

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencia

Escuela de Química

**Búsqueda de bacterias electrogénicas en celdas de combustible
microbiano a partir de miel de café.**

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito para optar por el grado de

Licenciatura en Química

Joice Y. Castro Alvarez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San Pedro, San José Costa Rica

2019

A mi Dios por darme fortaleza...

*"No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque
yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre*

te sustentaré con la diestra de mi justicia"

Isaías 41:10

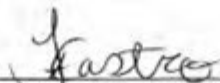
A mis padres por ser mi pilar...

A mi hermano por su sacrificio...

A mi novio por su incondicionalidad...

“Este trabajo final de investigación fue aceptado por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación e Investigación de la Escuela de Química, como requisito para optar al grado y al título de Licenciatura en Química”.

Postulante:



Joice Y. Castro Alvarez

Tribunal Evaluador


Dr. Cristian Campos Fernández

Director Escuela Química

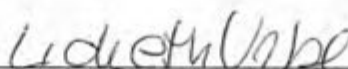
Presidente del Tribunal



M. Sc. Paola Fuentes Schweizer

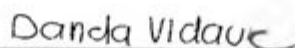
Directora del Trabajo Final de

Graduación




Dra. Lidieth Uribe Lorío

Integrante del Comité Asesor



M. Sc. Daniela Vidaurre Barahona

Integrante del Comité Asesor


Dr. Jean Sanabria Chinchilla

Miembro del Tribunal

Agradecimientos

Infinitas gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí por darme serenidad en los momentos críticos e inteligencia en el proceso. A mi familia por su sacrificio y apoyo incondicional.

Especial agradecimiento a mis profesoras Paola, Lidieth y Daniela, por su respaldo, por la oportunidad que me brindaron, por confiar en mí; su ayuda y enseñanzas en este camino fue invaluable.

Por supuesto a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en la elaboración de los experimentos; a Diego, por ser incondicional e incansable; a Rebeca, por su disposición y trabajo; a Mariana por su ayuda. Al personal del CIA, CIBCM y CELEQ por su colaboración en la ejecución de este proyecto y a la Universidad por los recursos brindados.

Índice General

Resumen	xxii
1. Introducción	1
1. Antecedentes.....	5
2. Objetivos.....	11
Objetivo principal.....	11
Objetivos secundarios.....	11
3. Marco teórico	12
3.1 Celda de Combustible Microbiano (CCM).....	12
3.1.1 CCM de cámara simple.....	13
3.1.2 CCM de cámara doble.....	14
3.1.3. CCM apilable.....	15
3.2 Bacterias en la CCM.....	17
3.2.1Transferencia de electrones desde la bacteria hacia los electrodos	21
3.3 Bacterias del Ácido Láctico (BAL)	25
3.4 Bacterias de género <i>Enterobacter</i>	27
3.5 <i>Shewanella oneidensis</i>	29

3.6	Técnicas Moleculares para la identificación de bacterias	31
3.6.1.	Extracción de ADN.....	31
3.6.2.	Amplificación y secuenciación de ADN.....	32
4.	Metodología	34
4.1	Ubicación	34
4.2	Material Experimental	34
4.3	Diseño de experimentación	35
4.4	Aislamiento de microorganismos electrogénicos presentes en ánodos de Celdas de Combustible Microbiano	37
4.4.1	Implementación de las CCM con agua miel de desecho de café como sustrato	37
4.4.2	Aislamientos de bacterias presentes en ánodos de la CCM.	39
4.4.3.	Tinción de Gram.....	40
4.5	Identificación de las bacterias electrogénicas.....	40
4.5.1.	Extracción de ADN.....	41
4.5.2.	Amplificación de ADN.....	42
4.5.3	Secuenciación e identificación de ADN.....	43

4.6	Selección de cepas para pruebas en CCM.....	46
4.7	Pruebas de bacterias seleccionadas en CCM con agua miel de café	46
4.7.1	Inoculación e implementación de las CCM con las bacterias	47
4.7.2	Rendimiento de tratamiento biológico en pruebas de las bacterias en la CCM.....	52
4.7.3	Análisis de datos, rendimiento eléctrico.	56
4.8	Análisis estadístico	57
5.	Resultados y Discusión	59
5.1	Aislamiento de microorganismos electrogénicos presentes en los ánodos de las CCM.....	59
5.2	Identificación de bacterias aisladas de los electrodos de ánodo de CCM....	65
5.3	Selección de bacterias para la realización de pruebas en CCM	73
5.4	Valoración del efecto de inoculación de las bacterias en la CCM	75
5.4.1	Eficiencia del tratamiento biológico y eléctrico de la CCM	75

5.4.2 Efecto de la inoculación en la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.....	86
6. Conclusiones generales y Recomendaciones	92
7. Referencias	94
Anexos.....	109
Anexo 1. Fotografías de aislamientos obtenidos de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	109
Anexo 2. Resultados de amplificación de bacterias aislada por medio cadena de la Polimerasa (PCR).	117
Anexo 3. Resultado Filogenético preliminar para bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	118
Anexo 4. Resultados de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).	119
Anexo 5. Resultados de pruebas estadísticas.....	122
Resultados de Prueba t student realizadas para corriente máxima de los diferentes ensayos realizados	122
Resultados de Análisis de Varianza (Anova) realizadas para los diferentes parámetros analizados.	127

Apéndice	135
Apéndice A. Datos experimentales.....	135
Apéndice A.1. Datos de corridas de CCM con agua miel de café en pruebas con las bacterias II-1-b, II-C1-A y <i>Shewanella oneidensis</i>	135
Apéndice A2. Resultados de Análisis de Demanda Química de Oxígeno (DQO)..	162
Apéndice A3. Cálculo de eficiencia culombica y biológica de las CCM con agua miel de café.	165
Apendice B. Resultados de Secuenciación de bacterias.	171

Índice de Figuras.

