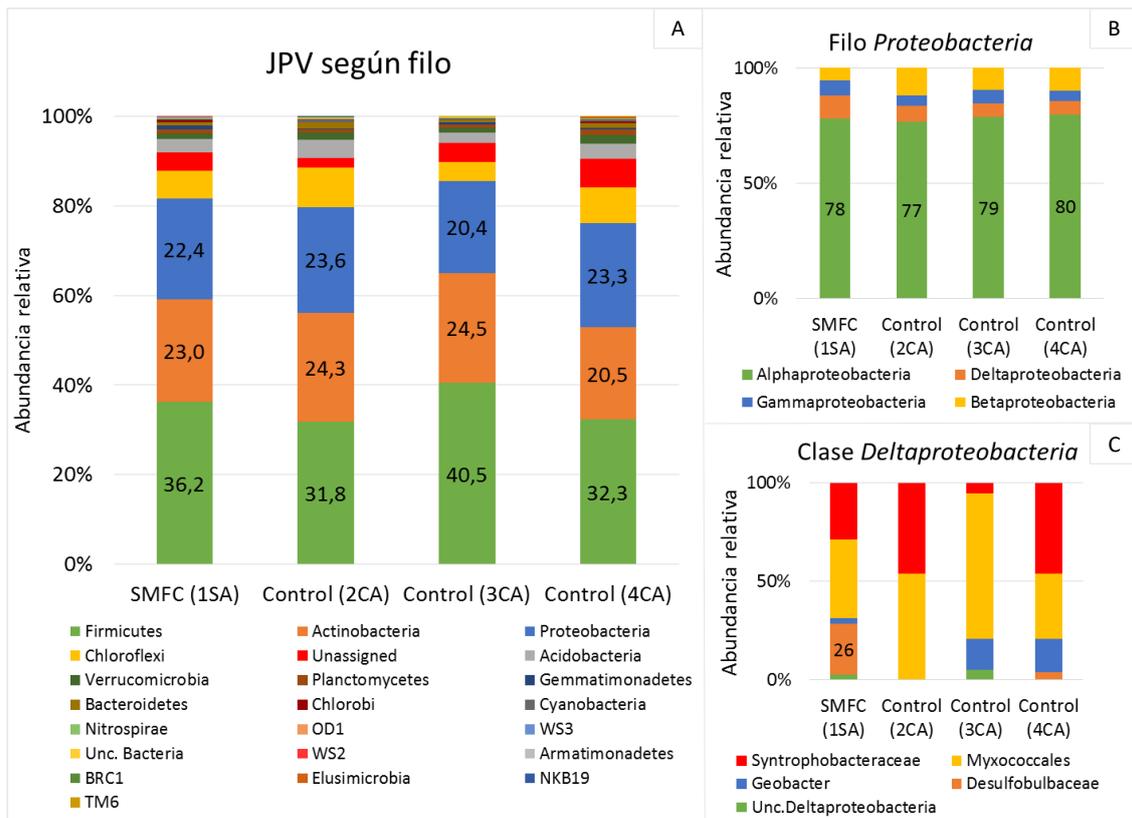


Figura 18. Composición microbiana del ánodo de la SMFC y fieltros de los controles JPV. (A) Composición microbiana según filo, porcentajes relativos al total de las lecturas analizadas. (B) Composición microbiana del filo *Proteobacteria*, porcentajes relativos al filo. (C) Composición microbiana de la clase *Deltaproteobacteria*, porcentajes relativos a la clase. Unassigned= no asignada al dominio bacteria al comparar con la base de datos. Unc.= No clasificada.

En las celdas SL, los ánodos de las SMFCs presentaron 29 y 22 filos (10SL y 12 SL) y los fieltros de los controles 26 filos (9CL y 11CL) con un predominio del filo *Cyanobacteria* seguido de *Proteobacteria* (figura 19). En el filo *Proteobacteria*, se observó un enriquecimiento de la clase *Deltaproteobacteria* en las SMFCs (figura 19), con un predominio de la OTU14138 (SL= 5,7% y 8,2% vs CL= no detectada) clasificada en la familia *Pelobacteraceae* y la OTU11272 (SL= 2,6% y 4,1% vs CL= no detectado y 0,2%) clasificada en el género *Desulfuromonas*. También se encontraron otras OTUs enriquecidas en las SMFCs, con abundancias relativas menores, como la OTU3760 (SL=0,6% y 1,5% vs CL=0,3% y no detectada) clasificada en la familia *Desulfobacteraceae* y la OTU9927 (SL= 0,5% y 0,9% vs CL= no detectado) clasificada como perteneciente al género *Desulfuromonas*. Para los otros filos, no se observó un aumento en la abundancia relativa a los distintos niveles taxonómicos, para las SMFCs vs. los controles.

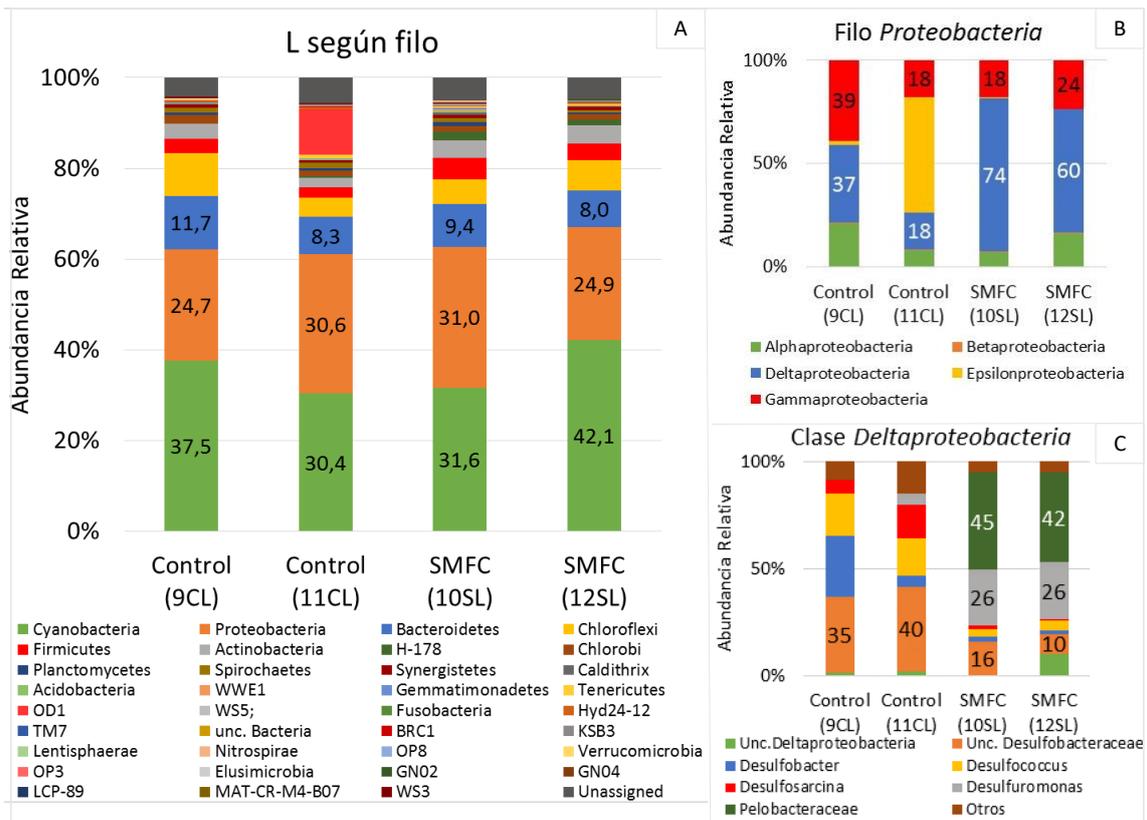


Figura 19. Composición microbiana de los ánodos de la SMFCs y fieltros de los controles L. (A) Composición microbiana según filo, porcentajes relativos al total de las lecturas analizadas. (B) Composición microbiana del filo *Proteobacteria*, porcentajes relativos al filo. (C) Composición microbiana de la clase *Deltaproteobacteria*, porcentajes relativos a la clase. Unassigned= no asignada al dominio bacteria al comparar con la base de datos. Unc.= No clasificada.

Al igual que para las celdas TT, se analizó la composición de las OTUs que fueron detectadas en los ánodos de las SMFCs y no fueron detectadas en los fieltros control (figura 20). En este caso se encontraron 60 OTUs, las cuales representaban el 13,6% y 9,52% de las lecturas (10SL y 12SL respectivamente). La mayoría de estas fue clasificada en la clase *Deltaproteobacteria* (10,9% y 6,9%), orden *Desulfuromonadales* (10,8% y 6,8%). Sin embargo, menos de un 15% perteneció al género *Desulfuromonas* (1,7% y 0,9% de las lecturas).

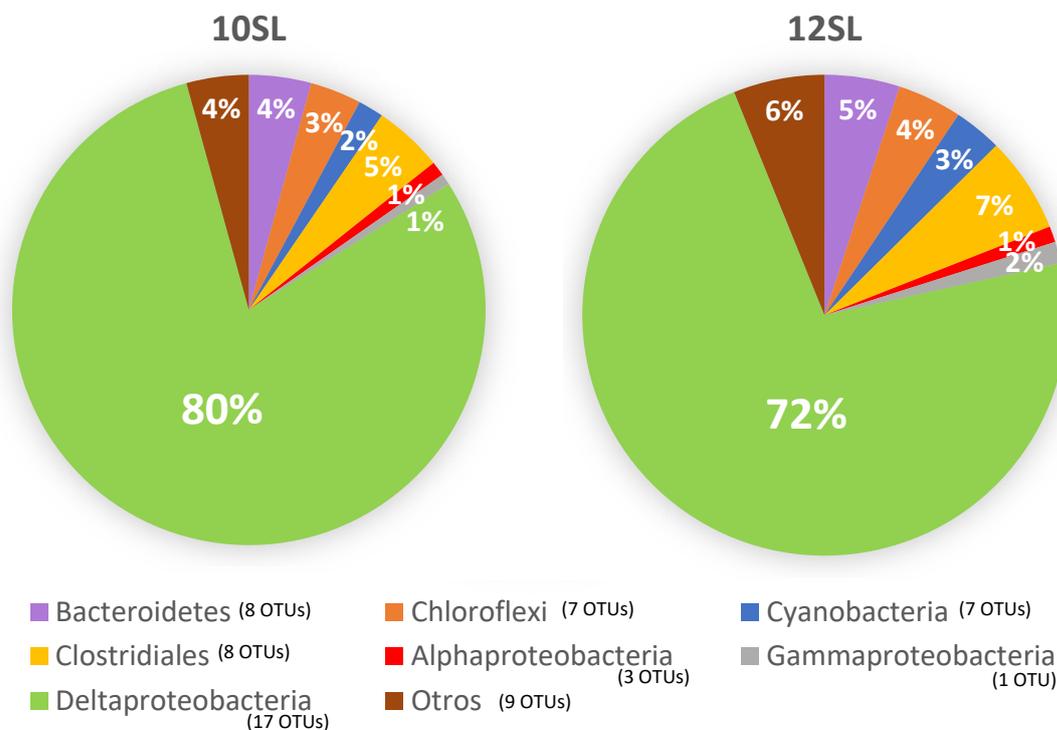


Figura 20. Clasificación taxonómica, de las OTUs detectadas solamente en SMFCs L, porcentajes relativos al 13,6% y 9,52% de las lecturas totales obtenidas para las SMFCs 10SL y 12SL respectivamente. Total de 60 OTUs,

También se analizó la composición microbiana de las OTUs predominantes, para ello se seleccionaron arbitrariamente las 5 OTUs con mayor abundancia relativa respecto al total de las lecturas analizadas para cada SMFC y control (Tabla 9). Como se observa en la tabla, la mayoría de las OTUs presentaron una abundancia relativa menor al 1%. En la SMFC JPV, las OTUs mayoritarias fueron clasificadas en los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*) y no se observó un enriquecimiento respecto a los controles. En las SMFCs TT, las OTUs mayoritarias fueron clasificadas en los filos *Firmicutes*, y *Proteobacteria* (*Deltaproteobacteria*) y se observó un enriquecimiento en la OTU10060 (*Geobacter*) respecto a los controles. En las SMFCs L, las OTUs mayoritarias fueron clasificadas en los filos *Cyanobacteria* y *Proteobacteria* (*Deltaproteobacteria*) y se observó un enriquecimiento en las OTUs 14138, 11272 y 3760 respecto a los controles.

Tabla 9. Abundancia relativa (% relativo al total de las lecturas analizadas) de las 5 OTUs más abundantes en los ánodos y fieltros control según origen, clasificación taxonómica realizada con la base de datos Greengenes 13\_8. (CA/CL) Controles. (SA/SL) SMFC.

ARROZ JPV					
OTU	Clasificación taxonómica	SMFC (1SA)	Control (2CA)	Control (3CA)	Control (4CA)
OTU10175	<i>unc. Bacillales</i>	17,9	13,0	18,7	14,0
OTU2246	<i>unc. Rhodospirillaceae</i>	1,4	1,4	0,6	1,5
OTU5070	<i>Bacillus</i>	1,1	0,8	1,5	1,1
OTU12765	<i>Rhodoplanes</i>	1,0	0,9	0,8	0,8
OTU12054	<i>unc. Rhodospirillaceae</i>	1,0	0,9	1,1	1,5
OTU3035	<i>unc. Hyphomicrobiaceae</i>	1,0	0,7	0,6	1,1
OTU12813	<i>Bacillus</i>	0,8	1,2	1,0	0,9
OTU12813	<i>unc. Propionibacteriaceae</i>	0,6	1,1	1,2	0,7
OTU11788	<i>unc. Burkholderiales</i>	0,2	1,2	0,2	0,1
OTU8148	<i>Bacillus</i>	0,2	0,4	1,0	0,4
ARROZ IT					
OTU	Clasificación taxonómica	SMFC (5SA)	SMFC (8SA)	Control (7CA)	Control (6CA)
OTU10175	<i>unc. Bacillales</i>	13,7	13,2	16,6	14,5
OTU8197	<i>Clostridium</i>	2,1	2,3	2,1	2,6
OTU10060	<i>Geobacter</i>	0,8	1,2	0,2	ND
OTU13889	<i>Clostridium</i>	0,5	1,0	0,4	0,4
OTU12813	<i>Bacillus</i>	1,4	1,0	1,4	0,8
OTU8148	<i>Bacillus</i>	1,0	0,8	1,1	1,0
OTU2246	<i>unc. Rhodospirillaceae</i>	0,4	0,8	0,8	0,4
OTU9154	<i>unc. Caloramator</i>	1,1	0,8	0,6	0,8
OTU8105	<i>Clostridium</i>	0,6	0,5	0,7	1,0
OTU11284	<i>unc. Propionibacteriaceae</i>	0,5	0,5	0,6	1,0
LAGUNA DE ROCHA					
OTU	Clasificación taxonómica	SMFC (12SL)	SMFC (10SL)	Control (9CL)	Control (11CL)
OTU1855	<i>Prochlorococcus</i>	15,8	9,3	10,1	9,3
OTU14138	<i>unc. Pelobacteraceae</i>	5,7	8,2	ND	ND
OTU11272	<i>Desulfuromonas</i>	2,6	4,1	ND	0,2
OTU6226	<i>Synechococcus</i>	4,7	3,5	2,6	2,4
OTU3760	<i>unc. Desulfobacteraceae</i>	0,6	1,5	0,3	ND
OTU616	<i>unc. Synechococcus</i>	2,1	0,64	0,5	1,1
OTU13608	<i>SHD-231</i>	0,9	0,75	2,7	0,8
OTU7441	<i>unc. Stramenopiles</i>	0,8	1,43	2,8	1,5
OTU9070	<i>unc. Enterobacteriaceae</i>	0,5	ND	2,1	ND
OTU6310	<i>unc. ZB2</i>	ND	0,14	ND	9,9
OTU11148	<i>unc. Helicobacteraceae</i>	ND	ND	0,4	5,5
OTU725	<i>unc. Helicobacteraceae</i>	ND	ND	0,07	4,2
OTU5160	<i>unc. Helicobacteraceae</i>	ND	ND	0,04	2,8

ND- OTU no detectada. unc- No clasificada

Se realizó un análisis filogenético con las OTUs que presentaron un enriquecimiento en los ánodos de las SMFCs (SA/SL) respecto a los fieltros control (CA/CL) (Tabla 10), con el fin de estudiar el agrupamiento de éstas, con secuencias pertenecientes a cepas reportadas como electroactivas (figura 21). Como se observa la figura 21, las OTUs de las SMFC TT (OTU10060, OTU4061 y OTU3919) agruparon con cepas electroactivas del género *Geobacter* (Kato, 2017; Nercessian et al., 2012). A su vez la OTU 3919 agrupó con un clon de un ánodo de una SMFC construida con suelo agrícola (Dunaj et al., 2012). La OTU 10274 (SMFC JPV) agrupó con secuencias del género *Desulfobulbus*, género en el cual sólo *Desulfobulbus propionicus* ha sido reportado como electroactivo (D. E. Holmes et al., 2004). La OTU14138, enriquecida en las SMFC L, agrupó con un clon reportado como enriquecido en el biofilm anódico de una SMFC construida con sedimento de laguna (Ishii et al., 2014). A su vez, las OTUs 9927 y 11272 clasificadas

como *Desulfuromonas*, agruparon con *Desulfuromonas acetoxidans* cepa reportada como enriquecida en MFC y electroactiva (Jiang et al., 2015; Pierra et al., 2015b). La OTU3760 agrupó con clon de una MFC alimentada con agua residual, sin embargo este clon perteneció a una celda operada en circuito abierto (Ishii et al., 2013).