Figura 1. Representación de detalles principales de una celda de combustible microbiano. (Elaboración personal ³).	13
Figura 2. Representación general de una CCM con diseño de una cámara simple. (Elaboración propia ⁵⁰).	14
Figura 3. Representación general de una CCM con diseño de cámara doble en forma de H. (Elaboración propia ⁵⁰)	15
Figura 4. Esquema de general de una CCM de diseño apilable. ⁵²	16
Figura 5. Representación esquemática del proceso de transferencia de electrones realizado por <i>Shewanella oneidensis</i> como producto de su respiración extracelular. ⁷⁴	30
Figura 6. Resumen esquemático de diseño experimental aplicado en el estudio.	36
Figura 7. Implementación de CCM con agua miel de café. A) CCM de dos compartimientos separada por una membrana de intercambio iónico. B) Celda blanco con buffer en el ánodo y cátodo. C) CCM con miel de café en el compartimiento del ánodo y buffer en el cátodo de la celda. D) Sistema utilizado para la implementación de las CCM con miel de café.	38
Figura 8. Esquema de proceso termociclador llevado a cabo para el PCR del gen ARN ribosomal 16S del ADN extraído.	42

Figura 9. Esquema del proceso de recuento empleado para determinar la cantidad de células inoculadas en las CCM.	49
Figura 10. Representación esquemática de proceso de recuento del electrodo del ánodo después del tratamiento en la CCM.	51
Figura 11. Imagen SEM de electrodo del ánodo de la CCM implementada con agua miel de café, para la observación cualitativa de la comunidad microbiana.	61
Figura 12. Bacterias cultivables extraídas de los electrodos de las celdas, para aislar las bacterias diferentes en apariencia.	62
Figura 13. Levadura aislada de electrodo de ánodo de CCM, aislamiento 2B ₂ -T (cuadro I). A) cultivo de levadura en medio MRS. B) Prueba de tinción de gram de aislamiento 2B ₂ -T.	63
Figura 14. Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA para bacteria II-1-b y especies de Enterobacter. Con <i>Xenorhabdus poinarii</i> DSM 4768 ^T como outgroup	71
Figura 15. Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA bacterias aisladas de ánodos de CCM con agua miel de café y especies de <i>Lactobacillus</i> . Con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 ^T como outgroup.	72
Figura 16. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel de café inoculada con II-1-b. A) con agua miel sin diluir. B) Con agua miel diluida.	77

Figura 17. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel de café inoculada con II-C1-A. A) con agua miel sin diluir. B) Con agua miel diluida.	78
Figura 18. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel de café sin diluir inoculada <i>Shewanella oneidensis</i>	79
Figura 19. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima generada en CCM con agua miel de café diluida inoculadas con II-1-b y II-C1-A.	80
Figura 20. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de corriente máxima generada en la CCM con sustrato de agua miel sin diluir inoculadas con II-1-b, II-C1-A y <i>Shewanella</i>	80
Figura 21. Comparación de la diferencia de la densidad de corriente máxima de las CCM con agua miel de café inoculadas con las bacterias seleccionadas.	81
Figura 22. Comparación del porcentaje de remoción de la carga orgánica en el tratamiento del agua miel de café en las CCM con las diferentes bacterias inoculadas.	83
Figura 23. Comparación de las eficiencias culombicas de las CCM con agua miel de café inoculada con las bacterias seleccionadas.....	84
Figura 24. Patrón de banda de PCR-DGGE de la región v3 de ADNr 16S de bacterias amplificadas con el par de cebadores 357FGC-518R. A) CCM inoculadas con II-1-b. B) CCM inoculadas con <i>Shewanella oneidensis</i>	88

Figura 25. Dendrograma de patrón de bandas obtenido a partir de DGGE basado en el región V3 de ADNr 16S de la comunidad microbiana (bacterias) presente en los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café. A) bandas del DGGE. B) CCM inoculadas con II-1-b. C) CCM inoculadas con <i>S. oneidensis</i> . Los perfiles se agruparon por correlación de Dice y el método de grupos de pares no ponderados por promedios aritméticos (UPGMA, por siglas en inglés).	90
Figura E1. Aislamiento II-1-b de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café	109
Figura E2. Bacteria II-C ₁ -A aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	109
Figura E3. Bacteria 1A2-P aislada de electrodo del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	110
Figura E4. Bacteria I-1-a aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	110
Figura E5. Bacteria I-2-c aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	111
Figura E6. Bacteria II-C ₂ -C aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	111
Figura E7. Aislamiento I-2-e de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	112

Figura E8. Aislamiento I-2-d de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	112
Figura E9. Aislamiento 2B ₂ -T de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	112
Figura E10. Aislamiento II-C ₁ -C de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.....	113
Figura E11. Aislamiento 2A ₂ -B de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	113
Figura E12. Aislamiento 1B-N de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	114
Figura E13. Aislamiento II-C ₂ -A de los electrodos de ánodo de la CCM con agua miel de café.....	114
Figura E14. Aislamiento II-C ₂ -B de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	114
Figura E15. Bacteria I-C ₁ aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	115
Figura E16. Bacteria II-C ₁ -B aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	115
Figura E17. Bacteria I-C ₂ aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.....	116

- Figura E18.** Productos de PCR obtenidos por medio de los Primers 27F y 1429R, purificado. Gel de agarosa al 1%, teñidos con Gel-Red (10000 X), corridos a 90V por 35 min. 117
- Figura E 19.** Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA bacterias aisladas de ánodos de CCM con agua miel de café y especies de *Lactobacillus*. Con *Lactococcus lactis* subp. *Cremoris* ATCC 19257^T como outgroup. 118
- Figura E20.** Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%. 122
- Figura E21.** Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A). Comparación de corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%. 123
- Figura E22.** Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%. 124
- Figura E23.** Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%. 125

- Figura E24.** Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Shewanella oneidensis*. Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%..... 126
- Figura E25.** Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima entre el electrodo control y el electrodo inoculado obtenidas en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis*. 127
- Figura E26.** Resultado de ANOVA realizado a la diferencia entre densidad corriente máxima del electrodo control y el electrodo inoculado obtenida en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis*..... 128
- Figura E27.** Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de DQO obtenida entre el electrodo control y electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis* 129
- Figura E28.** Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la eficiencia coulombica obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis* 130

Figura E29. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima obtenidas por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con <i>Enterobacter asburiae</i> (II-1-b) y <i>Lactobacillus harbinensis</i> (II-C1-A).....	131
Figura E30. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la densidad de corriente máxima obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con <i>Enterobacter asburiae</i> (II-1-b) y <i>Lactobacillus harbinensis</i> (II-C1-A).....	132
Figura E31. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la DQO obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con <i>Enterobacter asburiae</i> (II-1-b) y <i>Lactobacillus harbinensis</i> (II-C1-A).	133
Figura E32. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la eficiencia coulombica obtenida por el electrodo control y electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con <i>Enterobacter asburiae</i> (II-1-b) y <i>Lactobacillus harbinensis</i> (II-C1-A).	134
Figura A1. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>)	165
Figura A2. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con II-C1-A (<i>L. harbinensis</i>).	166

Figura A3. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con <i>Shewanella oneidensis</i>	166
Figura A4. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel diluida inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>).	167
Figura A5. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel diluida inoculada con II-C ₁ -A (<i>L. harbinensis</i>)	167
Figura A6. Muestra de calculo realizado para la determinar la eficiencia culombica, utilizando el control de la CCM con agua miel de café inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>).	168

Índice Cuadro.

Cuadro I. Residuos relacionados con el procesamiento del grano fresco de café. ¹¹ ...	3
Cuadro II. Diferentes sustratos utilizados en las CCM y densidad de corriente y densidad de potencia reportada.	7
Cuadro III. Ejemplo de microorganismos electrogénicas reportados en la literatura.	8
Cuadro IV. Descripción de experimentos realizados en la implementación de CCM con agua miel de café.	39
Cuadro V. Reactivos empleados para un volumen de reacción de PCR de 50 μ L.	43
Cuadro VI. Bacterias y números de accesión en GeneBank para el análisis de filogenético de las bacterias aisladas de los electrodos del ánodo de CCM con sustrato de agua miel de café.	45
Cuadro VII. Resumen de experimentos realizados para las pruebas de las bacterias seleccionadas.	50
Cuadro VIII. Experimentos realizados para el análisis del efecto de la inoculación en las CCM sobre la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.	54
Cuadro IX. Resultados de las pruebas de gram realizadas a los aislamientos bacterianos provenientes de los electrodos de los ánodos de las CCM implementadas con miel de café.	64

Cuadro X. Resultados de estudio de la homología de las bacterias aisladas mediante la secuencia del ADN del gen 16S ARNr obtenidos con la herramienta de BLAST de la NCBI.....	66
Cuadro XI. Resumen de resultado obtenidos en prueba t student para cada ensayo realizado al comparar la corriente máxima en el electrodo inoculado contra el electrodo control. Con un nivel de confianza de 95%.....	79
Cuadro A2. Resultados de análisis de pureza de especies amplificadas para secuenciación.	117
Cuadro B1. Datos de corriente en el tiempo de la ensayo de CCM con II-1-b inoculada.	135
Cuadro B2. Datos de corriente en el tiempo de la ensayo de CCM con II-C1-A (L. harbinensis) inoculada.....	144
Cuadro B3. Datos de corriente en el tiempo del ensayo de CCM con agua miel de café con <i>Shewanella oneidensis</i> inoculada.	153
Cuadro B4. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>).....	162
Cuadro B5. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-C1-A (<i>L. harbinensis</i>).....	163
Cuadro B6. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con <i>Shewanella oneidensis</i>	163

Cuadro B7. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>)	164
Cuadro B8. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con I-C1-A (<i>L. harbinensis</i>).....	164
Cuadro B9. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>), el DQO antes del tratamiento fue 52,25 g/L.	168
Cuadro B10. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-C1-A (<i>L.harbinensis</i>), el DQO antes del tratamiento fue 72,88 g/L.	169
Cuadro B11. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con <i>Shewanella oneidensis</i> , el DQO antes del tratamiento fue 46,517 g/L.....	169
Cuadro B12. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>), el DQO antes del tratamiento fue 4,44 g/L.	169
Cuadro B13. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (<i>E. asburiae</i>), el DQO antes del tratamiento fue 3,69 g/L.	170

Cuadro B14. Secuencias consenso de las bacterias extraídas de los electrodos del ánodo de las CCM en agua miel de café como sustrato.	171
---	------------

Resumen

El tratamiento de residuos de las distintas actividades agrícolas es de suma importancia para un adecuado manejo de los residuos generados por el sector agroindustrial. El procesamiento del grano del café genera gran cantidad de residuos, más de 300 000 toneladas anuales, entre esos residuos se encuentra el agua residual del proceso de beneficiado, que es conocida como agua miel, el cual contiene una alta carga orgánica y se compone mayormente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Una Celda de Combustible Microbiana (CCM) aprovecha el proceso de transformación de la materia orgánica que realizan algunas bacterias y que origina una corriente de electrones, para obtener energía eléctrica; con lo que puede además de ser un método de tratamiento biológico para el agua residual, generar un valor agregado al proceso.

El trabajo se centró en la búsqueda de bacterias electrogénicas, presentes en los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café, capaces de liberar electrones de los procesos de oxidación; además de estimar el efecto de su inoculación en la comunidad microbiana existente en el electrodo del ánodo y en el rendimiento eléctrico de la CCM.

Se colocó en el ánodo, de las CCM, agua miel de café en un sistema anaeróbico y amortiguador de sales de fosfato en el cátodo, se utilizó electrodos de grafito conectados por cables eléctricos a un registrador de datos. Se aislaron las bacterias

de los electrodos del ánodo, además se amplificó y secuenció el gen ARNr 16S para su identificación. De las nueve bacterias identificadas, ocho bacterias coincidieron con el género *Lactobacillus* y la otra fue homóloga a *Enterobacter*.

En el estudio de la inoculación; se empleó las bacterias II-1-b (*Enterobacter asburiae*), II-C₁-A (*Lactobacillus harbinensis*) y *Shewanella oneidensis* LGM 19005; se observó que la inoculación de la bacteria II-1-b generó un ligero cambio en la comunidad microbiana del electrodo del ánodo de la CCM.

En las CCM con agua miel sin diluir se obtuvo mayor corriente máxima en los electrodos inoculados que en el electrodo control, a diferencia de los ensayos con sustrato diluido. Sin embargo no se pudo comprobar el efecto de la inoculación de las diferentes especies en el rendimiento de la CCM. Por otro lado se obtuvo una remoción de la carga orgánica de entre 20-50% en un proceso de siete días de tratamiento, y una densidad de corriente máxima de 8,14 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

1. Introducción

La generación de energías limpias para la sostenibilidad de los procesos humanos y el tratamiento de residuos, que se producen en cantidades crecientes, son dos de los temas más significativos en la actualidad.

El tratamiento de residuos debe ser una prioridad en cada una de las áreas de desarrollo humano para corregir el desequilibrio causado por la falta de planes adecuados para la disposición y tratamiento de éstos. La mayoría de los residuos que se generan mundialmente son descartados sin un control apropiado y sin lograr un provecho de los mismos.

En la actualidad, se gestan iniciativas, con el empleo de la tecnología y el conocimiento científico, para lograr respuestas adecuadas que permitan darle una disposición correcta a los residuos y a la vez lograr generar un valor agregado a las empresas.