Tabla 10. Abundancia relativa de las OTUs enriquecidas en las SMFCs vs controles. Clasificación taxonómica realizada con la base de datos Greengenes 13\_8. (CA/CL) Controles. (SA/SL) SMFC.

ARROZ JPV					
OTU	Clasificación Taxonómica	SMFC (1SA)	Control (2CA)	Control (3CA)	Control (4CA)
OTU10274	<i>unc. Desulfobulbaceae</i>	0,4	ND	ND	ND
ARROZ TT					
OTU	Clasificación taxonómica	SMFC (5SA)	SMFC (8SA)	Control (7CA)	Control (6CA)
OTU10060	<i>Geobacter</i>	0,8	1,2	0,2	ND
OTU3919	<i>Geobacter</i>	0,4	0,7	ND	ND
OTU4061	<i>Geobacter</i>	0,3	0,3	ND	ND
LAGUNA DE ROCHA					
OTU	Clasificación taxonómica	SMFC (12SL)	SMFC (10SL)	Control (9CL)	Control (11CL)
OTU14138	<i>unc. Pelobacteraceae</i>	5,7	8,2	ND	ND
OTU11272	<i>Desulfuromonas</i>	2,6	4,1	ND	0,2
OTU3760	<i>unc. Desulfobacteraceae</i>	0,6	1,5	0,3	ND
OTU9927	<i>Desulfuromonas</i>	0,5	0,9	ND	ND
ND- OTU no detectada. unc- No clasificada					

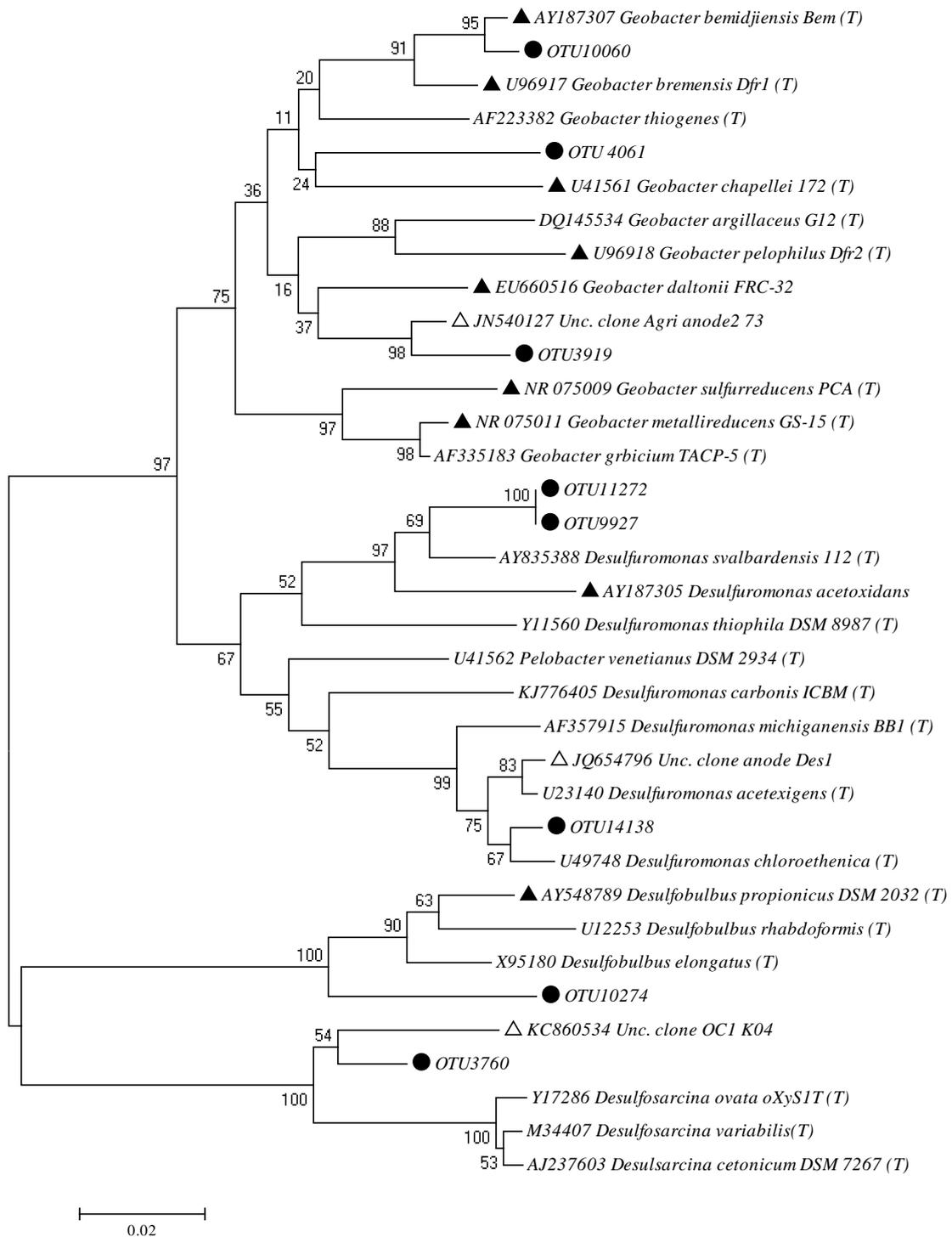


Figura 21. Árbol filogenético del gen ARNr 16S construido en base a las secuencias afiliadas a la clase *Deltaproteobacteria* enriquecidas en las SMFCs de laguna y arroz (Tabla 10). El análisis comprendió 35 secuencias con tamaño final de 335 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de las secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (▲) Secuencias de cepas reportadas como electroactivas. (△) Secuencias encontradas en ánodos de MFC. (●) Secuencias representativas de las OTUs enriquecidas en las SMFCs en este trabajo.

### 3.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANÓDICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNr 16S

Se lograron aislar 4 cepas de biofilms anódicos de SMFC en medio FE y 7 cepas en medio DE; sin embargo, no se lograron aislar bacterias sulfatorreductoras en medio S (Tabla 11).

Tabla 11. Aislamientos obtenidos a partir de los ánodos de SMFCs. Base de datos EzTaxon. <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>

Cepa	SMFC	Medio de aislamiento	Dador de electrones	Identificación filogenética	Nro. de Acceso	Similitud con cepa tipo (%)
FE1	JPV	DSMZ 579	APL	<i>Clostridium sphenoides</i>	X73449	99.54
				<i>Clostridium celerecrescens</i>	X71848	99.24
FE2	TT	DSMZ 579	Acetato	<i>Clostridium sphenoides</i>	X73449	99.56
				<i>Clostridium celerecrescens</i>	X71848	99.05
FE3	TT	DSMZ 579	APL	<i>Clostridium sphenoides</i>	X73449	99.77
				<i>Clostridium celerecrescens</i>	X71848	99.77
FE4	Laguna	DSMZ 579	APL	<i>Bacteroides xyloxyticus</i>	HF558386	98.83
				<i>Clostridium amygdalinum</i>	AY353957	98.69
DE1	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Rhizobium pusense</i>	FJ969841	100
				<i>Rhizobium radiobacter</i>	AJ389904	98.83
DE2	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	AJ310084	100
				<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	JF731238	99.79
DE3	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	KC311562	98.17
				<i>Pseudomonas mendocina</i>	D84016	97.95
DE4	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	99.79
				<i>Pseudomonas guariconensis</i>	HF674459	98.10
DE5	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Shewanella indica</i>	HM016084	99.69
				<i>Shewanella upenei</i>	GQ260190	99.08
DE6	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB099708	99.21
				<i>Bacillus aquimaris</i>	AF483625	98.43
DE7	Laguna	Desnitrificante	Acetato	<i>Bacillus horneckiae</i>	FR749913	99.90
				<i>Bacillus purgationiresistens</i>	FR666703	97.27

APL- Acetato+Piruvato+Lactato (5mM)

Las cepas fueron caracterizadas, en base al porcentaje de similitud obtenido al comparar con la base de datos EzTaxon (Tabla 11). A su vez, se realizó un árbol filogenético con las cepas que presentaron mayor porcentaje de similitud y cepas reportadas como electroactivas. Las cepas reductoras de hierro (FE1, FE2, FE3 y FE4), resultaron pertenecer al género *Clostridium* (tabla 11, figura 22). Aunque todas demostraron ser reductoras luego de 40 días de incubación, se observaron diferencias en el tiempo de incubación al cuál se detectó la reducción de hierro (Tabla 12). Para la cepa FE3 se

registró un periodo de 20 días sin actividad reductora (fase lag), con un valor máximo de reducción de Fe III del 56% al día 44 de incubación. Las cepas FE1, FE2 y FE3 fueron identificadas como *Clostridium sphenoides* (Tabla 11) y agruparon con una cepa electroactiva aislada (KT889284) en medio reductor de Fe (III) (Jiang et al., 2016) (Figura 22).

Tabla 12. Porcentaje de reducción de Fe III observado a los 10 días para las cepas aisladas en medio FE.

Cepa	Fe II (%)
FE1	20
FE2	100
FE3	No Detectado*
FE4	37
<b>*Se observó un 56% de Fe II al día 44</b>	

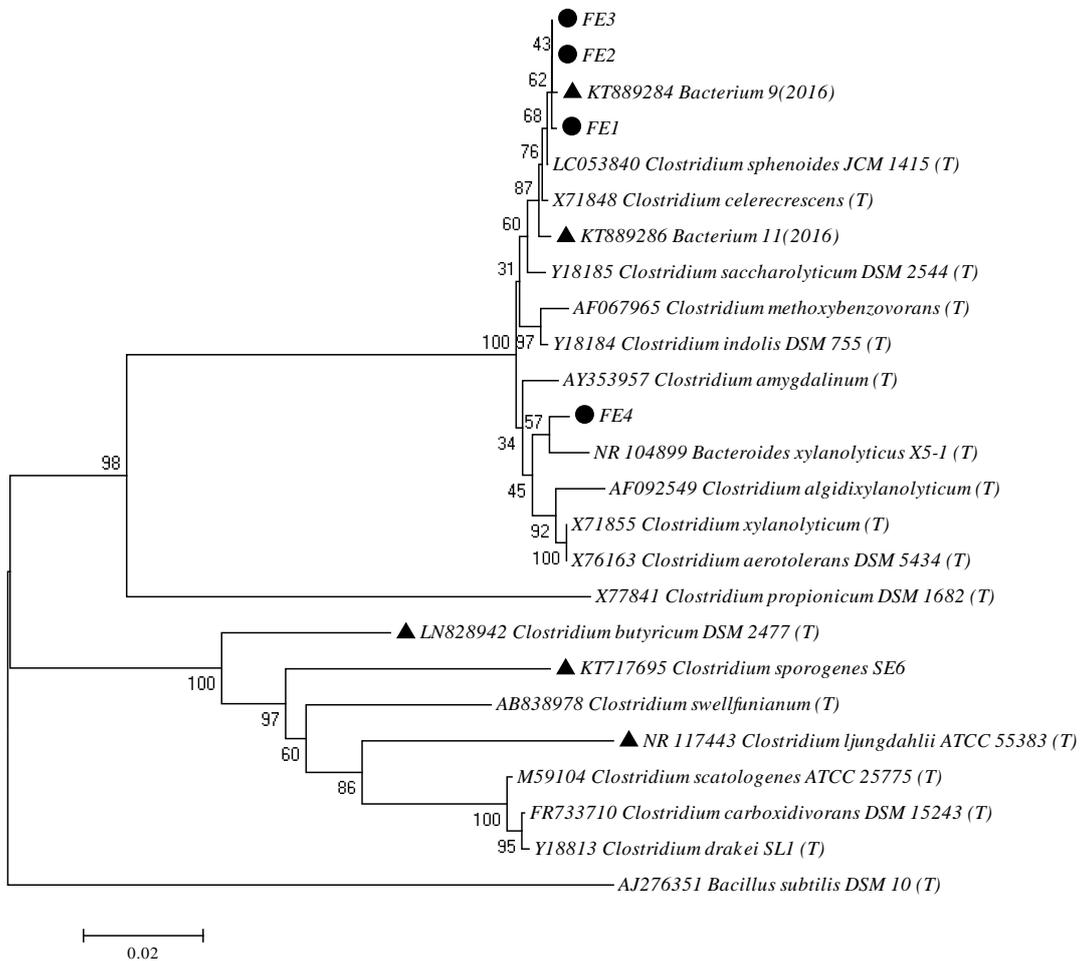


Figura 22. Afiliación filogenética del gen ARNr 16S de las cepas reductoras de hierro (FE1, FE2, FE3 y FE4). El análisis comprendió 25 secuencias con tamaño final de 1221 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de las secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (▲) Cepas reportadas como electroactivas. (●) Cepa reductora de hierro aislada de SMFC en este trabajo.

El escaso número de aislamientos obtenidos a partir de los ánodos (cepas FE), conllevó a la construcción de nuevas celdas con sedimento de laguna de Rocha (R) con el objetivo de poder aislar nuevas cepas (Materiales y Métodos 2.3). El enriquecimiento por el método A (Materiales y Métodos 2.3) realizado con el ánodo R2, resultó positivo (reducción del dador electrónico) para el medio DE, se observó reducción de nitrato hasta la dilución -3 y se aisló la cepa DE1. Para el medio FE y S, se observó reducción del dador electrónico solamente para el vial inoculado con la pieza de ánodo (dilución 0). Sin embargo, no se logró aislar ninguna cepa del medio S o FE. Las cepas DE2, DE3, DE4, DE5, DE6 y DE7 fueron aisladas por el método B. Todas las cepas DE resultaron aerobias y reductoras de nitrato en condiciones anaerobias; a su vez la cepa DE5 inoculada en medio FE redujo hierro con acetato como dador electrónico (reducción del 100% a Fe III al día 11).

La cepa DE1 fue clasificada como *Rhizobium pusense* (tabla 11, figura A3), sin embargo para este género no se han reportado bacterias electroactivas. La cepa DE2 fue clasificada dentro del género *Lysinibacillus* y las cepas DE6 y DE7 en el género *Bacillus* (tabla 9, figura 23). En el análisis filogenético de las cepas DE2, DE6 y DE7 con cepas reportadas como electroactivas (He et al., 2014; Kelly and He, 2014; Nandy et al., 2013; Zhang et al., 2012), la cepa DE2 agrupó con una cepa reportada como electroactiva (figura 23).

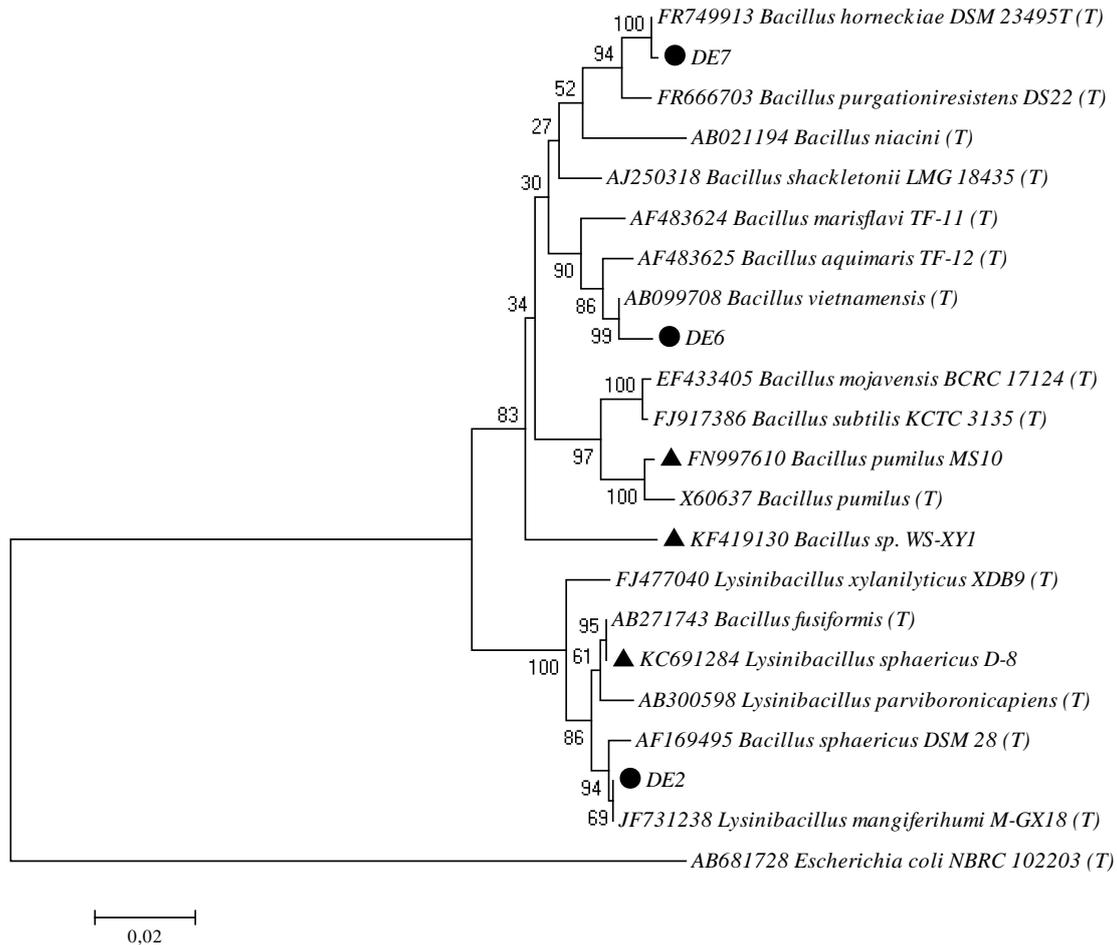


Figura 23. Afiliación filogenética del gen ARNr 16S de las cepas DE2, DE6, DE7. El análisis comprendió 22 secuencias con tamaño final de 781 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de la secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (▲) Cepas reportadas como electroactivas. (●) Cepa aislada de SMFC en este trabajo.