La biorremediación ha sido uno de los mecanismos que se ha implementado, en los que se aprovechan las características biológicas de plantas, hongos, microorganismos y enzimas para el tratamiento de desechos y de áreas contaminadas.^{1,2}

Las Celdas de Combustible Microbiano (CCM) son sistemas bioeléctroquímicos que permite la generación de electricidad, derivada de oxidación de la materia orgánica producto de la actividad metabólica de las bacterias, durante el tratamiento

de residuos. Una CCM normalmente comprende un ánodo y cátodo unidos por una membrana de intercambio o un puente salino además de un circuito eléctrico.³⁻⁵

Las condiciones de trabajo en las que se operan las CCM, como temperatura, acidez del medio o el sustrato (residuo a tratar) empleado, entre otros, son factores claves para un buen rendimiento eléctrico y un tratamiento eficiente de desecho en estos dispositivos.⁵⁻⁷ Sin embargo uno de los aspectos más relevantes, para una buena operación y un buen resultado, son las bacterias presentes en la CCM responsables del tratamiento biológico y de la generación de la corriente eléctrica; ya sea bacterias propias de los residuos a tratar o bacterias exógenas inoculadas para mejorar el proceso.^{6,7}

El tratamiento del agua residual producto de la actividad agrícola mediante el uso de CCM, es de gran importancia debido a que la industria agroalimentaria genera una gran cantidad de residuos, que deberían ser tratados para reducir la contaminación ambiental y darle un valor agregado al proceso.

En Costa Rica el sector agrícola representó 13,0% de los empleos para el tercer trimestre del año 2017⁸, actualmente este sector genera un 6% del producto interno bruto del país, por otro lado el Ministerio de Comercio Exterior indica que en el año 2016 las exportaciones del agro fueron un 27%; lo que hace de vital importancia un buen manejo de la actividad agraria, en lo que se incluye la correcta disposición de los residuos.⁹

La producción de café representa una de las principales actividades para la economía del país, al ser el tercer producto de exportación. En el periodo de cosecha 2015-2016 se produjeron 576 231 toneladas métricas de producto fresco, del cual solo el 18% del peso se traduce en grano tostado⁹, lo que deriva en gran cantidad de residuos (Cuadro I), por encima de 300 000 toneladas anuales,⁹ cuyo tratamiento es de gran relevancia.

Entre los residuos generados en el procesamiento del grano de oro, como es conocido el café, se encuentra el agua miel (Cuadro I), producidas en el despulpado y secado del grano, en el cual se concentran azúcares, restos de fibra y otras partículas pequeñas provenientes del café.^{10,11}

Cuadro I. Residuos relacionados con el procesamiento del grano fresco de café.¹¹

Residuo generado	Característica
Pulpa	Sólido generado del despulpado. Primer residuo generado
Mucílago	Hidrogel, generado por eliminación mucílago del grano
Agua miel residual	Agua utilizada para despulpar, generada en el secado del grano
Cascarilla	Endocarpio del fruto

Debido a que el agua miel residual que se produce en el proceso se genera en cantidades importantes, y se les debe dar un tratamiento adecuado, este proyecto

utilizó agua miel como sustrato en la CCM, para evaluar las bacterias electrogénicas aisladas presentes en el electrodo del ánodo de la CCM.

1. Antecedentes

Como parte de su actividad metabólica, bajo ciertas condiciones, algunos microorganismos liberan electrones, lo que posibilita la producción de electricidad. El primer reporte de la obtención de corriente eléctrica proporcionada por bacterias se remonta a 1910 por Michael Cresse Potter, investigador de la Universidad de Durham, quien observó un flujo de electrones liberado por la bacteria *Escherichia coli* cuando descomponía materia orgánica.¹²⁻¹⁴

Sin embargo la carencia de dispositivos electrónicos sensibles y la limitada proyección que se percibió de los sistemas bioeléctricos desaceleró las investigaciones en este campo por lo que en los posteriores 55 años se registraron pocos avances. Las primeras CCM se remontan a 1931 por Cohen y en 1962 por Davis y Yarborough quienes utilizaron mediadores de transporte de electrones como un medio para aumentar la potencia de salida.^{13,15}

A pesar de que en la década de los sesentas la investigación en este campo decayó considerablemente, tres décadas más tarde, la búsqueda de procesos que generen energías limpias y el progreso en el campo de la electrónica permitieron que los sistemas bioelectroquímicos volvieran a ser de interés. Esta situación se mantiene actualmente, debido al gran potencial de las CCM como método de producción de energía eléctrica durante el tratamiento de agua residual, sumado a la posibilidad de generación de energía limpia, sostenible y renovable.^{13,16}

La CCM es un dispositivo que puede producir electricidad directamente, a partir de la oxidación de la materia orgánica. Las CCM al ser en esencia una batería, biológica, consta de un ánodo y un cátodo; en el ánodo se presenta la oxidación de la materia orgánica en un sistema anaerobio, durante el proceso se liberan electrones que migran al cátodo de la celda, por los circuitos del sistema.³

Se ha utilizado una amplia variedad de sustratos en las CCM lo que ha generado una cantidad importante de evidencia sobre la viabilidad del uso de este tipo de celdas para la obtención de corriente eléctrica (Cuadro II)

Cuadro II. Diferentes sustratos utilizados en las CCM y densidad de corriente y densidad de potencia reportada.

Tipo de Sustrato	Densidad de corriente (mA/cm ²)	Densidad de potencia (mW/m ²)
Acetato	0,82 ¹⁷	2400 ¹⁷
Biomasa de tallos de maíz	0,15 ¹⁸	367 ¹⁸
Estiércol de granja	0,004 ¹⁹	10 ¹⁹
Galactiol	0,78 ²⁰	2650 ²⁰
Glucosa	0,70 ²¹	2160 ²¹
Ácido Glucorónico	1,18 ²¹	2770 ²¹
Agua residual de cervecería	0,2-0,18 ^{22,23}	-
Agua residual de industria de chocolate	0,302 ²⁴	1500 ²⁴
Agua residual de reciclaje de papel	0,25 ²⁵	-
Agua residual del procesamiento de carnes	0,115 ²⁶	-
Agua residual doméstica	-	28- 124 ²⁷⁻³⁰
Agua residual de la destilería de alcohol	0,23 ³¹	-

Varias bacterias tienen la capacidad de transferir los electrones, producto del metabolismo anaerobio de la materia orgánica, al electrodo del ánodo de la CCM (Cuadro III), en los últimos años ha aumentado el número de publicaciones que

discuten la detección e identificación de este tipo de microorganismos, ya sea como cultivos individuales o en consorcios bacterianos. Sedimentos marinos³², suelo, agua residual³³, sedimento de agua dulce y el lodo activado son fuentes ricas para estos microorganismos, y presenta el potencial uso de las CCM para la biorremediación de estos y otros tipos de ambientes.

Cuadro III. Ejemplo de microorganismos electrogénicas reportados en la literatura.

Microorganismo	Sustrato metabolizado
<i>Aeromonas hydrophila</i> ³⁴	Acetato
<i>Aeromonas genus</i> ³⁵	Glucosa, glutamato
<i>Arcobacter skirrowii</i> ³⁶	-
<i>Arcobacter butzleri</i> ³⁶	-
<i>Arcobacter cibarius</i> ³⁶	-
<i>Acetobacterium woodii</i> ³⁶	-
<i>Acetobacterium malicum</i> ³⁶	-
<i>Acetobacterium submarinu</i> ³⁶	-
<i>Enterobacter asburiae</i> ³⁵	Glucosa, glutamato
<i>Klebsiella oxytoca</i> ³⁵	Glucosa, glutamato
<i>Enterococcus faecium</i> ³⁷	Glucosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁷	Almidón, glucosa

Cuadro III. Continuación.

<i>Clostridium butyricum</i> ³⁴	Almidón, glucosa, lactato, melaza
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ³⁸	Sacarosa
<i>Erwinia dissolven</i> ³⁹	Glucosa
<i>Escherichia coli</i> ⁴⁰	Glucosa, Sacarosa
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ³⁶	Acetato
<i>Lactobacillus plantarum</i> ⁴¹	Glucosa
<i>Proteus vulgaris</i> ⁴²	Glucosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁷	Glucosa
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ⁴²	Glucosa, xilosa, sacarosa
<i>Shewanella oneidensis</i> ^{43,44}	Lactato
<i>Shewanella putrefaciens</i> ⁴⁵	Lactato, piruvato, acetato, glucosa
<i>Streptococcus lactis</i> ³²	Glucosa
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> ³²	-

En la biopelícula; que es una estructura formada sobre una superficie compuesta de un conjunto de microorganismos que generan una estructura de protección producto de sustancias secretadas por ellos mismos;⁴⁶ se ha documentado que las bacterias presentes en la biopelícula en el electrodo del ánodo, en la biopelícula (agregar que es), están estrechamente relacionadas con la generación

eléctrica de la CCM y el rendimiento culombico de ésta, de ahí la importancia del estudio de la composición bacteriana de la biopelícula del electrodo.⁴⁷⁻⁴⁹

2. Objetivos

Objetivo principal.

Evaluar la capacidad electrogénica de bacterias aisladas del proceso de descomposición de miel de café en celdas de combustible microbiano.

Objetivos secundarios

1. Aislar los microorganismos electrogénicos presentes en los ánodos de celdas microbianas.
2. Identificar los microorganismos electrogénicos aislados mediante técnicas moleculares.
3. Seleccionar tres de los aislamientos microbianos según su capacidad de generar energía eléctrica.
4. Valorar el efecto de la inoculación con los microorganismos aislados sobre la eficiencia de la celda.
5. Analizar la eficiencia del tratamiento biológico en el agua residual de la CCM a través la demanda química de oxígeno

3. Marco teórico

3.1 Celda de Combustible Microbiano (CCM)

La CCM es un dispositivo que puede captar los electrones generados por la oxidación de la materia orgánica o inorgánica como parte del proceso metabólico de los microorganismos y producir electricidad directamente; para transformar la energía química almacenada en los compuestos, a energía eléctrica al utilizar microorganismos como catalizadores bajo condiciones anaerobias.³⁻⁵

La CCM esencialmente consta del ánodo y del cátodo; en el ánodo se da la oxidación anaerobia de la materia orgánica y la transferencia de electrones al electrodo; los electrones son transportados a través de los circuitos eléctricos al cátodo (Figura 1). En el proceso también se da una producción de CO₂ y una transferencia de protones H⁺.³

La CCM se clasifica según sus características en tres categorías, CCM de cámara simple, CCM de cámara doble o CCM apilada; a pesar de esto todas las celdas comparten partes fundamentales que van a influir en el rendimiento de las celdas, como lo son los cables de conexión, los electrodos y el puente salino, éste último se puede sustituir por una membrana de intercambio iónico.^{3,4,50}

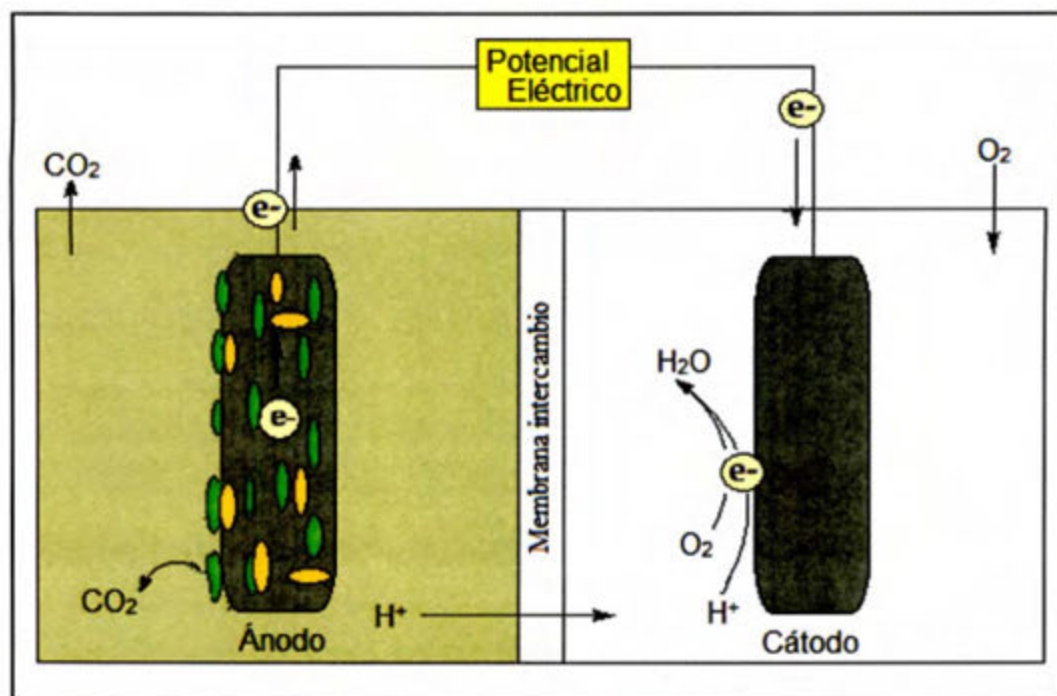


Figura 1. Representación de detalles principales de una celda de combustible microbiano. (Elaboración personal³).