Las cepas DE3 y DE4 fueron clasificadas dentro del género *Pseudomonas* y la cepa DE5 dentro del género *Shewanella* (tabla 11, figura 24 y 25), para estos géneros se han reportado cepas electroactivas. En el análisis filogenético de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (figura 24), se observó un agrupamiento de la cepa DE4 con la cepa tipo *Pseudomonas stutzeri*. Recientemente, se ha demostrado que la cepa VS-10, clasificada como *P. stutzeri*, es capaz de utilizar un electrodo como aceptor de terminal de electrones (Sudek et al., 2017). Sin embargo, no se observó un agrupamiento de las cepas aisladas, con cepas reportadas como electroactivas para los géneros *Pseudomonas* y *Shewanella* (figura 24 y 25). (Carmona-Martínez et al., 2013; Nor et al., 2015; Uría et al., 2011; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2012).

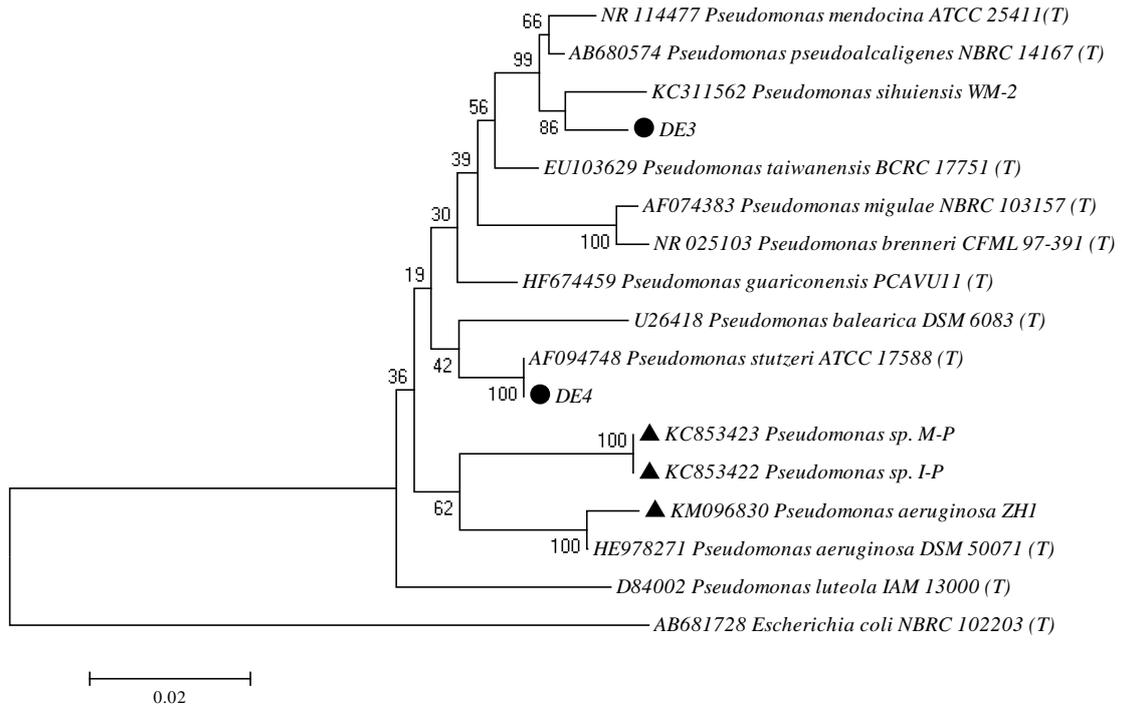


Figura 24. Afiliación filogenética del gen ARNr 16S de las cepas DE3 y DE4. El análisis comprendió 17 secuencias con tamaño final de 911 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de las secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (▲) Cepas reportadas como electroactivas. (●) Cepas aisladas de SMFC en este trabajo.

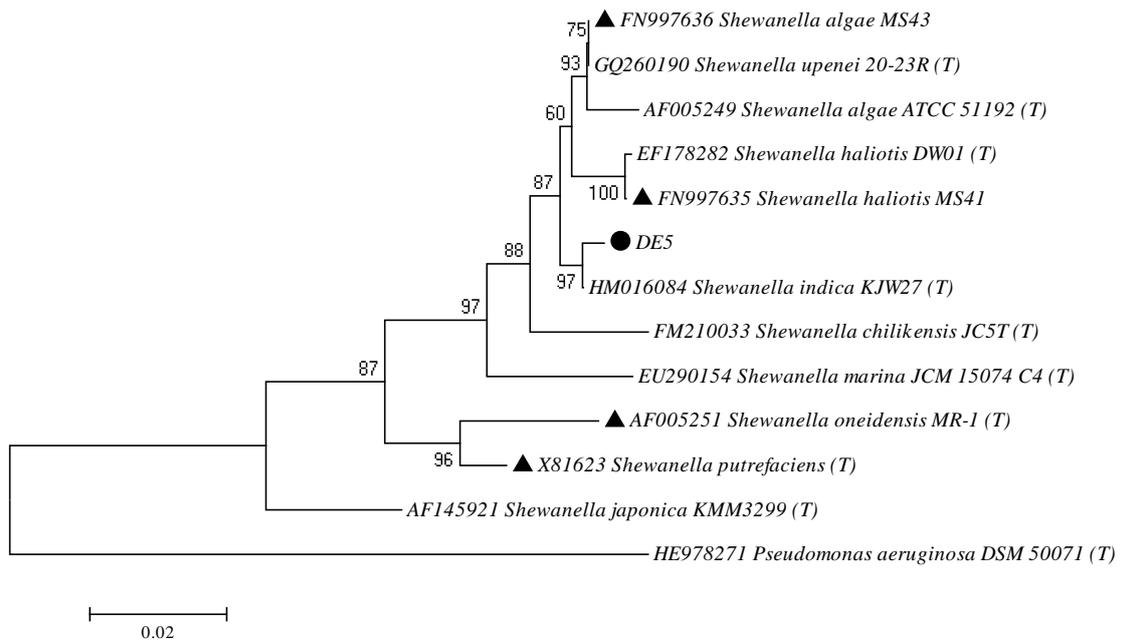


Figura 25. Afiliación filogenética del gen ARNr 16S de la cepa DE5. El análisis comprendió 13 secuencias con tamaño final de 906 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de las secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (▲) Cepas reportadas como electroactivas. (●) Cepa aislada de SMFC en este trabajo.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA ELECTROACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Para determinar la electroactividad de las cepas aisladas (FE1, FE4, DE1, DE2, DE3, DE4, DE5 y DE6) se realizó una cronoamperometría de cultivo puro en una celda de tres electrodos, con un voltaje aplicado de +0,2V vs Ag/AgCl. Para este análisis, la performance de la cepa de *Shewanella oneidensis* MR-1 (control positivo) se ensayó con lactato 10 mM como dador electrónico (resultados Anexo 4) y resultó del mismo orden que la reportada en bibliografía para un sistema similar (Carmona-Martinez et al., 2011) (Tabla 13).

Tabla 13. Performance de MFCs inoculadas con *S. oneidensis*

Cepa	Densidad de corriente (mA/m <sup>2</sup> )	Voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> LMG 19005 (en este trabajo)	19 ± 3	+0,2 vs Ag/AgCl
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Carmona-Martinez et al., 2011)	79 ± 15	+0,2 vs Ag/AgCl
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Lu et al., 2016)	1,3	+0,2 vs Ag/AgCl
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Liu et al., 2015)	320	+0,2 vs SCE SCE: Electrodo estándar de calomel
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Marsili et al., 2008)	160 ± 20	+0,24 vs SHE SHE: Electrodo estándar de Hidrógeno
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Manohar et al., 2008)	80	Sin voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Bretschger et al., 2007)	138 ± 13,7	Sin voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Manohar and Mansfeld, 2009)	9,2	Sin voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Hou et al., 2011)	4,03 ± 1,01	Sin voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> DSP10 (Ringeisen et al., 2007)	13	Sin voltaje aplicado
<i>S. oneidensis</i> MR-1 (Sudek et al., 2017)	0,007	Sin voltaje aplicado
<b><i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 = <a href="#">ATCC 700550</a> = CIP 106686 = LMG 19005</b>		

Como se observa en la figura 26, se obtuvo una señal basal para el control negativo (sin inóculo) menor a la señal registrada para la cepas ensayadas. Pese a que todas las cepas presentaron valores de densidad de corriente promedio superior al control negativo (tabla 14), los perfiles de producción de corriente observados para las cepas fueron diferentes.

Para las cepas DE5, DE2 y DE3, se observó un perfil similar al de una curva de crecimiento bacteriano, lo cual se asoció a una mejor performance en términos de densidad de corriente máxima (tabla 14).

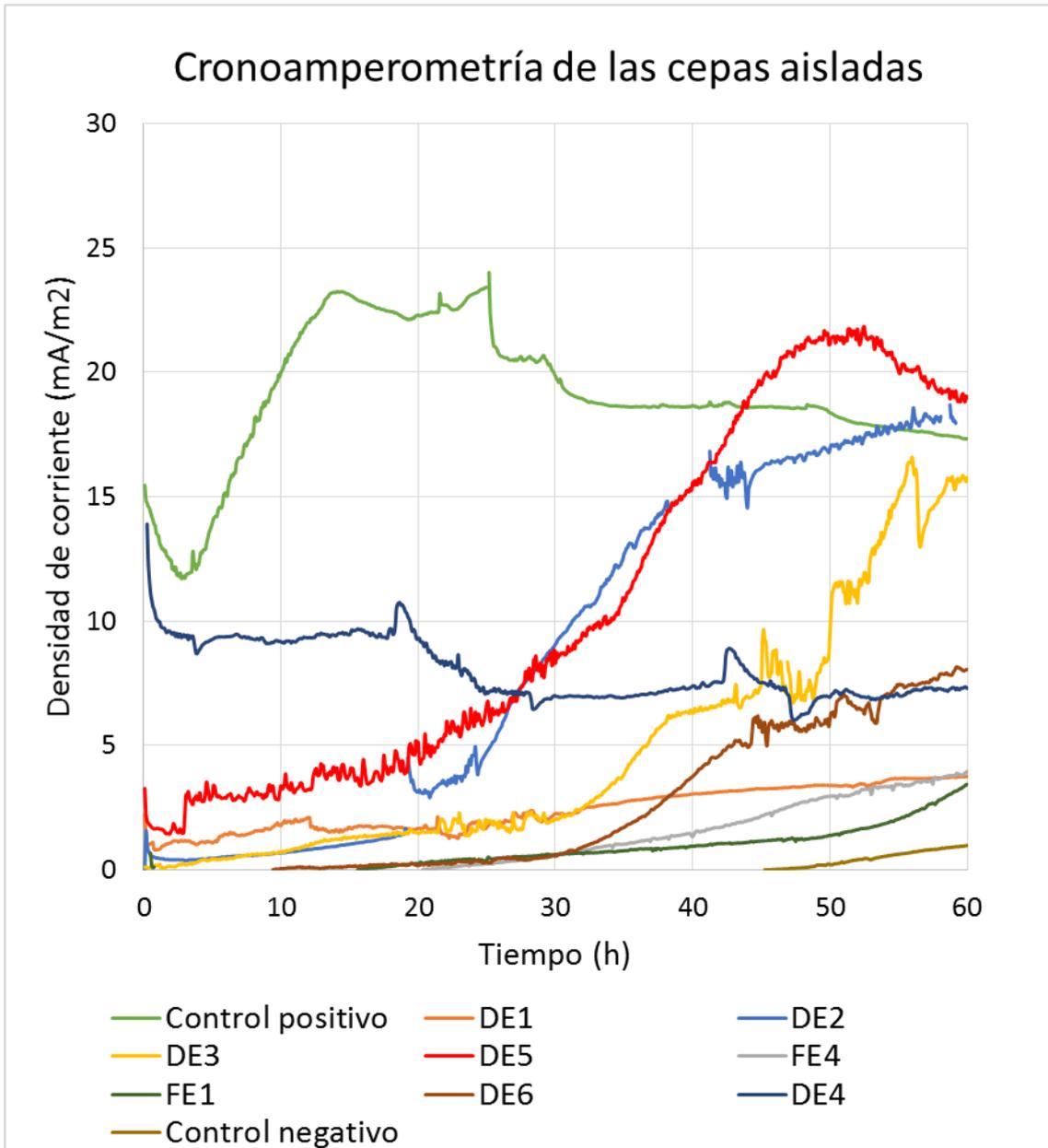


Figura 26. Ensayo de cronoamperometría para las cepas aisladas (DE/FE) realizado en una celda de tres electrodos. Voltaje aplicado = +0,2V vs Ag/AgCl. Control negativo = celda sin inocular. Control Positivo = *S. oneidensis*.

Tabla 14. Densidad de corriente promedio en 60hs para las cepas aisladas. Voltaje aplicado = +0,2V vs Ag/AgCl.

MUESTRA	Cepa	Densidad de corriente promedio (mA/m <sup>2</sup> )	Valor máximo de densidad de corriente (mA/m <sup>2</sup> )
<b>Control positivo</b>	<i>Shewanella oneidensis</i>	19,0	24,0
<b>DE5</b>	<i>Shewanella sp.</i>	10,7	21,8
<b>DE2</b>	<i>Lysinibacillus sp.</i>	8,4	18,7
<b>DE4</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	8,0	13,9
<b>DE3</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,8	16,6
<b>DE6</b>	<i>Bacillus sp.</i>	2,9	8,2
<b>DE1</b>	<i>Rhizobium sp.</i>	2,4	3,8
<b>FE4</b>	<i>Clostridium sp.</i>	1,7	4,0
<b>FE1</b>	<i>Clostridium sp.</i>	1,0	3,4
<b>Control negativo</b>	<i>Sin inóculo</i>	0,4	1,0

Para las cepas que presentaron una mejor performance DE5, DE3 y DE2 se estudió el consumo de acetato junto a la producción de corriente y se realizó una voltamperometría cíclica para determinar los picos redox (figura 27, 28, 29). A su vez se realizó una voltamperometría cíclica para los controles, no observándose picos redox en los controles negativos y un pico redox en el control positivo (*S. oneidensis*) a -348/-316 mV vs Ag/AgCl (resultados voltamperometría *S.oneidensis* en Anexo 4).

La cepa DE5 consumió el 76% del acetato suministrado en un período de 7 días, con un máximo de producción de corriente al día 2. En el análisis por voltamperometría cíclica al día 0 (luego de inoculado) no se detectaron picos redox. Al día 4 se observó un pico redox a -294 mV y al día 5 se encontró un pico redox similar (a -274 mV vs Ag/AgCl), con tamaño menor (Figura 27).