3.1.1 CCM de cámara simple

A grandes rasgos esta celda se basa en un solo compartimiento en el que se encuentran el ánodo y el cátodo, en este tipo de sistemas el cátodo no posee un compartimiento definido y se presenta o no una membrana de intercambio de iones. Por lo general el cátodo está expuesto a la atmósfera de donde adquiere el oxígeno (Figura 2).^{50,51}

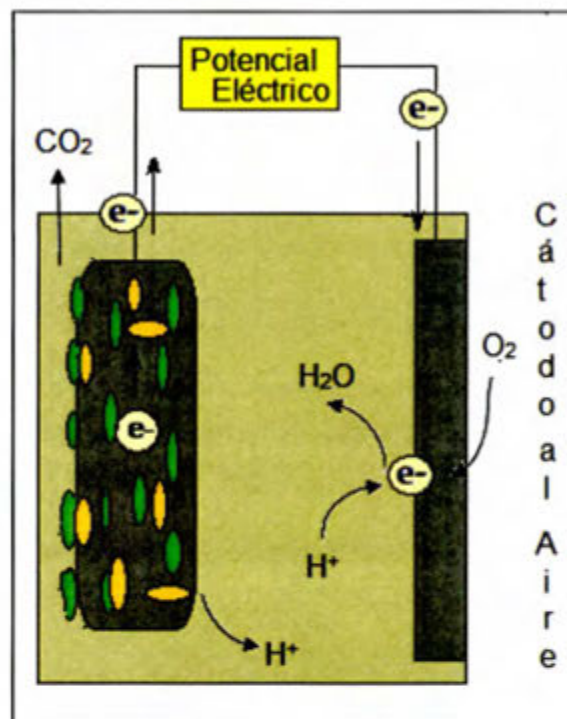


Figura 2. Representación general de una CCM con diseño de una cámara simple.

(Elaboración propia⁵⁰)

3.1.2 CCM de cámara doble

En este diseño la cámara del ánodo y el cátodo están en compartimentos separados, unidos por cables externos y un puente salino o membrana de intercambio iónico, el diseño más empleado es de tipo H (Figura 3). La cámara del ánodo al igual que en el caso anterior está en ambiente anaerobio y la cámara del cátodo en aerobiosis, el material del electrodo que se emplea normalmente es el grafito.⁵⁰

Este tipo de CCM es muy empleado en el análisis del rendimiento de nuevos materiales o de grupos de microorganismos encontrados en sustrato de diferentes orígenes.⁵⁰

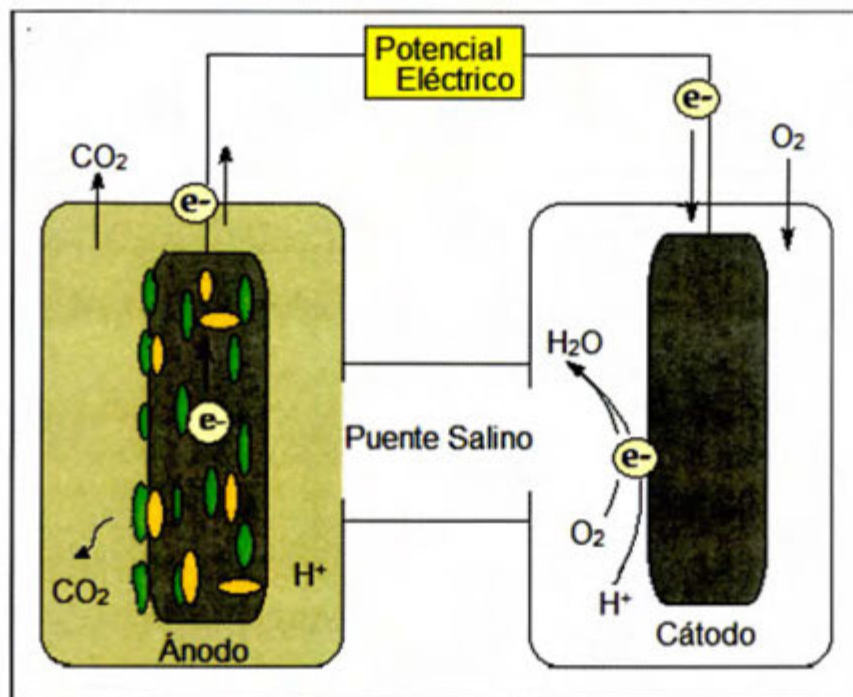


Figura 3. Representación general de una CCM con diseño de cámara doble en forma de H. (Elaboración propia⁵⁰)

3.1.3 CCM apilable

Una celda apilable se compone de varias unidades de CCM colocadas en serie, en las que se hace pasar el sustrato por cada una de ellas. Este diseño al ser un conjunto de pequeñas celdas presenta varios ánodos y cátodos que pueden estar conectados en sistemas eléctricos independientes o de forma paralela (Figura 4).

Generalmente se hace atravesar un flujo de sustrato por los compartimientos de la CCM.^{50,52}

A pesar de ser un diseño más complejo que podría entregar una fuerza de salida mayor, en sistemas a gran escala no presentan potenciales que compensen la inversión que se debe aplicar para vencer las resistencias propias, que con lleva la movilización de electrones y el transporte del líquido a través de las CCM.⁵²

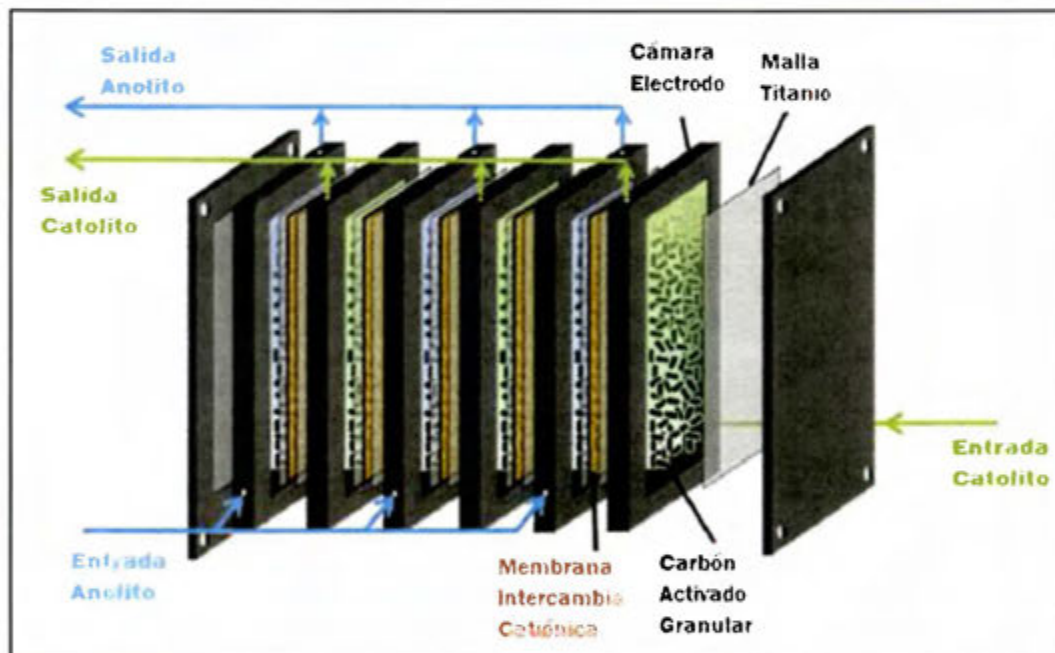


Figura 4. Esquema de general de una CCM de diseño apilable.⁵²

3.2 Bacterias en la CCM

Las bacterias son organismos protistas unicelulares, cuyo núcleo no posee una membrana que lo delimite por lo que el material genético se encuentra en el citoplasma de la célula, de igual manera las organelas presentes en el citoplasma no están rodeadas por membranas que las separen.^{46,53,54}

La morfología (forma) de las bacterias va estar definida por la membrana citoplasmática y la pared celular que presentan. La estructura de la membrana citoplasmática es básicamente una bicapa de fosfolípidos con moléculas de proteína incrustadas, que además de ser una barrera de transporte selectiva es un punto de replicación de ADN. La pared celular, compuesta por peptidoglucano, cumple la función de dar soporte rigidez y delimita la relación de la bacteria con su entorno.^{46,53,54}

En las bacterias el proceso de crecimiento se refiere al aumento de la masa celular que culmina en la división celular. El ciclo de crecimiento se puede dividir en etapas; una etapa inicial de adaptación, en esta fase no hay incremento de células; posteriormente se da un proceso exponencial, donde cada cierto tiempo la población se duplica; hasta llegar a una fase estacionaria donde el proceso de crecimiento se ve disminuido, por falta de nutrimentos, espacio o sustancias tóxicas en el medio; cuando la población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden

continuar vivas y seguir metabolizando, pero comienza una disminución progresiva en el número de células viables, entrado en la etapa de muerte.^{46,53,54}

Dado que a partir de cada célula se generan dos células hijas, la cantidad de bacterias que se pueden llegar a producir es muy grande, limitada por las condiciones del medio de crecimiento y el metabolismo celular de ésta, esto hace que en tan sólo 16 horas puedan generarse 5000 millones de bacterias.^{46,54,55}

El metabolismo bacteriano es la combinación de dos procesos fundamentales; por un lado las bacterias sintetizan los componentes para las funciones vitales (anabolismo) y por otro lado se da la degradación de los nutrientes (catabolismo) para convertirlos en compuestos precursores para la biosíntesis de moléculas más complejas y especializadas.^{46,54,55}

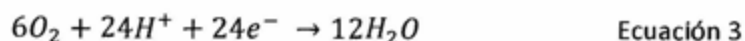
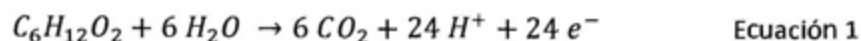
Los procesos catabólicos liberan la energía contenida en los nutrientes como resultado de reacciones de reducción y oxidación, en estos procesos se van a encontrar sustancias que ceden electrones y otras que los aceptan. La respiración y la fermentación son ejemplos de procesos donde se da la liberación de energía de los nutrientes para transformarlos en formas más útiles para las células.^{55,56}

En la fermentación un compuesto donador, un intermediario formado durante la degradación del sustrato, cede los electrones hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico, también generado durante el catabolismo del sustrato. En el caso de la respiración, el sustrato es oxidado completamente a dióxido

de carbono y agua, proceso en que interviene una cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana plasmática, donde el aceptor exógeno final puede ser el oxígeno molecular (proceso aerobio) u otro compuesto inorgánico (proceso anaerobio).^{55,56}

La energía liberada producto de las reacciones de reducción y oxidación tiene que ser almacenada y transportada de alguna manera. El transporte de energía se puede dar por medio de transportadores de electrones (carriers), asociados a la membrana, éstos tienen las funciones de aceptar electrones de un donador y cederlos a un aceptor, la energía se conserva, este proceso se da con el ATP como intermediario. Las enzimas NAD- deshidrogenasa, las flavoproteínas y citocromos son ejemplos de sistemas utilizados por las bacterias para el transporte de electrones.^{55,56}

La oxidación de una molécula como la glucosa, en el catabolismo microbiano, normalmente, se da en ausencia de oxígeno, y los electrones que se generan son tomados o absorbidos en un sitio activo de una enzima la cual va a servir como un intermediario de reducción (Ecuación [1] y [2]) produciéndose ATP el cual es utilizado para la generación de trabajo en la célula.^{5,6,55,56}



En una CCM, los electrones generados son desviados al electrodo por algún medio y se hacen pasar a través de los circuitos hacia el compartimiento del cátodo, para obtener energía eléctrica, además en el cátodo se da la formación de agua facilitada por los electrones extraídos (Ecuación 3, Figura 1)^{4,5}

Las reacciones del metabolismo utilizadas por las bacterias presentes en el ánodo van a determinar el potencial de salida de la CCM. Inicialmente se creía que la fermentación era la única ruta metabólica en que las bacterias liberaban electrones y se generaba la corriente en la CCM, sin embargo se han estudiado otras rutas metabólicas.^{4,5}

La fermentación por sí sola no es eficiente para la generación de electricidad ya que las sustancias producidas, la mayoría de veces, no son compatibles con los electrodos lo que impide una buena transferencia de los electrones, sin embargo esta ruta metabólica es necesaria para procesos más efectivos, como el óxido-reductor, que depende de los productos de fermentación para llevarse a cabo.⁴⁻⁶

El potencial de salida del ánodo es dependiente de la ruta metabólica utilizada por las bacterias, presentes en la CCM, para degradar el sustrato. Se pueden presentar rutas metabólicas como el alto metabolismo oxidativo redox, el metabolismo oxidativo redox medio a bajo; y fermentación, lo que implica bacterias aerobias, anaerobias y facultativas.^{4,6}

Cuando se presenta un potencial anódico alto, las bacterias utilizan, en su mayoría, la cadena respiratoria en un metabolismo oxidativo. Los electrones y, concomitantemente, los protones pueden transportarse a través de la NADH deshidrogenasa, la ubiquinona, la coenzima Q o el citocromo. Los procesos que usan la fosforilación oxidativa se han observado regularmente en CCM, con la producción de altas eficiencias energéticas de hasta un 65%.^{4,6}