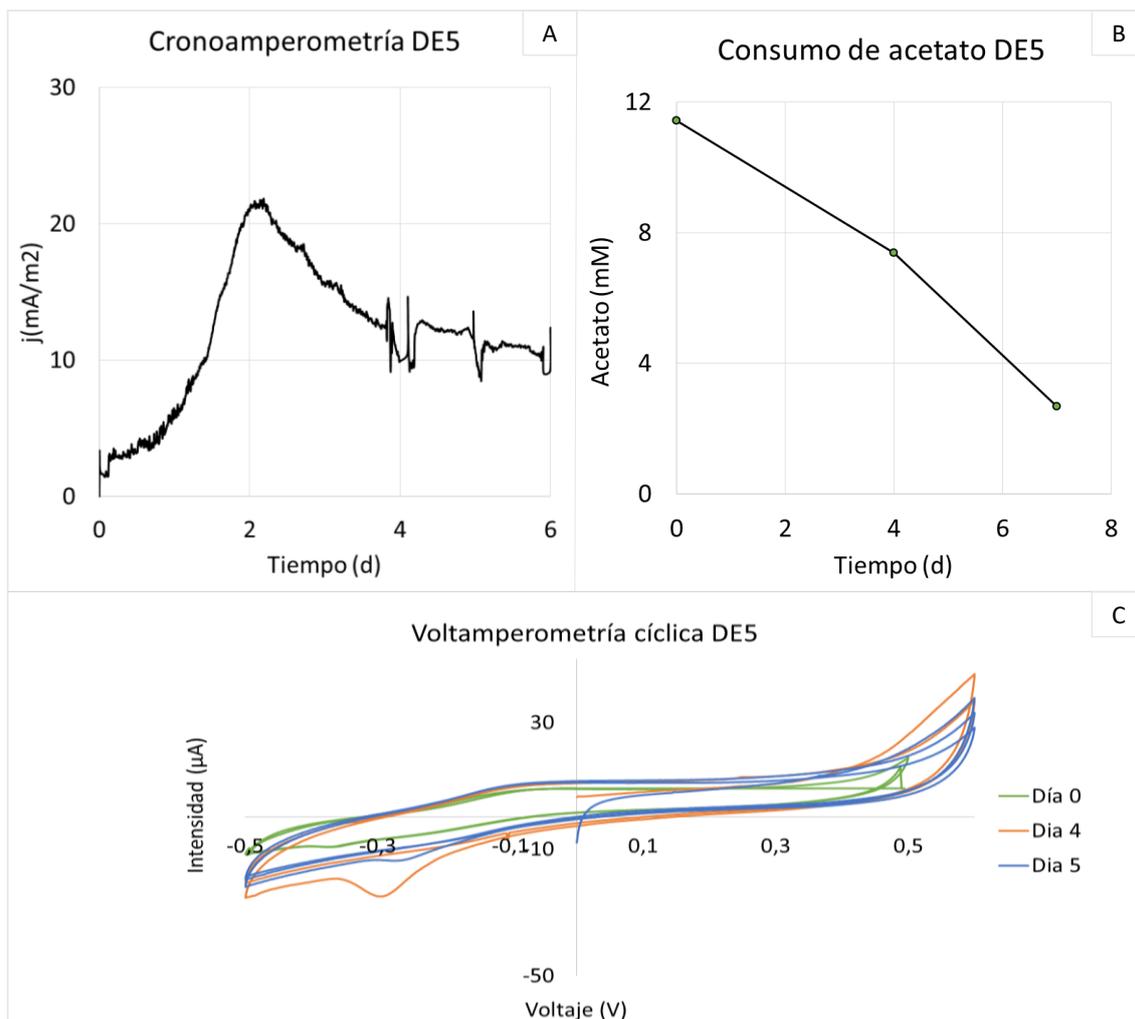


Figura 27. Caracterización electroquímica de la cepa DE5. A) Cronoamperometría +0,2V vs Ag/AgCl durante 6 días. B) Consumo de acetato (mM) durante el ensayo por cronoamperometría. C) Voltamperometría cíclica de la celda durante el ensayo por cronoamperometría.

La cepa DE3 consumió el 36% del acetato suministrado en un período de 6 días. Sin embargo, luego del día 2 la concentración de acetato se mantuvo estable. El máximo de producción de corriente se registró al día 3, manteniéndose en valores similares hasta el día 6. La disminución observada en la figura 28A, al día 3, se asoció al ruido generado durante la extracción de la muestra de acetato, por lo cual se consideró que los valores de densidad de corriente se mantuvieron estables luego del día 2. En el análisis por voltamperometría cíclica al día 6 se observó un pico redox a -344 mV vs Ag/AgCl (Figura 28), no encontrado en el control negativo (medio base + acetato).

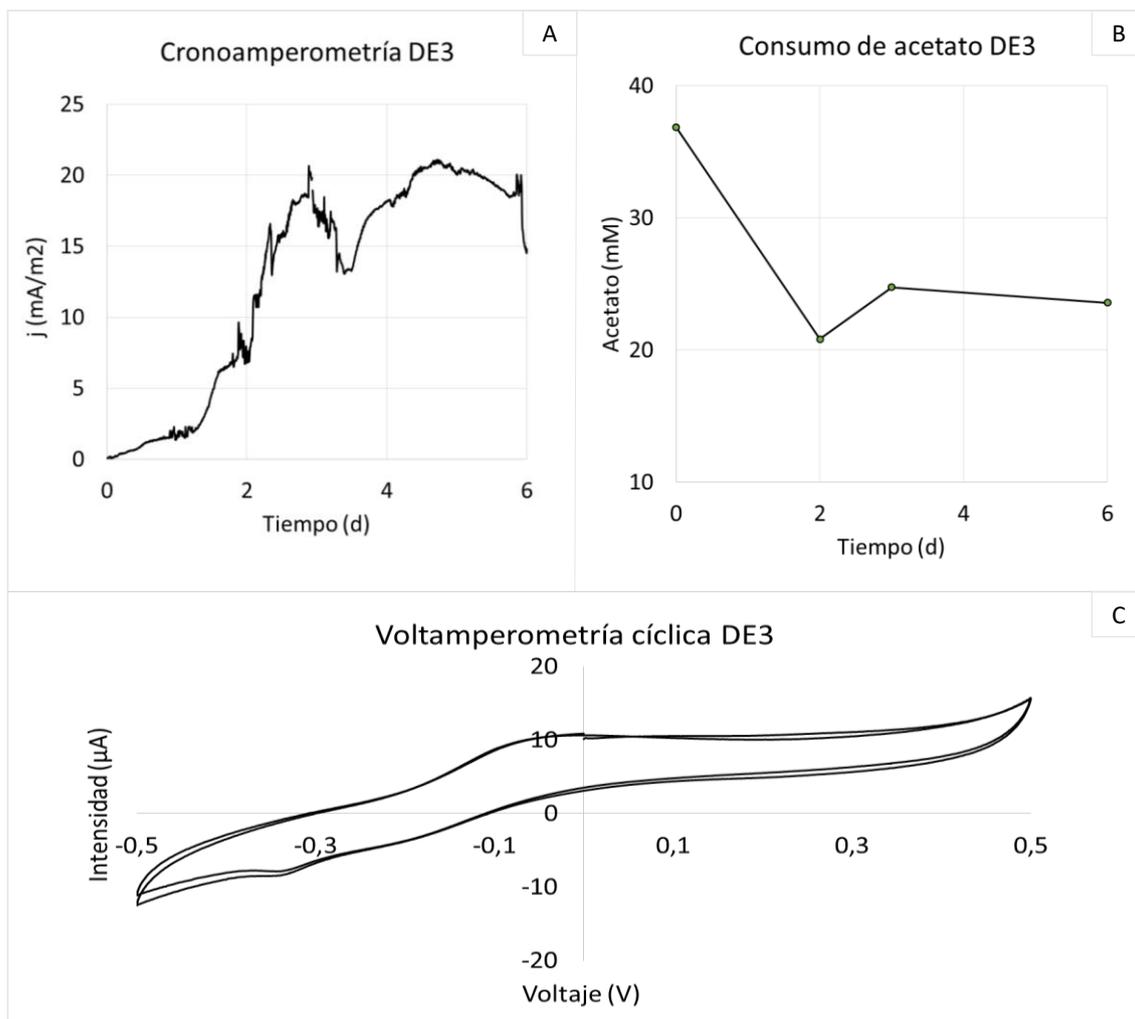


Figura 28. Caracterización electroquímica de la cepa DE3. A) Cronoamperometría +0,2V vs Ag/AgCl durante 6 días. B) Consumo de acetato (mM) durante el ensayo por cronoamperometría. C) Voltamperometría cíclica de la celda durante el ensayo por cronoamperometría al día 6.

La cepa DE2 consumió el 26% del acetato suministrado en un período de 7 días, con un valor relativamente constante luego del día 4. El máximo de producción de corriente, se observó al día 7, luego de estabilizado el consumo de acetato, En el análisis por voltamperometría cíclica al día 1 (luego de inoculado) no se detectaron picos redox. Al día 3 se observó un pico redox a -368 mV vs Ag/AgCl, similar al observado al día 7 a -330 mV vs Ag/AgCl (Figura 29).

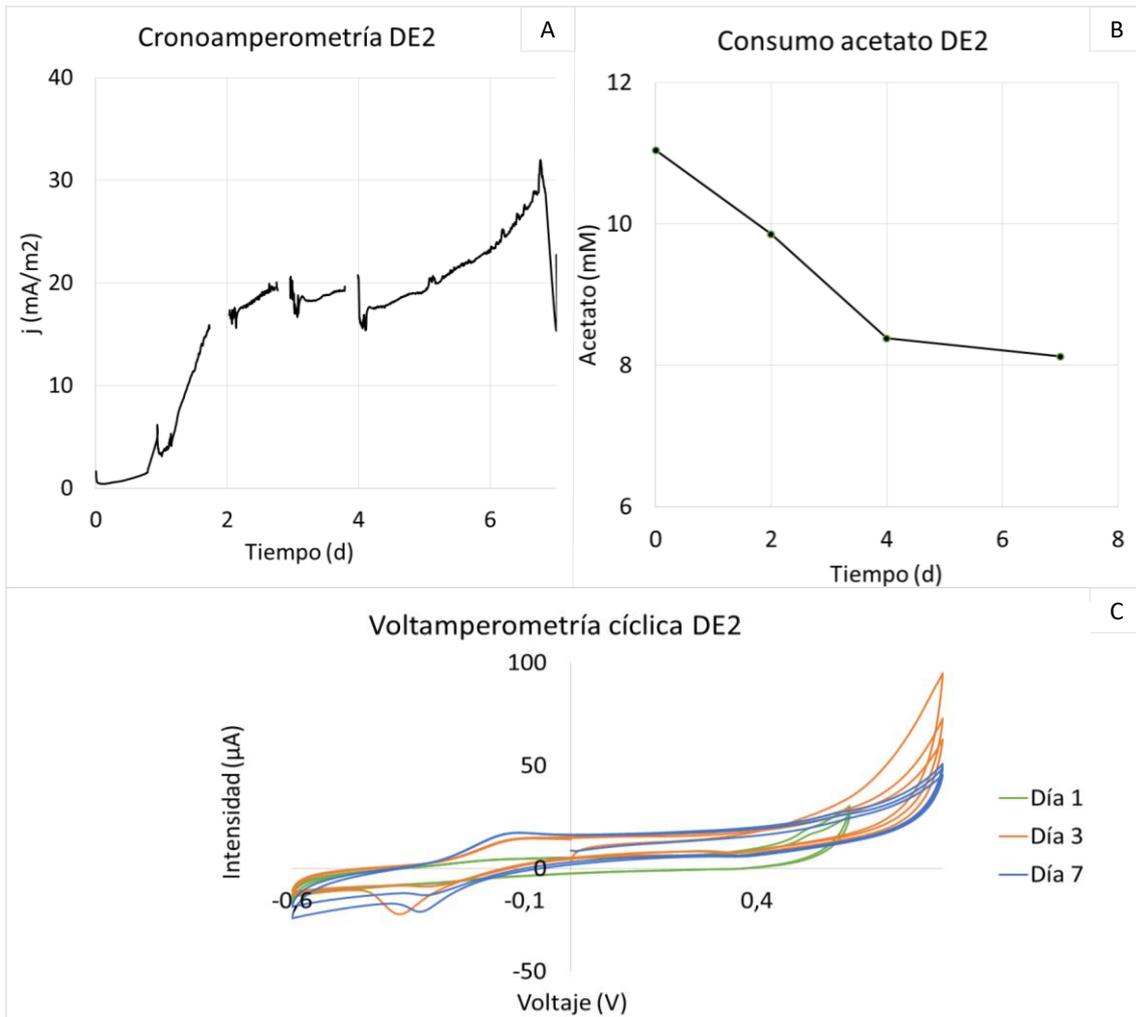


Figura 29. Caracterización electroquímica de la cepa DE2. A) Cronoamperometría +0,2V vs Ag/AgCl durante 6 días. B) Consumo de acetato (mM) durante el ensayo por cronoamperometría. C) Voltamperometría cíclica de la celda durante el ensayo por cronoamperometría

## 4 DISCUSIÓN

---

### 4.1 CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE SEDIMENTO (SMFCs)

La performance registrada para cada SMFC en términos de densidad de corriente fue muy variable, registrándose una mejor performance para las SMFCs construidas con sedimento de Laguna de Rocha.

Las SMFCs construidas con dos tipos de suelo de arroz presentaron distintos comportamientos. Para el suelo de arroz JPV no se obtuvo un duplicado en circuito cerrado y solo se logró asegurar la condición de anaerobiosis, en el ánodo, para una celda (1SA) que presentó una fase lag (sin producción de corriente) de 30 días. En bibliografía, el tiempo asociado a la formación de un biofilm electroactivo en el ánodo varía de 4 a 100 días (Mei et al., 2015; Patil et al., 2010; Zhang et al., 2012). En este trabajo, la dificultad observada en formar un biofilm electroactivo, podría estar asociada a una baja carga microbiana viable en el inóculo, lo cual también afectaría el alcance de un potencial positivo durante el monitoreo en circuito abierto. Como se mencionó anteriormente, los microorganismos presentes en la interfase agua-sedimento contribuyen a la formación de un gradiente redox en el sedimento, por el consumo del oxígeno por parte del metabolismo oxidativo aerobio (Froelich et al., 1979; Tender et al., 2008). En el caso del suelo de arroz TT, se obtuvieron duplicados para trabajar en circuito cerrado, sin embargo, los resultados no fueron reproducibles (solo una celda logró producir energía). La dificultad observada en obtener replicados con un comportamiento similar en SMFCs de arroz ya ha sido reportada (Ishii et al., 2017) y se ha asociado a que estos suelos presentan una comunidad microbiana muy diversa.

La performance de las SMFCs en función de los valores de densidad de corriente, resultó dentro del rango a la reportada en bibliografía para SMFC sin sustrato (5-90 mA/m<sup>2</sup>) (tabla 15). Se excluyó la celda 5SA (la cual se considera que no produjo energía). Para las SMFCs construidas con suelos de arroz, los valores obtenidos fueron comparados con los reportados en el trabajo de Cabezas, 2010 para las SMFCs construidas con suelo de arroz (sin planta).

Las SMFCs construidas con sedimento de laguna de Rocha presentaron una performance similar a la reportada en bibliografía para SMFCs construidas con sedimento marino y sedimento de laguna. Asimismo, la producción de energía de estas SMFCs, se inició en un tiempo menor y, en términos generales, fue mayor que la observada para las SMFCs construidas con suelo de arroz. Esta laguna posee además de afluentes de agua dulce, intrusiones marinas periódicas desde el Océano Atlántico, lo cual genera un gradiente fisicoquímico en términos de salinidad, luz y disponibilidad de nutrientes (Alonso et al., 2013). El aporte de sales al sistema, aumenta la conductividad eléctrica, y es probable que este factor contribuyera, en forma positiva, sobre la performance observada. A su vez, en el trabajo de Ishii et al. 2017, también se observó una mejor performance en las SMFCs construidas con sedimento de laguna respecto a las SMFCs construidas con suelo de arroz.

En términos de potencia, la generación de energía de las SMFCs fue menor a la necesaria para la alimentar a la mayoría de los dispositivos electrónicos (menor a 1W). Por lo cual, se ha propuesto para el escalado, sistemas de administración energética en base a la utilización de distintos dispositivos electrónicos (por ej. agregado al circuito eléctrico de un dispositivo que almacena energía) (Wang et al., 2015). En este caso, la producción energética se podría optimizar con la adición de un capacitor al circuito, estos dispositivos almacenan la energía producida por la SMFC y la liberan luego de alcanzado un valor determinado (Donovan et al., 2013) y se han utilizado para la alimentación energética del robot EcoBot (Wang et al., 2015). Por otro lado, se debe considerar que durante los ensayos no hubo adición de materia orgánica a las SMFCs y es probable que la instalación *in situ* de estas SMFCs, presente una mejor producción energética, ya que la materia orgánica presente en el sedimento es renovable.

Tabla 15. Performance de SMFCs reportadas en bibliografía

Inóculo	Sustrato	Densidad de corriente (mA/m <sup>2</sup> )
Sedimento marino (Reimers et al., 2001)	-	5
Suelo de arroz (Cabezas, 2010)	-	4,4/4,8
Suelo de arroz (Cabezas, 2010)	-	6,8/7,1
Suelo de arroz (en este trabajo)	-	9,2 ± 4,4
Suelo de arroz (en este trabajo)	-	12,7 ± 4,8
Suelo de arroz (Cabezas, 2010)	-	40,1/40,6/46,4
Sedimento de laguna (en este trabajo)	-	10,5 ± 4,2
Sedimento de lago artificial (Hong et al., 2009)	-	14-18
Sedimento marino (Mathis et al., 2008)	-	10/22
Sedimento de laguna (en este trabajo)	-	30,3 ± 20,6
Sedimento de laguna (en este trabajo)	-	30,4 ± 24,8
Sedimento marino (Holmes et al., 2004)	-	30
Sedimento marino (Reimers et al., 2006)	-	33
Sedimento de laguna (en este trabajo)	-	41,5 ± 48,6
Sedimento marino (Scott et al., 2008)	-	90
Sedimento de laguna (en este trabajo)	-	101,5 ± 72,5
Sedimento de laguna (Fuentes-Albarran et al., 2012)	Acetato 3mM	5,1
Suelo de arroz (Rubaba et al., 2013)	Lactato 20 mM	125 ± 6
Suelo de arroz (Kouzuma et al., 2013)	Exudado de planta de arroz	132 ± 25
Sedimento de río (He et al., 2007)	Sacarosa 6,3 mM	172/175
Sedimento de laguna (Ishii et al., 2014)	Acetato 15mM	650/690

## 4.2 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA ANÓDICA UTILIZANDO TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN)

El análisis de la abundancia relativa de los fragmentos obtenidos por T-RFLP, permitió establecer un enriquecimiento en los ánodos comparando con los fieltros de los controles, de ciertos grupos bacterianos en las SMFC TT y L, probablemente relacionados a la producción de corriente en estas celdas. Sin embargo, no se observó un enriquecimiento en el ánodo de la SMFC JPV respecto las celdas control. A su vez, se demostró la existencia de un cambio en la comunidad bacteriana en los ánodos respecto al suelo o sedimento, lo cual se asoció al crecimiento de un biofilm en el ánodo.

Los resultados observados para los ánodos y fieltros control por pirosecuenciación, coincidieron con lo hallado por la técnica de T-RFLP en cuanto a que la comunidad en las muestras de arroz resultó más diversa que la encontrada en las muestras de laguna. Asimismo, para las muestras de arroz TT y L se logró diferenciar, por ambas técnicas, el ánodo de la SMFC del fieltro del control.

En las SMFCs y controles de arroz los filos más abundantes fueron *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Sin embargo, sólo se observó un enriquecimiento en las SMFCs de la clase *Deltaproteobacteria*. En ánodos de MFCs, ya se ha reportado un enriquecimiento de microorganismos pertenecientes a esta clase (Bruce E. Logan and Regan, 2006; Miceli et al., 2012; Parot et al., 2009). En la SMFC JPV, se registró un enriquecimiento de esta clase, debido al aumento de una OTU perteneciente a la familia *Desulfobulbaceae*. Sin embargo, esta diferencia representó menos del 1% de las lecturas totales (SA =0,48% vs CA= no detectada). Dentro de esta familia, se ha reportado un enriquecimiento en el género *Desulfobulbus* en ánodos de MFCs con plantas de arroz (Cabezas, 2010). En las SMFCs TT, se encontró un enriquecimiento del género *Geobacter* y una de las OTUs, clasificada dentro de este género, agrupó con una cepa electroactiva (Kato, 2017).

En cuanto a los filos más abundantes encontrados tanto en las SMFCs como en los controles, el filo *Firmicutes*, ya se ha reportado dentro de los más abundantes en ánodos de SMFCs de arroz (Kouzuma et al., 2013; Ringelberg et al., 2011). Se cree que el rol de este grupo es el de generar productos de fermentación que luego van a ser consumidos por los microorganismos electroactivos (Dunaj et al., 2012). No obstante, no se ha

descartado su participación directa en la transferencia de electrones al ánodo y de hecho se han reportado microorganismos electroactivos pertenecientes al género *Bacillus* y *Clostridium* (Nimje et al., 2009; Park et al., 2001). El filo *Actinobacteria* se ha reportado dentro de los más abundantes en los suelos de arroz, se lo considera adaptado al suelo agrícola (Cui et al., 2012; Finn et al., 2017) y se ha encontrado en ánodos de MFC (Khater et al., 2017). Microorganismos del filo *Proteobacteria*, incluyendo las clases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -*proteobacteria*, ya se han reportado en ánodos de MFC (Kim et al., 2007; Bruce E. Logan and Regan, 2006; Phung et al., 2004). En los ánodos y fieltros control de arroz, la clase *Alphaproteobacteria* fue la más abundante. Las OTUs mayoritarias pertenecientes a esta clase, fueron clasificadas dentro del orden *Rhizobiales* (fijadoras de nitrógeno) y familia *Rhodospirillaceae*. Se ha reportado la presencia de *Rhizobiales* en ánodos de suelos de arroz (Ishii et al., 2008; Nishio, 2010), sin embargo, hasta la fecha, no se han aislado microorganismos electroactivos de este grupo.

En base a los resultados, se considera que el rol de las *Deltaproteobacterias* en la producción energética de las SMFCs de arroz fue fundamental y se asoció la producción energética observada a microorganismos de la familia *Desulfobulbaceae*, para la SMFC *JPV* y del género *Geobacter* para las SMFCs *TT*. Aunque, se ha comprobado la capacidad de transferir electrones al ánodo para microorganismos del género *Geobacter* y *Desulfobulbus*, (D. E. Holmes et al., 2004; Kato, 2017), no se descarta la participación de otras especies, con abundancias relativas menores, en la transferencia electrónica.

Para las muestras de laguna, ánodos y fieltros control, los filos más abundantes fueron *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*. Sin embargo, al igual que con las muestras de arroz, solo se observó un enriquecimiento, en las SMFCs, de la clase *Deltaproteobacteria*, con un predominio de microorganismos pertenecientes al orden *Desulfuromonadales*. En MFCs construidas con sedimento marinos, ya se ha reportado un enriquecimiento en microorganismos pertenecientes al orden *Desulfuromonadales*, clasificados en los géneros *Geobacter* y *Desulfuromonas* (Bond et al., 2002; Ishii et al., 2017; Reimers et al., 2006). Especies pertenecientes a este orden han sido clasificadas como bacterias reductoras de sulfato (SRB) y en sedimentos marinos cumplen un rol fundamental en el ciclo anaeróbico del carbono. A su vez, se han reportado SRB capaces de utilizar electrodos como aceptor de electrones (Holmes et al. 2004; Muyzer & Stams 2008; Pierra et al. 2015b). Sin embargo, pese a que se han reportado microorganismos electroactivos en este orden, no se observó un agrupamiento de las OTU enriquecidas en las SMFCs-L

con cepas descritas como electroactivas. Algunas de las OTUs enriquecidas en las SMFCs, agruparon con clones obtenidos a partir de ánodos de MFC y una de ellas fue clasificada, dentro de la familia *Pelobacteraceae*. Aunque se ha registrado un enriquecimiento en *Pelobacter* en MFCs (Rubaba et al., 2013; Vandecandelaere et al., 2010), hasta la fecha, no se han reportado microorganismos electroactivos de este género.

El filo *Cyanobacteria* fue el más abundante en las SMFCs como en los controles. Si bien se ha demostrado la electroactividad dependiente de la luz para miembros del filo *Cyanobacteria*, no se esperaba encontrar este filo en tal abundancia debido a que estas celdas fueron incubadas en oscuridad. A diferencia de las muestras de arroz, la clase *Deltaproteobacteria* fue la más abundante del filo *Proteobacteria*, seguida de la clase *Gammaproteobacteria*. La presencia de microorganismos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* ya se ha publicado en MFCs (Jung et al., 2014), así como miembros electroactivos del género *Shewanella* y *Pseudomonas* (Rabaey et al., 2004; Watson and Logan, 2010). Sin embargo, no se observó un enriquecimiento de este filo en las SMFCs L. De acuerdo a lo observado, se propone que los microorganismos del orden *Desulfuromonadales* participaron de la transferencia electrónica en el ánodo de las SMFC L, no descartándose la electroactividad de miembros de la familia *Pelobacteraceae*.

En cuanto a las OTUs enriquecidas en las SMFCs pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria*, se observó una mayor abundancia relativa para las SMFCs que presentaron una mejor performance, las SMFCs L comparadas con las SMFCs de arroz. Por lo cual, es posible asociar una mejor performance de las SMFCs (en términos de densidad de corriente) a una mayor abundancia de las OTUs enriquecidas en los ánodos.

### **4.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANÓDICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL GEN DE ARNR 16S**

Las cepas aisladas de los ánodos de las SMFCs fueron clasificadas como pertenecientes a las clases *Bacilli*, *Clostridia*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, observadas por las técnicas de biología molecular. Las cepas aisladas como reductoras de hierro III fueron identificadas dentro del género *Clostridium*. Aunque los microorganismos de este género se caracterizan por poseer un metabolismo fermentativo, se han identificado microorganismos capaces de catalizar la reducción enzimática de Fe

(III) y/o electroactivos pertenecientes a este género (Dobbin et al., 1999; Jiang, 2016; Park et al., 2001; Zhu et al., 2011), con capacidad de transferencia directa de electrones asociada a la presencia de citocromos ligados a la membrana (Park et al., 2001).

Todas las cepas aisladas de celdas construidas con suelo de arroz fueron identificadas como *Clostridium sphenoides*. La cepa FE4 aislada del biofilm de celdas de laguna, también agrupó dentro del género *Clostridium*, pero a diferencia de las cepas FE1, FE2 y FE3, que agruparon con una cepa electroactiva aislada (KT889284) en medio reductor de Fe (III) (Jiang et al., 2016), no agrupó con cepas electroactivas de ese género.

Las cepas de laguna aisladas en medio DE presentaron una mayor diversidad. La mayoría fueron clasificadas dentro de géneros con microorganismos reportados como electroactivos, como en el caso de *Bacillus* (He et al., 2014; Nimje et al., 2009), *Pseudomonas* (Mukherjee et al., 2013; Pandit et al., 2015; Pham et al., 2008) y *Shewanella* (Kim et al., 1999; Marsili et al., 2008). En cambio, la cepa DE1 fue clasificada dentro del género *Rhizobium* e identificada como *Rhizobium pusense*, microorganismo reportado como capaz de crecer anaeróbicamente en medio con nitrato de potasio (Panday et al., 2011). Hasta la fecha, no se han publicado microorganismos electroactivos en este género. Las cepas DE2, DE6 y DE7 fueron clasificadas como pertenecientes a la clase *Bacilli*, sin embargo, no se observó un agrupamiento con las cepas electroactivas. Asimismo, las cepas clasificadas dentro los géneros *Pseudomonas* (DE3 y DE4) y *Shewanella* (DE5) tampoco agruparon con cepas reportadas como electroactivas. Esto podría significar que otras especies dentro de estos géneros presentan la capacidad de producir corriente.

Pese a la diversidad microbiana observada para las SMFC, solamente se logró aislar un microorganismo en las celdas de arroz, que perteneció al filo más abundante (*Firmicutes*). La mayoría de las cepas aisladas de laguna, fueron clasificadas en grupos microbianos con abundancia relativa menor, los géneros mencionados presentaron baja abundancia relativa o no fueron detectadas en las SMFCs-L. Las técnicas dependientes de cultivo tienen una limitante, en cuanto a que se estima que solamente un 1% de la población total es cultivable. Pese a que son selectivas, los medios de enriquecimiento elegidos tenían como objetivo de recuperar los microorganismos enriquecidos en las SMFC (*Geobacter*, *Desulfuromonas* o *Pelobacter*). Sin embargo, no se lograron aislar cepas pertenecientes a estos géneros. Esto pudo deberse a que estos microorganismos se caracterizan por poseer un metabolismo anaerobio estricto. El aislamiento de microorganismos anaerobios

estrictos de estos géneros, es más dificultoso, debido a la baja tasa de crecimiento y a la ausencia de estructuras de resistencia. En cuanto a la no detección por pirosecuenciación en los ánodos de las SMFCs L de los géneros de las cepas aisladas, se debe considerar que los aislamientos se realizaron partir de los ánodos de las SMFCs-R (R1 y R2).

#### **4.4 DETERMINACIÓN DE LA ELECTROACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS AISLADAS**

El análisis por cronoamperometría de las cepas aisladas, permitió un primer abordaje hacia la caracterización electroquímica de las cepas. Todas las cepas analizadas produjeron de corriente eléctrica durante el ensayo por cronoamperometría. Sin embargo, la densidad de corriente promedio registrada varió entre 19,0 mA/m<sup>2</sup> y 1,0 mA/m<sup>2</sup>. Como se observa en la tabla 16, existen en la literatura varias cepas definidas como electroactivas, no obstante, los valores de densidad de corriente varían inclusive para una misma cepa (ej. *S. oneidensis* y *G. sulfurreducens* PCA = DSM 12127). Hasta la fecha, no existe un criterio armonizado de cómo se debería determinar la capacidad de transferir electrones para una cepa, por lo cual la calidad e interpretación de los datos se ve influenciada por las condiciones del ensayo (Babauta et al., 2012). Se han utilizado distintas técnicas para evaluar la electroactividad de las cepas como la cronoamperometría, las curvas de polarización y la voltamperometría cíclica, con distintas configuraciones de celda (MFC o de tres electrodos, con o sin voltaje aplicado, distinto tipo de electrodo, etc).

El ensayo por cronoamperometría consiste en hacer crecer microorganismos electroactivos capaces de utilizar el electrodo como único aceptor de electrones, donde la corriente producida refleja el crecimiento microbiano. Y en este sentido, se observó que el comportamiento de cada cepa fue distinto, con una mejor performance (en términos de densidad de corriente máxima) para las cepas DE5 (*Shewanella sp.*), DE2 (*Lysinibacillus sp.*) y DE3 (*Pseudomonas sp.*).

Para las cepas DE5, DE2 y DE3, se midió el consumo de acetato durante la producción energética y también se realizó una voltamperometría cíclica para determinar la presencia de compuestos redox. En cuanto al consumo de acetato, el comportamiento varió según la cepa, no observándose el máximo de consumo con el máximo de producción de corriente para las cepas DE5 y DE2. Para la cepa DE5 (*Shewanella sp.*), se observó

consumo de acetato, sin aumento en la producción de corriente, por lo cual no todos los electrones derivados del consumo del acetato fueron cedidos al electrodo. Para la cepa DE2 (*Lysinibacillus sp.*) se observó el máximo de producción de corriente, luego de estabilizado el consumo de acetato. Esta observación, coincidió con lo reportado en bibliografía, que expresa que, en la transferencia electrónica al electrodo, no solo influye la disponibilidad del dador electrónico, sino también, la tasa de oxidación interna o de transferencia de electrones (Labelle and Bond, 2009), la cual es afectada por la saturación de células sobre el electrodo (Marsili et al., 2008). A su vez, la presencia de otro aceptor final de electrones (como el oxígeno que pudiera permear en el sistema) compite con el proceso de transferencia de electrones al electrodo, lo cual se refleja en un consumo del dador electrónico sin producción energética.

En cuanto a los mecanismos de transferencia, se sabe que *S. oneidensis* MR-1 es capaz de transferir los electrones en forma directa y mediada, siendo capaz de biosintetizar flavinas (como la riboflavina y el mononucleótido de flavina) como mediadores solubles de la transferencia electrónica (Liu et al., 2015). En la transferencia directa, podrían participar los citocromos MtrC y OmcA, cuyos picos redox se han encontrado entre los -397 mV y -347 a -297mV vs Ag/AgCl (Labelle and Bond, 2009). El pico de las flavinas se ha reportado próximo a los -407 mV vs Ag/AgCl, sin embargo, se plantea que el potencial observado puede variar ante pequeños cambios de pH (Marsili et al., 2008). Otro trabajo asoció un pico redox a aproximadamente -300 mV vs Ag/AgCl a este mediador (Carmona-Martinez et al., 2011). En la voltamperometría cíclica realizada para esta cepa (Anexo 4), se observó un pico a -348/-316 mV vs Ag/AgCl, el cual podría estar asociado a la transferencia directa mediada por OmcA, a su vez los valores de densidad de corriente observados, coincidieron con lo reportado para un film de OmcA puro (16 mA/cm<sup>2</sup>) (Labelle and Bond, 2009). Para las cepas DE5 (*Shewanella sp.*), DE3 (*Pseudomonas sp.*) y DE2 (*Lysinibacillus sp.*), en base a los ensayos realizados y a la bibliografía encontrada, no se pudo concluir acerca del mecanismo de transferencia (directo o mediado). Sin embargo, en todos los casos, se detectó un pico asociado a la producción energética, por lo cual es probable que exista algún compuesto involucrado en la transferencia de electrones al electrodo.

Tabla 16. Densidad de corriente registrada para cepas electroactivas

Cepa	Densidad de corriente (mA/m <sup>2</sup> )	Voltaje aplicado	Sustrato
<b>R. ferrireducens T118<sup>T</sup></b> (Chaudhuri and Lovley, 2003)	31	+0,2 vs Ag/AgCl	Glucosa 2mM
<b>G. sulfurreducens DSM 12127<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	2360	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>G. sulfurreducens PCA<sup>T</sup></b> (Bond and Lovley, 2003)	168	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato ≤2 mM
<b>G. metallireducens DSM 7210<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	1810	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>G. daltonii DSM 22248<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	280	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>G. bemidjensis DSM 16622<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	< 20	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>G. chappellei DSM 13688<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	< 30	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>G. pelophilus DSM 12255<sup>T</sup></b> (Kato, 2017)	< 30	+0,2 vs Ag/AgCl	Acetato 10mM
<b>Bacillus sp. WS-XY1</b> (Wu et al., 2014)	7,0 ± 0,3	+0,3 vs Ag/AgCl	Glucosa 10mM
<b>Aeromonas hydrophila HS01</b> (Feng et al., 2013)	150	+0,2 vs SCE	Lactato 20mM
<b>Shewanella decolorationis S12</b> (Feng et al. 2013)	480	+0,2 vs SCE	Lactato 20mM
<b>Shewanella putrefaciens SP200</b> (Feng et al. 2013)	230	+0,2 vs SCE	Lactato 20mM
<b>Geoalkalibacter subterraneus Red1</b> (Carmona-Martínez et al., 2013)	4680 ± 540	+0,2 vs SCE	Acetato 10mM
<b>S. oneidensis MR-1</b> (Carmona-Martínez et al., 2011)	79 ± 15	+0,2 vs Ag/AgCl	Lactato 18mM
<b>S. oneidensis MR-1</b> (Lu et al., 2016)	1,3	+0,2 vs Ag/AgCl	Lactato 20mM
<b>S. oneidensis MR-1</b> (Liu et al., 2015)	320	+0,2 vs SCE	Lactato 18mM
<b>S. oneidensis MR-1</b> (Rosenbaum et al., 2010)	341 ± 42	+0,4 vs SHE	Lactato 20mM
SCE- Electrodo estándar de calomel SHE- Electrodo estándar de hidrógeno			

## 5 CONCLUSIONES

---

Se logró producir energía en SMFCs construidas con suelos de arroz y sedimento de laguna del Uruguay, con una mejor performance para las SMFCs construidas con sedimento de Laguna de Rocha.

La producción energética observada, se asoció a un cambio en la comunidad microbiana del suelo o sedimento, debido a la formación de un biofilm en el ánodo enriquecido en microorganismos pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria*. Para las SMFCs de arroz, se observó un aumento en la abundancia relativa de bacterias de la familia *Desulfobulbaceae* y género *Geobacter* respecto a los controles y para las SMFC de laguna se observó un aumento en la abundancia relativa de la familia *Pelobacteraceae* y *Desulfobacteraceae*, y del género *Desulfuromonas*.

Se lograron aislar 11 cepas electroactivas a partir del biofilm anódico, utilizando medios de enriquecimiento con Fe III o nitrato como aceptor de final de electrones. El estudio por cronoamperometría demostró que todas las cepas eran capaces de producir corriente en condiciones de cultivo puro, sin embargo, la performance registrada para las cepas aisladas fue menor que la reportada para los microorganismos modelo (*G. sulfurreducens* y *S. oneidensis*). El análisis por voltamperometría cíclica de las cepas que presentaron mejor performance (DE5, DE2 y DE3), reveló la aparición de un pico redox durante la producción de corriente, lo cual se asoció a la presencia de un compuesto involucrado en la transferencia de electrones al ánodo. No obstante, no se observó una correlación entre el consumo de acetato y la producción de corriente, lo que reflejó que no todos los electrones derivados del consumo de acetato fueron transferidos al electrodo, pudiendo existir otros factores que limitaran la transferencia de electrones al ánodo.

## 6 PERSPECTIVAS

---

En base a los resultados obtenidos, se propone el desarrollo de un inóculo (mixto o puro) con las cepas DE5 (*Shewanella sp.*), DE2 (*Lysinibacillus sp.*) y DE3 (*Pseudomonas sp.*) para utilizar en SMFC “in situ” en la Laguna de Rocha. A su vez, se plantea evaluar por técnicas moleculares, la influencia de dicho inóculo en el desarrollo del biofilm electroactivo, comparando la población microbiana activa en el ánodo de SMFC con SMFCs sin inocular, así como la viabilidad de utilizar estos dispositivos como fuente de energía.

Por otro lado, es de interés profundizar en los mecanismos de transferencia electrónica que presentan estas cepas, con el fin de optimizar este proceso ya sea mediante la adición de un compuesto capaz de mediar la transferencia de electrones al electrodo, y/o estimulación de la expresión génica de compuestos involucrados en la transferencia directa o indirecta de electrones al electrodo.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., Rabaey, K., 2008. The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 409–418. doi:10.1007/s00253-007-1327-8
- Allen, R.M., Bennetto, H.P., 1993. Microbial fuel cells: Electricity production from carbohydrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39, 27–40. doi:10.1007/BF02918975
- Alonso, C., Piccini, C., Unrein, F., Bertoglio, F., Conde, D., Pernthaler, J., 2013. Environmental dynamics as a structuring factor for microbial carbon utilization in a subtropical coastal lagoon. *Front. Microbiol.* 4, 1–19. doi:10.3389/fmicb.2013.00014
- Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2012. Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling* 28, 789–812. doi:10.1080/08927014.2012.710324
- Balance Energético Nacional - Abastecimiento de energía por fuente [WWW Document], 2015. . Dir. Nac. Energía. URL <http://www.miem.gub.uy> (accessed 8.17.17).
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2000. ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications, in: Harris, D., Swain, E., Aiello, E. (Eds.), . JOHN WILEY & SONS, INC, New York, p. 864.
- Bellini, M.I., Gutiérrez, L., Tarlera, S., Scavino, A.F., 2013. Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 505–516. doi:10.1016/j.syapm.2013.07.001
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., 2002. Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* (80-. ). 483. doi:10.1126/science.1066771
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. doi:10.1128/AEM.69.3.1548
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., Kim, B.H., 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813. doi:10.1039/c1ee02511b
- BP, 2017. BP Statistical Review of World Energy June 2011 [WWW Document]. BP Stat. Rev. Energy World. URL <http://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review-2017/bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report.pdf>
- Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C.A., In, S.C., Gorby, Y.A., Reed, S.B., Culley, D.E., Reardon, C.L., Barua, S., Romine, M.F., Zhou, J., Beliaev, A.S., Bouhenni, R., Saffarini, D., Mansfeld, F., Kim, B.H., Fredrickson, J.K., Nealson, K.H., 2007. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7003–7012. doi:10.1128/AEM.01087-07
- Cabezas, A., 2010. Diversity and Function of the Microbial Community on Anodes of Sediment Microbial Fuel Cells fueled by Root Exudates. Universität Marburg.
- Cabezas, A., Pommerenke, B., Boon, N., Friedrich, M.W., 2015. *Geobacter*, *Anaeromyxobacter* and *Anaerolineae* populations are enriched on anodes of root exudate-driven microbial fuel cells in rice field soil. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 489–497. doi:10.1111/1758-2229.12277
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Carmona-Martínez, A.A., Harnisch, F., Fitzgerald, L.A., Biffinger, J.C., Ringeisen, B.R., Schröder, U., 2011. Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry* 81, 74–80. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.02.006
- Carmona-Martínez, A.A., Harnisch, F., Kuhlicke, U., Neu, T.R., Schröder, U., 2013. Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochemistry* 93, 23–29. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.05.002
- Chae, K.J., Choi, M.J., Lee, J.W., Kim, K.Y., Kim, I.S., 2009. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 100, 3518–3525. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.065
- Chang, I.S., Jang, J.K., Gil, G.C., Kim, M., Kim, H.J., Cho, B.H., 2004. Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 19,

- 607–613. doi:10.1016/S0956-5663(03)00272-0
- Chang, I.S., Moon, H., Bretschger, O., Jang, J.K., Park, H. II, Nealsen, K.H., Kim, B.H., 2006. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1002/macp.200700627
- Chaudhuri, S.K., Lovley, D.R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229–1232. doi:10.1038/nbt867
- Cui, J., Meng, H., Nie, M., Chen, X., Li, Z., Bu, N., Li, B., Chen, J., Quan, Z., Fang, C., 2012. Bacterial succession during 500 years of soil development under agricultural use. *Ecol. Res.* 27, 793–807. doi:10.1007/s11284-012-0955-3
- Dai, J., Wang, J.J., Chow, A.T., Conner, W.H., 2015. Electrical energy production from forest detritus in a forested wetland using microbial fuel cells. *GCB Bioenergy* 7, 244–252. doi:10.1111/gcbb.12117
- De Schampheleire, L., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M.W., Boon, N., Verstraete, W., 2010. Microbial community analysis of anodes from sediment microbial fuel cells powered by rhizodeposits of living rice plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2002–2008. doi:10.1128/AEM.02432-09
- De Schampheleire, L., Rabaey, K., Boeckx, P., Boon, N., Verstraete, W., 2008. Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. *Microb. Biotechnol.* 1, 446–462. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00042.x
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05
- Dobbin, P.S., Carter, J.P., Hobe, M., Powell, Richardson, García Salamanca, C., 1999. Dissimilatory Fe ( III ) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe ( III ) maltol enrichment. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 131–138.
- Donovan, C., Dewan, A., Heo, D., Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2013. Sediment microbial fuel cell powering a submersible ultrasonic receiver: New approach to remote monitoring. *J. Power Sources* 233, 79–85. doi:10.1016/j.jpowsour.2012.12.112
- Doyle, L.E., Marsili, E., 2015. Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2015.07.025
- Du, Z., Li, H., Gu, T., 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2007.05.004
- Dunaj, S.J., Vallino, J.J., Hines, M.E., Gay, M., Kobyljanec, C., Rooney-Varga, J.N., 2012. Relationships between soil organic matter, nutrients, bacterial community structure, and the performance of microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1914–22. doi:10.1021/es2032532
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R., 2001. Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restrictio. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 190–197. doi:10.1128/AEM.67.1.190
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Ewing, T., Ha, P.T., Babauta, J.T., Tang, N.T., Heo, D., Beyenal, H., 2014. Scale-up of sediment microbial fuel cells. *J. Power Sources* 272, 311–319. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.08.070
- Finn, D., Kopittke, P.M., Dennis, P.G., Dalal, R.C., 2017. Microbial energy and matter transformation in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 111, 176–192. doi:10.1016/j.soilbio.2017.04.010
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., Maynard, V., 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43, 1075–1090. doi:10.1016/0016-7037(79)90095-4
- Futamata, H., Bretschger, O., Cheung, A., Kan, J., Owen, R., Nealsen, K.H., 2013. Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortium fed with lactate. *Seibutsu-kogaku Kaishi* 115, 58–63. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.07.016
- Girguis, P., Nielsen, M., Reimers, C., 2010. Fundamentals of benthic microbial fuel cells: theory, development and application, in: Rabaey, K., Angenent, L.T., Schröder, U., Keller, J. (Eds.), *Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*. IWA Publishing, pp. 327–346.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealsen, K.H., Fredrickson, J.K., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11358–11363.

doi:10.1073/pnas.0604517103

- Gradskov, D.A., Kazarinov, I.A., Ignatov, V. V, 2001. Bioelectrochemical oxidation of glucose with bacteria *Escherichia coli*. *Russ. J. Electrochem.* 37, 1216–1219.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* doi:citeulike-article-id:691774
- He, H., Yuan, S.J., Tong, Z.H., Huang, Y.X., Lin, Z.Q., Yu, H.Q., 2014. Characterization of a new electrochemically active bacterium, *Lysinibacillus sphaericus* D-8, isolated with a WO<sub>3</sub> nanocluster probe. *Process Biochem.* 49, 290–294. doi:10.1016/j.procbio.2013.11.008
- Holmes, D., Bond, D., O'Neil, R., Reimers, C.E., Tender, L.R., Lovley, D.R., 2004. Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178–190. doi:10.1007/s00248-003-0004-4
- Holmes, D.E., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe ( III ) and Graphite Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1234. doi:10.1128/AEM.70.2.1234
- Holmes, D., Bond, D., O'Neil, R., Reimers, C.E., Tender, L.R., Lovley, D.R., 2004. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178–190. doi:10.1007/s00248-003-0004-4
- Huan, D., Yi-Cheng, W., Fan, Z., Zong-Chuan, H., Zheng, C., Hui-Juan, X., Feng, Z., 2014. Factors Affecting the Performance of Single-Chamber Soil Microbial Fuel Cells for Power Generation \* 1. *Pedosph. An Int. J.* 24, 330–338. doi:10.1016/S1002-0160(14)60019-9
- I. Ieropoulos, C.M. and J., Greenman, 2003. Artificial Metabolism: Towards True Energetic Autonomy in Artificial Life. 7th Eur. Conf. Artif. Life, ECAL 2801, 792–799. doi:10.1007/978-3-540-39432-7\_85
- Ieropoulos, I., Winfield, J., Greenman, J., Melhuish, C., 2010. Small scale microbial fuel cells and different ways of reporting output. *ECS Trans.* 28, 1–9. doi:10.1149/1.3492221
- Ishii, S., Ishii, S., Suzuki, S., Wu, A., Wu, A., Bretschger, O., Suzuki, S., Suzuki, S., Neelson, K.H., Bretschger, O., Bretschger, O., Yamanaka, Y., 2017. Population dynamics of electrogenic microbial communities in microbial fuel cells started with three different inoculum sources, *Bioelectrochemistry*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.06.003
- Ishii, S., Shimoyama, T., Hotta, Y., Watanabe, K., 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiol.* 8, 6. doi:10.1186/1471-2180-8-6
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Phan, T., Wanger, G., Neelson, K.H., Sekiguchi, Y., Gorby, Y.A., Bretschger, O., 2014. Microbial population and functional dynamics associated with surface potential and carbon metabolism. *ISME J.* 8, 963–978. doi:10.1038/ismej.2013.217
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Wu, A., Yamanaka, Y., Neelson, K.H., Bretschger, O., 2013. Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res.* 47, 7120–7130. doi:10.1016/j.watres.2013.07.048
- Jang, J.K., Pham, T.H., Chang, I.S., Kang, K.H., Moon, H., Cho, K.S., Kim, B.H., 2004. Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell. *Process Biochem.* 39, 1007–1012. doi:10.1016/S0032-9592(03)00203-6
- Jiang, 2016. Characterization of a novel electrogenic *Clostridium sporogenes* isolated from forest soil. *Acta Microbiol. Sin.* 56, 846–855. doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150335
- Jiang, Y.-B., Deng, H., Sun, D.-M., Zhong, W.-H., 2015. Electrical signals generated by soil microorganisms in microbial fuel cells respond linearly to soil Cd<sup>2+</sup> pollution. *Geoderma* 255–256, 35–41. doi:10.1016/j.geoderma.2015.04.022
- Jiang, Y.-B., Zhong, W.-H., Han, C., Deng, H., 2016. Characterization of Electricity Generated by Soil in Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria. *Front. Microbiol.* 7, 1776. doi:10.3389/fmicb.2016.01776
- Jung, S.P., Yoon, M.H., Lee, S.M., Oh, S.E., Kang, H., Yang, J.K., 2014. Power generation and anode bacterial community compositions of sediment fuel cells differing in anode materials and carbon sources. *Int. J. Electrochem. Sci.*
- Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y., Watanabe, K., 2008. Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 43–49. doi:10.1007/s00253-008-1410-9
- Kang, K.H., Jang, J.K., Pham, T.H., Moon, H., Chang, I.S., Kim, B.H., 2003. A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor. *Biotechnol. Lett.* 25, 1357–1361. doi:10.1023/A:1024984521699
- Kato, S., 2017. Influence of Anode Potentials on Current Generation and Extracellular Electron Transfer Paths of *Geobacter* Species. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 108. doi:10.3390/ijms18010108
- Kelly, P.T., He, Z., 2014. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review.

- Bioresour. Technol. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.046
- Khater, D.Z., El-Khatib, K.M., Hassan, H.M., 2017. Microbial diversity structure in acetate single chamber microbial fuel cell for electricity generation. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.008
- Kim, B.H., Chang, I.S., Gil, G.C., Park, H.S., Kim, H.J., 2003. Novel BOD (Biochemical Oxygen Demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* 25, 541–545. doi:10.1023/A:1022891231369
- Kim, B.H., Ikeda, T., Park, H.S., Kim, H.J., Hyun, M.S., Kano, K., Takagi, K., Tatsumi, H., 1999. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnol. Tech.* 13, 475–478. doi:10.1023/A:1008993029309
- Kim, G.T., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, H.J., Park, H.S., Kim, B.H., Kim, S.D., Wimpenny, J.W.T., Weightman, A.J., 2005. Dissimilatory Fe(III) reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil. *J. Appl. Microbiol.* 99, 978–987. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02514.x
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., 2002. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145–152. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1
- Kim, J.R., Jung, S.H., Regan, J.M., Logan, B.E., 2007. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 98, 2568–2577. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.036
- Koch, C., Harnisch, F., 2016. What Is the Essence of Microbial Electroactivity? *Front. Microbiol.* 7, 1–5. doi:10.3389/fmicb.2016.01890
- Kouzuma, A., Kasai, T., Nakagawa, G., Yamamuro, A., Abe, T., Watanabe, K., 2013. Comparative metagenomics of anode-associated microbiomes developed in rice paddy-field microbial fuel cells. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0077443
- Kumar, R., Singh, L., Wahid, Z.A., Din, M.F.M., 2015. Exoelectrogens in microbial fuel cells toward bioelectricity generation: A review. *Int. J. Energy Res.* doi:10.1002/er.3305
- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* doi:10.1016/j.rser.2015.12.029
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, msw054. doi:10.1093/molbev/msw054
- Labelle, E., Bond, D.R., 2009. Cyclic voltammetry for the study of microbial electron transfer at electrodes. *Bioelectrochemical Syst. From Extracell. electron Transf. to Biotechnol. Appl.* 137–152.
- Lewis, K., 1966. Symposium on Bioelectrochemistry of Microorganisms, IV. *Biochemical Fuel Cells. Bacteriol. Rev.* 30, 101–113.
- Liu, H., Logan, B.E., 2004. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4040–4046. doi:10.1021/Es0499344
- Liu, L., Lee, D.J., Wang, A., Ren, N., Su, A., Lai, J.Y., 2016. Isolation of Fe(III)-reducing bacterium, *Citrobacter* sp. LAR-1, for startup of microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 4498–4503. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.07.072
- Liu, T., Yu, Y.Y., Deng, X.P., Ng, C.K., Cao, B., Wang, J.Y., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Song, H., 2015. Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 2051–2059. doi:10.1002/bit.25624
- Liu, Z., Liu, J., Zhang, S., Xing, X.-H., Su, Z., 2011. Microbial fuel cell based biosensor for in situ monitoring of anaerobic digestion process. *Bioresour. Technol.* 102, 10221–10229. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.053
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es0605016
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Microbial fuel cells--challenges and applications. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5172–5180. doi:10.1021/es0627592
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518. doi:10.1016/j.tim.2006.10.003
- Lovley, D.R., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro1442
- Lovley, D.R., Phillips, E.J., 1986a. Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal potomac river. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 751–757.

- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1986b. Organic Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments. *Appl. Envir. Microbiol.* 51, 683–689. doi:10.1080/01490458709385975
- Madigan, Martinko, Bender, Buckley, Stahl, 2015. *Brock. Biology of Microorganisms*, 14th ed. Pearson, Boston.
- Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R., 2008. Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3968–3973. doi:10.1073/pnas.0710525105
- McInerney, M.J., Sublette, K.L., 1997. Petroleum microbiology: biofouling, souring and improved oil recovery. *Man. Environ. Microbiol.* 600–607.
- Mei, X., Guo, C., Liu, B., Tang, Y., Xing, D., 2015. Shaping of bacterial community structure in microbial fuel cells by different inocula. *RSC Adv.* 5, 78136–78141. doi:10.1039/C5RA16382J
- Miceli, J.F., Parameswaran, P., Kang, D.W., Krajmalnik-Brown, R., Torres, C.I., 2012. Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es301902h
- Moon, H., Chang, I.S., Kim, B.H., 2006. Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 97, 621–627. doi:10.1016/j.biortech.2005.03.027
- Mukherjee, S., Su, S., Panmanee, W., Irvin, R.T., Hassett, D.J., Choi, S., 2013. A microliter-scale microbial fuel cell array for bacterial electrogenic screening. *Sensors Actuators, A Phys.* 201, 532–537. doi:10.1016/j.sna.2012.10.025
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6.
- Nandy, A., Kumar, V., Kundu, P.P., 2013. Utilization of proteinaceous materials for power generation in a mediatorless microbial fuel cell by a new electrogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VA5. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 339–344. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.07.006
- Nealson, K.H., Myers, C.R., 1992. Microbial reduction of manganese and iron: New approaches to carbon cycling. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Nercessian, O., Parot, S., Delia, M.L., Bergel, A., Achouak, W., 2012. Harvesting electricity with *geobacter bremensis* isolated from compost. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034216
- Nielsen, M.E., Reimers, C.E., Stecher, H.A., 2007. Enhanced power from chambered benthic microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7895–7900. doi:10.1021/es071740b
- Nimje, V.R., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Jean, J.-S., Reddy, A.S., Fan, C.-W., Pan, K.-Y., Liu, H.-T., Chen, J.-L., 2009. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *J. Power Sources* 190, 258–263. doi:10.1016/j.jpowsour.2009.01.019
- Nimje, V.R., Chen, C.C., Chen, H.R., Chen, C.Y., Tseng, M.J., Cheng, K.C., Shih, R.C., Chang, Y.F., 2012. A single-chamber microbial fuel cell without an air cathode. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3933–3948. doi:10.3390/ijms13033933
- Nishio, K.W. and K., 2010. *Electric Power from Rice Paddy Fields, Paths to Sustainable Energy.* doi:10.5772/12929
- Nor, M.H.M., Mubarak, M.F.M., Elmi, H.S.A., Ibrahim, N., Wahab, M.F.A., Ibrahim, Z., 2015. Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge. *Bioresour. Technol.* 190, 458–465. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.103
- Panday, D., Schumann, P., Das, S.K., 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2632–2639. doi:10.1099/ijs.0.028407-0
- Pandit, S., Khilari, S., Roy, S., Ghangrekar, M.M., Pradhan, D., Das, D., 2015. Reduction of start-up time through bioaugmentation process in microbial fuel cells using an isolate from dark fermentative spent media fed anode. *Water Sci. Technol.* 72, 106–115. doi:10.2166/wst.2015.174
- Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G., Kim, M., Chang, I.S., Park, Y.K., Chang, H.I., 2001. A Novel Electrochemically Active and Fe ( III ) -reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Scanning* 7, 297–306. doi:10.1006/anae.2001.0399
- Parot, S., Nercessian, O., Delia, M.L., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Electrochemical checking of aerobic isolates from electrochemically active biofilms formed in compost. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1350–1359. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04103.x
- Patil, S.A., Harnisch, F., Kapadnis, B., Schröder, U., 2010. Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm formation and performance. *Biosens. Bioelectron.* 26, 803–808. doi:10.1016/j.bios.2010.06.019
- Pham, C.A., Jung, S.J., Phung, N.T., Lee, J., Chang, I.S., Kim, B.H., Yi, H., Chun, J., 2003. A novel

- electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 129–134. doi:10.1016/S0378-1097(03)00354-9
- Pham, T.H., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schampelaire, L., Vanhaecke, L., De Maeyer, K., Höfte, M., Verstraete, W., Rabaey, K., 2008. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1119–1129. doi:10.1007/s00253-007-1248-6
- Pham, T.H., Jang, J.K., Moon, H.S., Chang, I.S., Kim, B.H., 2005. Improved performance of microbial fuel cell using membrane-electrode assembly. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 438–441.
- Phung, N.T., Lee, J., Kang, K.H., Chang, I.S., Gadd, G.M., Kim, B.H., 2004. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 77–82. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.041
- Pierra, M., Carmona-Martínez, A.A., Trably, E., Godon, J.J., Bernet, N., 2015a. Microbial characterization of anode-respiring bacteria within biofilms developed from cultures previously enriched in dissimilatory metal-reducing bacteria. *Bioresour. Technol.* 195, 283–287. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.010
- Pierra, M., Carmona-Martínez, A.A., Trably, E., Godon, J.J., Bernet, N., 2015b. Specific and efficient electrochemical selection of *Geothalkalibacter subterraneus* and *Desulfuromonas acetoxidans* in high current-producing biofilms. *Bioelectrochemistry* 106, 221–225. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.02.003
- Potter, M.C., 1911. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc. R. Soc. London* 84, 260–276. doi:10.1098/rspb.1911.0073
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, W., 2004. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5373–5382. doi:10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004
- Rabaey, K., Rodríguez, J., Blackall, L.L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W., Nealon, K.H., 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J.* 1, 9–18. doi:10.1038/ismej.2007.4
- Rabaey, K., Verstraete, W., 2005. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23, 291–298. doi:10.1016/j.tibtech.2005.04.008
- Rasmussen, M., Minter, S.D., 2015. Long-term arsenic monitoring with an *Enterobacter cloacae* microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry* 106, 207–212. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.03.009
- Reimers, C.E., Girguis, P., Stecher, H.A., Tender, L.M., Ryckelynck, N., Whaling, P., 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4, 123–136. doi:10.1111/j.1472-4669.2006.00071.x
- Reimers, C.E., Tender, L.M., Fertig, S., Wang, W., 2001. Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environ. Sci. Technol.* 35, 192–195. doi:10.1016/j.jpowsour.2008.06.079
- Ringelberg, D.B., Foley, K.L., Reynolds, C.M., 2011. Electrogenic capacity and community composition of anodic biofilms in soil-based bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1805–1815. doi:10.1007/s00253-011-3264-9
- Rosenbaum, M., Angenent, L.T., 2009. Genetically modified microorganisms for bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemical Syst. from Extracell. electron Transf. to Biotechnol. Appl.* 101–113.
- Rosenbaum, M., Zhao, F., Quaas, M., Wulff, H., Schröder, U., Scholz, F., 2007. Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Appl. Catal. B Environ.* 74, 261–269. doi:10.1016/j.apcatb.2007.02.013
- Rubaba, O., Araki, Y., Yamamoto, S., Suzuki, K., Sakamoto, H., Matsuda, A., Futamata, H., 2013. Electricity producing property and bacterial community structure in microbial fuel cell equipped with membrane electrode assembly. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 106–113. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.019
- Ryckelynck, N., Stecher, H.A., Reimers, C.E., 2005. Understanding the anodic mechanism of a seafloor fuel cell: Interactions between geochemistry and microbial activity. *Biogeochemistry* 76, 113–139. doi:10.1007/s10533-005-2671-3
- Scott, K., J. Philips, Verbeeck, K., Rabaey, K., Arends, J.B.A., Dumitru, A., Bajracharya, S., ElMekawy, A., Srikanth, S., Pant, D., Premier, G.C., Michie, I.S., Boghani, H.C., Fradler, K.R., Kim, J.R., Gude, V.G., Cotterill, S., Heidrich, E., Curtis, T., Yu, E.H., Di Lorenzo, M., I. Ieropoulos, J. Winfield, I. Gajda, A. Walter, G.P., Jimenez, I.M., Pasternak, G., You, J., Tremouli, A., Stinchcombe, A., Forbes, S., Greenman, J., 2016. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and applications*, Woodhead Publishing Series in Energy. doi:10.1016/B978-1-78242-375-1.00012-5
- Scott, K., Yu, E.H.E., Ghangrekar, M.M., Erable, B., Duteanu, N.M., 2012. 4.11 – Biological and

- Microbial Fuel Cells. *Compr. Renew. Energy* 4, 277–300. doi:10.1016/B978-0-08-087872-0.00412-1
- Sudek, L.A., Wanger, G., Templeton, A.S., Staudigel, H., Tebo, B.M., 2017. Submarine basaltic glass colonization by the heterotrophic Fe(II)-oxidizing and siderophore-producing deep-sea bacterium *Pseudomonas stutzeri* VS-10: The potential role of basalt in enhancing growth. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.00363
- Sun, G., Thygesen, A., Meyer, A.S., 2015. Acetate is a superior substrate for microbial fuel cell initiation preceding bioethanol effluent utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4905–4915. doi:10.1007/s00253-015-6513-5
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Electroactive bacteria-molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-014-6005-z
- Tender, L.M., Gray, S.A., Groveman, E., Lowy, D.A., Kauffman, P., Melhado, J., Tyce, R.C., Flynn, D., Petrecca, R., Dobarro, J., 2008. The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J. Power Sources* 179, 571–575. doi:10.1016/j.jpowsour.2007.12.123
- Touzel, J.P., Albagnac, G., 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC 3. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 241–245. doi:10.1111/j.1574-6968.1983.tb00295.x
- Ueno, Y., Kitajima, Y., 2014. Suppression of Methane Gas Emissions and Analysis of the Electrode Microbial Community in a Sediment-Based Bio-Electrochemical System. *Adv. Microbiol.* 252–266.
- Uría, N., Muñoz Berbel, X., Sánchez, O., Muñoz, F.X., Mas, J., 2011. Transient storage of electrical charge in biofilms of *Shewanella oneidensis* MR-1 growing in a microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10250–10256. doi:10.1021/es2025214
- Vandecastelaere, I., Nercessian, O., Faimali, M., Segart, E., Mollica, A., Achouak, W., De Vos, P., Vandamme, P., 2010. Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm. *Bioelectrochemistry* 78, 62–66. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.07.004
- Wang, H., Park, J., Ren, Z.J., 2015. Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3267–3277. doi:10.1021/es5047765
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.001
- Watson, V.J., Logan, B.E., 2010. Power production in MFCs inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 489–498. doi:10.1002/bit.22556
- Williams, K.H., Nevin, K.P., Franks, a, Englert, a, Long, P.E., Lovley, D.R., 2010. Electrode-based approach for monitoring *in situ* microbial activity during subsurface bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 47–54. doi:10.1021/es9017464
- Wrighton, K.C., Thrash, J.C., Melnyk, R.A., Bigi, J.P., Byrne-Bailey, K.G., Remis, J.P., Schichnes, D., Auer, M., Chang, C.J., Coates, J.D., 2011. Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7633–7639. doi:10.1128/AEM.05365-11
- Xu, Q., Sun, J., Hu, Y. you, Chen, J., Li, W. jun, 2013. Characterization and interactions of anodic isolates in microbial fuel cells explored for simultaneous electricity generation and Congo red decolorization. *Bioresour. Technol.* 142, 101–108. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.025
- Xu, S., Liu, H., 2011. New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1108–1115. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05129.x
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2016. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijsem.0.001755
- Yoon, S.M., Choi, C.H., Kim, M., Hyun, M.S., Shin, S.H., Yi, D.H., Kim, H.J., 2007. Enrichment of electrochemically active bacteria using a three-electrode electrochemical cell. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 110–115.
- Zabihallahpoor, A., Rahimnejad, M., Talebnia, F., 2015. Sediment microbial fuel cells as a new source of renewable and sustainable energy: present status and future prospects. *RSC Adv.* 5, 94171–94183. doi:10.1039/C5RA15279H
- Zhang, J., Zhang, E., Scott, K., Burgess, J.G., 2012. Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2984–2992. doi:10.1021/es2020007
- Zhao, F., Slade, R.C.T., Varcoe, J.R., 2009. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1926–1939. doi:10.1039/b819866g
- Zhao, Q., Li, R., Ji, M., Ren, Z.J., 2016. Organic content influences sediment microbial fuel cell performance and community structure. *Bioresour. Technol.* 220, 549–556.

doi:10.1016/j.biortech.2016.09.005

Zhi, W., Ge, Z., He, Z., Zhang, H., 2014. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresour. Technol.* 171, 461–468.

doi:10.1016/j.biortech.2014.08.096

Zhu, L., Chen, H., Huang, L., Cai, J., Xu, Z., 2011. Electrochemical analysis of *Clostridium propionicum* and its acrylic acid production in microbial fuel cells. *Eng. Life Sci.* 11, 238–244.

doi:10.1002/elsc.201000220

## ANEXO

---

### Anexo 1. Monitoreo de las SMFC R

Se construyeron tres SMFC (R1, R2 y R4) y tres controles (RC3, RC5 y RC6). Al día 12 se cerró el circuito para las SMFC con un valor mínimo de 600 mV en ese período. Los controles se monitorearon en circuito abierto con un valor promedio de  $553 \pm 59$  al día 65. Al igual que lo observado con las otras SMFC SL, la dispersión de los datos durante el monitoreo fue muy alta (Figura A1).

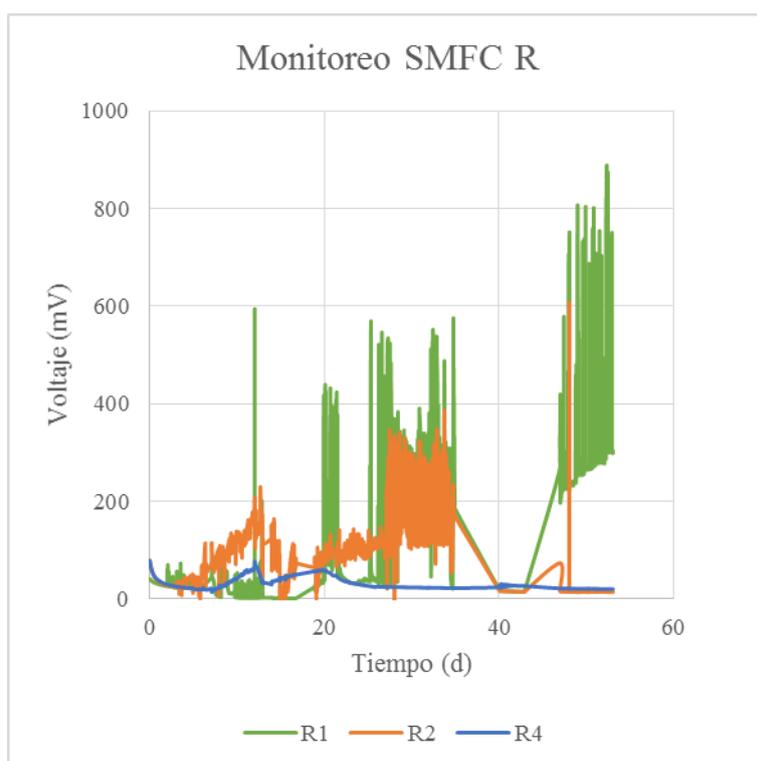


Figura A1. Voltaje registrado para la segunda tanda de celdas de sedimento de laguna de Rocha (R) en modo circuito cerrado con una resistencia externa de  $470 \Omega$ .

Tabla A1. Performance de las SMFC. (R1, R2 y R4) período de monitoreo de 53 días.

	<b>Voltaje promedio (mV)</b>	<b>Densidad de corriente promedio (mA/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>)</b>
<b>R1</b>	121,9 ± 142,8	41,5 ± 48,6	5059
<b>R2</b>	89,3 ± 72,7	30,4 ± 24,8	2715
<b>R4</b>	30,9 ± 12,3	10,5 ± 4,2	325

## Anexo 2. Cronoamperometría de los ánodos de las SMFCs R1 y R2.

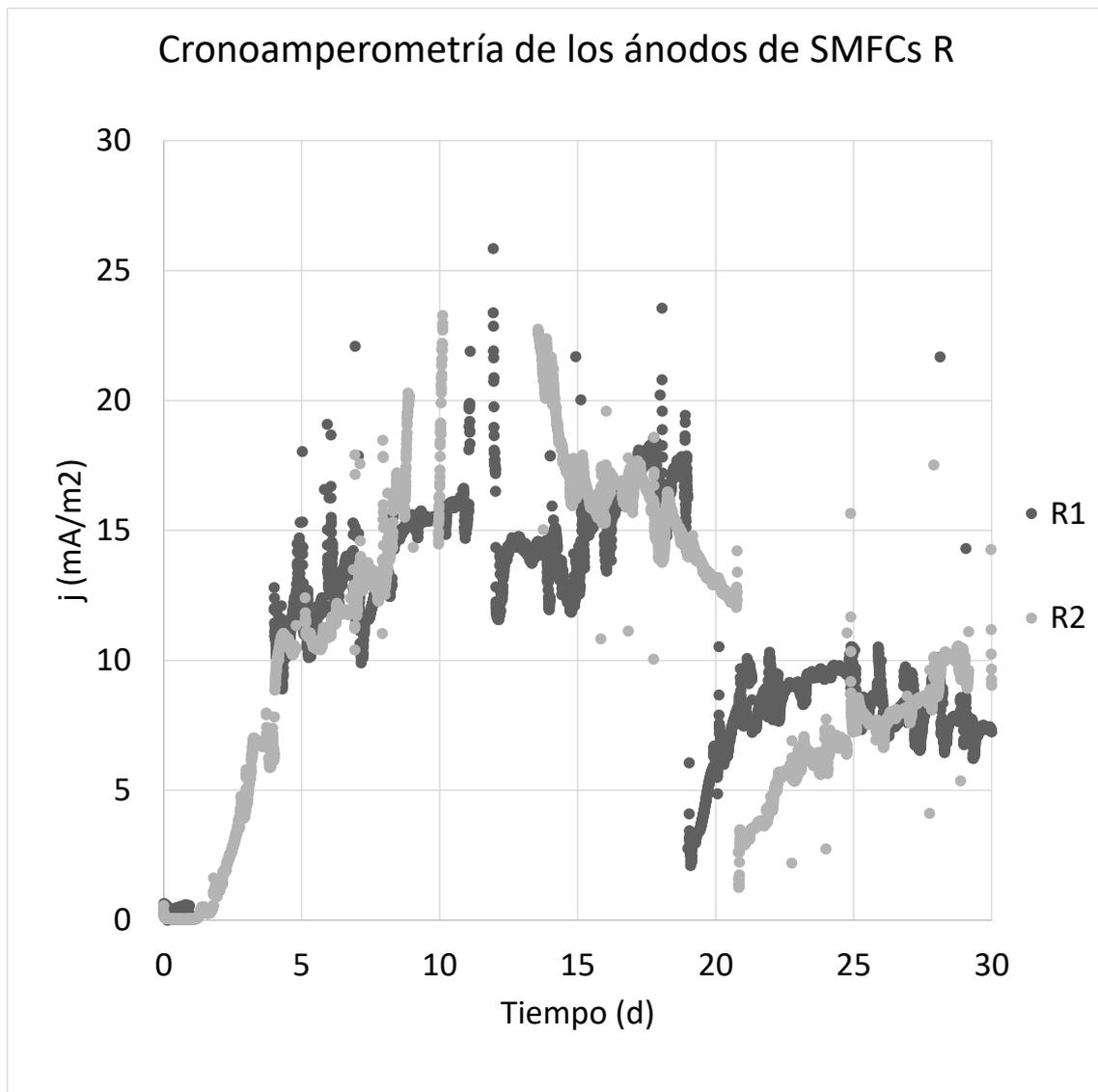


Figura A2. Cronoamperometría de los ánodos R1 y R2. Cambio del medio base, al día 19 para R1 y al día 21 – R2).

Tabla A2. Performance de la celda de tres electrodos. Voltaje +0,2 V vs Ag/AgCl

	Densidad de corriente promedio (mA/m <sup>2</sup> )	Densidad de corriente promedio (μA/cm <sup>2</sup> )
R1	11,2 ± 4,2	1,1 ± 0,4
R2	10,1 ± 5,5	1,0 ± 0,6
Celda control (Kato et al. 2010)		1

Tabla A2.1. Muestra a partir de la cual se realizó el aislamiento de la cepa

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Toma de alícuota (día)</b>
<b>DE2</b>	R2	11
<b>DE3</b>	R2	11
<b>DE4</b>	R2	20
<b>DE5</b>	R2	11
<b>DE6</b>	R1	10
<b>DE7</b>	R1	10

### Anexo 3. Afiliación filogenética de la cepa DE1

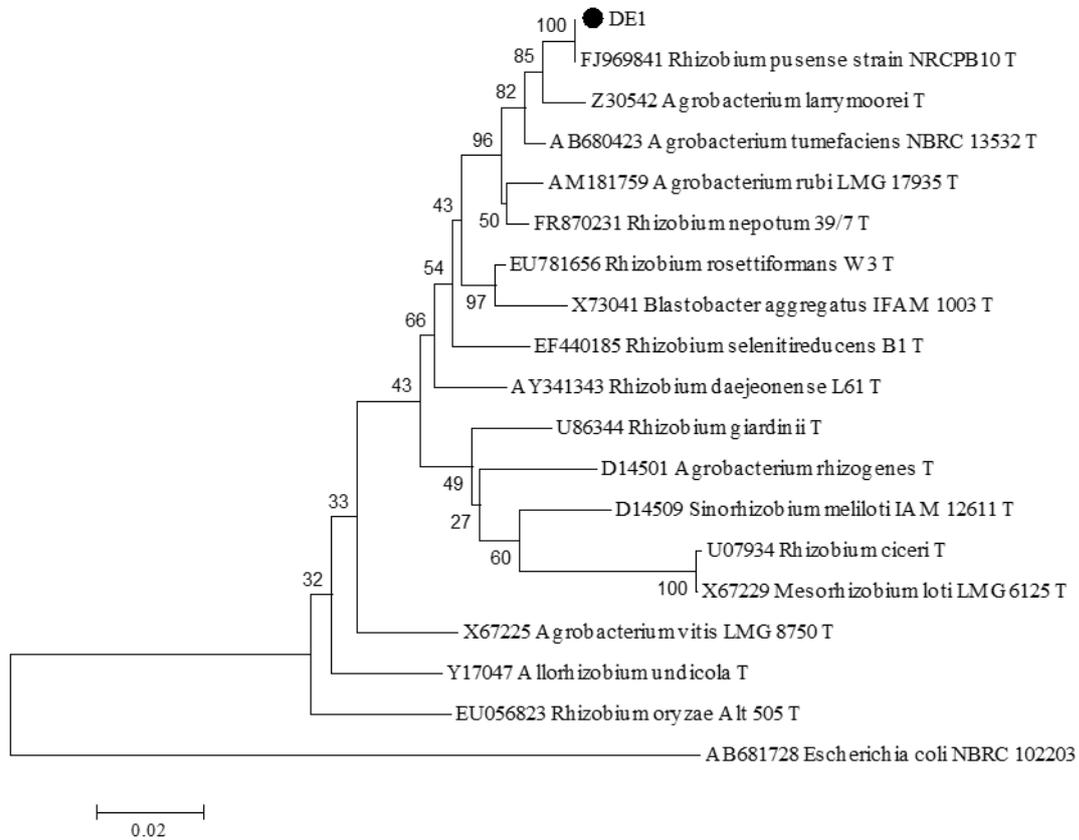


Figura A3. Afiliación filogenética del gen ARNr 16S de la cepa DE1. El análisis comprendió 19 secuencias con tamaño final de 1008 nucleótidos. Se utilizó el método de Neighbour-Joining y los valores de Bootstrap se obtuvieron a partir de 1.000 repeticiones. La escala representa el 2% de divergencia de la secuencias. Se indican los números de acceso GenBank de las secuencias de referencia. (●) Cepa aislada de SMFC en este trabajo

## Anexo 4. Cronoamperometría y Voltamperometría cíclica de *S.oneidensis*

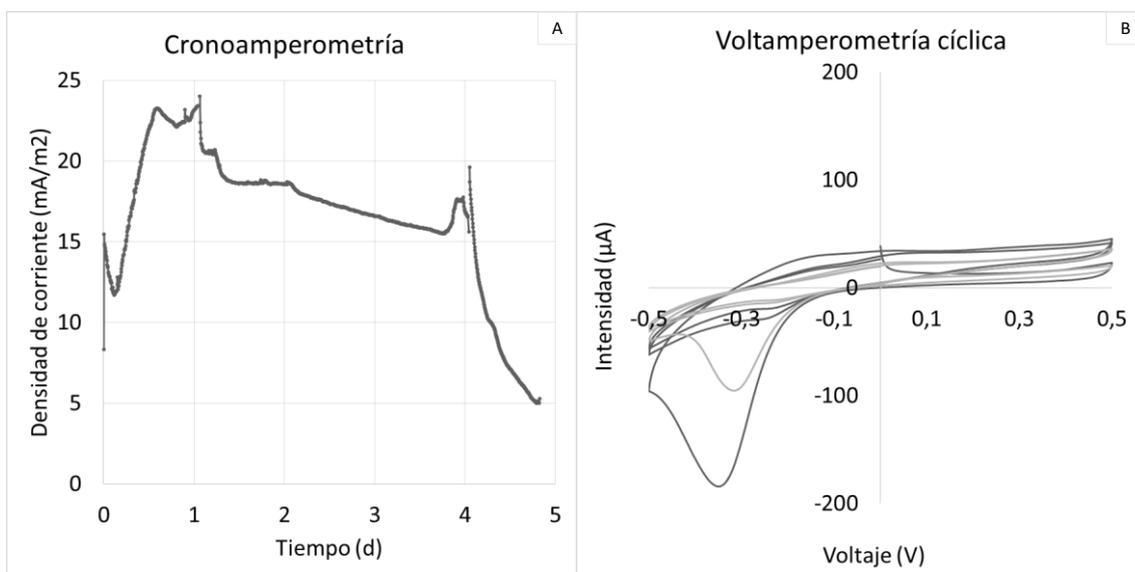


Figura A4. (A) Cronoamperometría *S.oneidensis* (+0,2V vs Ag/AgCl). (B) Voltamperometría cíclica de *S.oneidensis* (-0,5V a 0,5V vs Ag/AgCl).

## **Anexo 5. Método de la ferrozina modificado de Lovley and Phillips, 1986**

### Protocolo

- 1-. Preparar una solución de ferrozina de 1 g/L en buffer HEPES 50 mM, ajustar a pH 7.
- 2- En un tubo eppendorf de 1,5 mL preparar la solución E1: 0,1 mL de muestra o estándar en 0,9 mL de HCl 0,5N e incubar 15 minutos.
- 3- En un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio preparar la solución E2: 200 uL de la solución de ferrozina y 1 mL agua destilada.
- 4- Homogenizar la solución E1 (vortexear 10s) y agregar 20 uL de E1 a E2 (E3).
- 5- Homogenizar la solución E3 (vortexear 10s) y medir la absorbancia a 562 nm.

Solución patrón con  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{FeCl}_3$  en HCl 0,5N.

Rango de cuantificación: 5,0 – 20,0 mM de Fe (II).

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

### S1. Tamaño de las lecturas obtenidas por pirosecuenciación

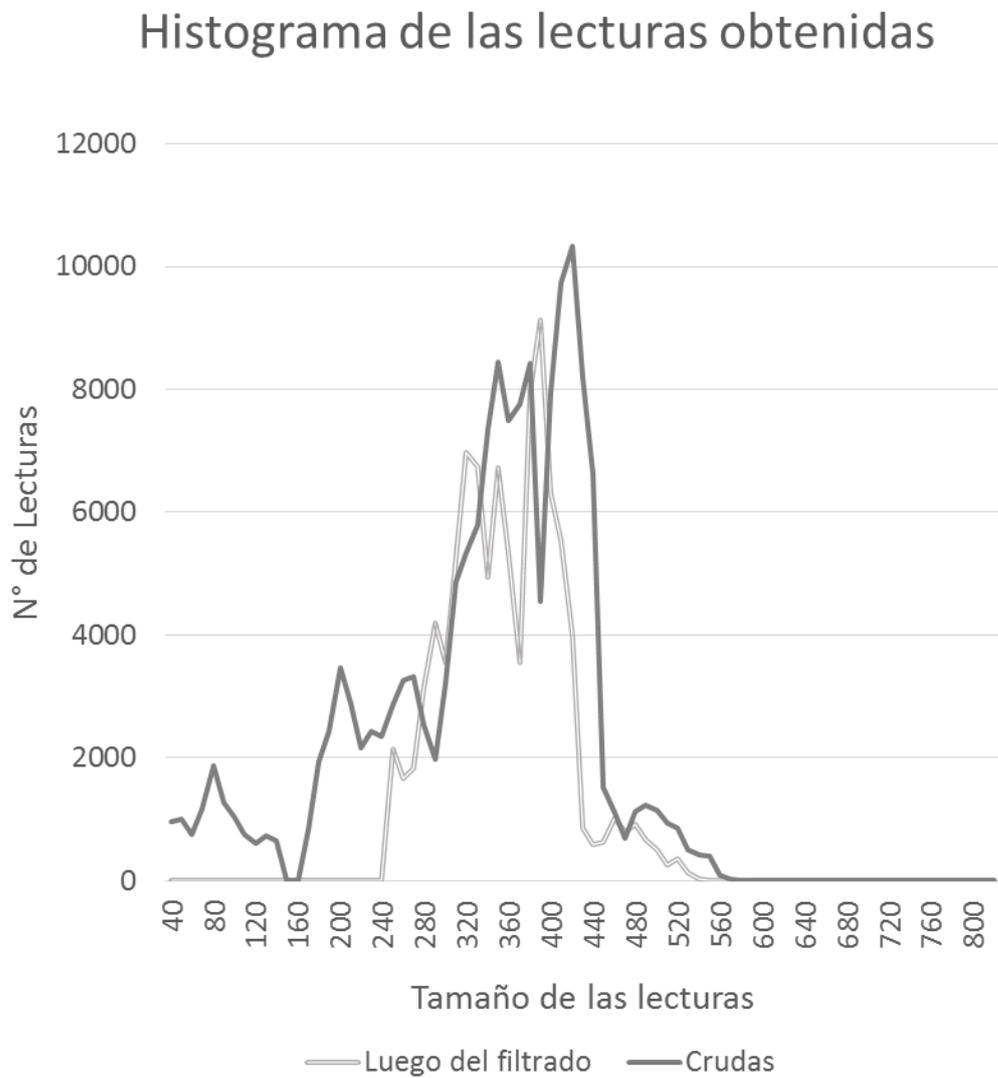


Figura S1. Distribución de las lecturas obtenidas por pirosecuenciación por tamaño. Total de lecturas crudas = 159351. Total de lecturas luego del tratamiento de datos = 95740

## S2. Curvas de Rarefacción para las muestras analizadas

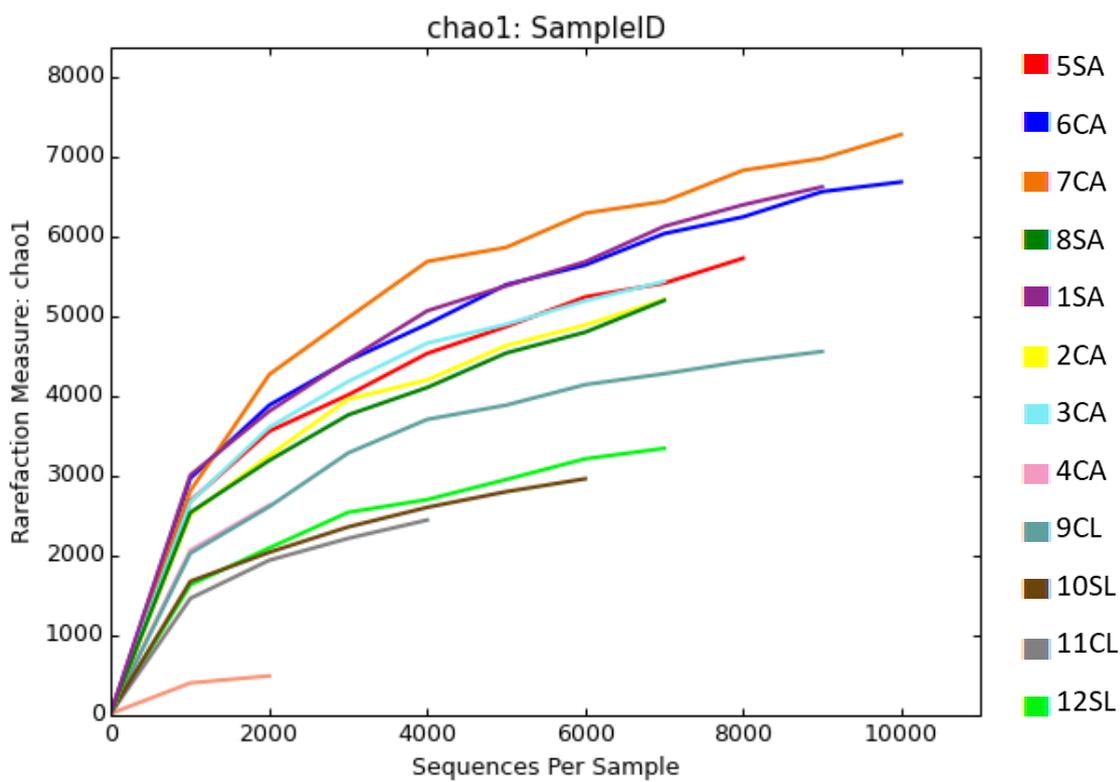


Figura S2. Curva de rarefacción para cada muestra en base al índice de Chao. Número de lecturas analizadas por muestra ver Tabla 6.