3.2.1 Transferencia de electrones desde la bacteria hacia los electrodos

Para que se dé la transferencia de electrones de las bacterias a los electrodos se necesita de un sistema que lo propicie. Este transporte puede ser facilitado por la misma maquinaria genética que poseen los microorganismos o por sistemas exógenos, se han propuesto cuatro métodos de transferencia de electrones que pueden ser empleados por las bacterias en las CCM. De una buena transferencia de electrones va a depender el rendimiento eléctrico de la CCM.^{5,6,57,58}

3.2.1.1 Transferencia directa

Aunque la transferencia de los electrones a los electrodos del ánodo por parte de las bacterias de forma directa no es un proceso común, bacterias como *Shewanella putrefaciens* y bacterias de la familia *Geobacteraceae* entre otras han mostrado la capacidad de transferir electrones sin la necesidad de utilizar mediadores o producto reducido.^{5,6,57,58}

Para que la transferencia de los electrones ocurra de manera directa se debe dar un contacto entre la membrana bacteriana y la superficie del electrodo, lo cual se puede llevar a cabo mediante la presencia de complejos proteicos intermembranales, como pilus bacterianos u otros instrumentos de comunicación física que poseen las células.^{5,6,57,58}

3.2.1.2 Transferencia indirecta por productos reducidos.

Uno de los mecanismos propuestos que permite que las bacterias transfieran los electrones al electrodo, es la participación de compuestos o productos bacterianos en forma reducida, que salen del interior de la célula y al entrar en contacto con la superficie del electrodo se oxida, por la liberación de los electrones.^{5,6,57,58}

Sin embargo, estos procesos son inherentemente ineficientes para la producción de electricidad ya que muchos productos de fermentación bacteriana, incluidos los ácidos orgánicos, reaccionan muy lentamente con los electrodos o no lo hacen. Aunque se pueden modificar los electrodos con el propósito de que reaccionen con mayor facilidad con los metabolitos de las bacterias, los electrodos se llegan a recubrir de productos oxidados lo que limita la transferencia de los electrones.^{5,6,57,58}

3.2.1.3 Transporte a través de mediadores propios de los microorganismos

Los mediadores son compuestos o metabolitos que se producen en la célula con el fin de facilitar el movimiento de los electrones, las fenanzinas, fenotiazinas y fenoxazinas son ejemplos de este tipo de compuestos.^{5,6,57,58}

La utilización de metabolitos para el transporte de electrones se ha observado en bacterias como *Shewanella oneidensis*, *Geothrix fermentans* y *Pseudomonas*. Sin embargo la síntesis de estos biotransportadores por parte de las bacterias, implica un gasto energético alto y son producidos en casos de necesidad, por ejemplo en un ambiente de gran desventaja competitiva.^{5,6,57,58}

3.2.1.4 Transporte por mediadores artificiales

Existen bacterias que son incapaces de transferir los electrones generados en su proceso metabólico a los electrodos del ánodo de la CCM, en estos casos la utilización de mediadores exógenos es importante para lograr el funcionamiento eléctrico de la CCM.^{5,6,57,58}

Los mediadores artificiales son compuestos químicos que ofrecen a la bacterias la posibilidad de generar, compuestos reducidos más activos electroquímicamente que muchos productos de fermentación. Estos compuestos son capaces de atravesar la membrana celular donde aceptan los electrones de los

portadores de la célula bacteriana, el mediador se reduce, se traslada fuera de la célula y transfiere los electrones a la superficie del ánodo.^{5,6,57,58}

Los mediadores deben poseer varias características para un transporte de electrones eficiente; la capacidad de cruzar fácilmente la membrana celular, así como de atrapar electrones a partir de las cadenas de transporte de electrones, poseer una alta velocidad de reacción del electrodo y tener una buena solubilidad. Además no debe ser biodegradable ni tóxico para los microorganismos, y su costo económico de ser bajo.^{5,6,57,58}

Entre los compuestos más utilizados en las CCM como mediadores artificiales se encuentran la tionina; dicloruro de 1,1'-dibencil-4,4'-bipiridinio; 2,6-diclorofenolindofenol; 2-hidroxi-1,4-naftoquinina; y diversas fenanzinas, fenotiazinas; fenoxazinas; quelatos de hierro y rojo neutro.^{5,6,57,58}

3.3 Bacterias del Ácido Láctico (BAL)

Los *Lactobacillus*, junto con bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) o lactobacilos. Las bacterias del grupo BAL se definen como bacterias en su mayoría Gram positivas, facultativas que fermentan azúcares para producir ácido láctico principalmente. El grupo (BAL) ha sido estudiado debido a su capacidad de conservación de alimentos y bebidas.⁵⁹

Estas bacterias son parte importante de la industria alimentaria, por años las bacterias BAL se han cultivado para realizar diferentes fermentaciones, se utilizan en la producción de vino, café, ensilaje, cacao, masa fermentada y numerosas fermentaciones de alimentos.⁵⁹

Los lactobacilos son parte de la microbiota del ser humano, en sistemas como digestivo, urinario y genital. Se establecen en mutualismo con plantas, animales y humanos, ya que brindan protección de patógenos y reciben nutrientes de estos.^{60,61}

Los lactobacilos pueden operar por medio de dos tipos de metabolismo, existen especies homofermentativas, que producen ácido láctico a partir de azúcares; y especies heterofermentativas, que producen alcohol o ácido láctico a partir de azúcares. Los lactobacilos a pesar de no poseer un sistema respiratorio como tal, que les permita la reducción del oxígeno, son tolerantes a él.⁶¹

El género *Lactobacillus* fue propuesto por primera vez en 1901, actualmente consta de más de 170 especies y subespecies.⁶² En el género *Lactobacillus* se han encontrado varias especies electrogénicas que han sido utilizadas en CCM, entre las cuales destacan *L. bulgaricus*⁶³, *L. pentosus*⁶⁴, *L. plantarum*⁶⁵ y *L. casei*⁶⁶.

3.4 Bacterias de género *Enterobacter*

El género *Enterobacter* engloba bacterias gram negativas, anaerobias facultativas, con forma de bastón, móviles, no esporuladas y algunas de sus especies son patógenas. Las bacterias de este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser aisladas de muchos orígenes, desde seres humanos hasta plantas y ecosistemas.⁶⁷

En cuanto a la taxonomía de este género se puede decir que ha variado con el transcurso de los años, lo cual ha implicado la reclasificación de algunas especies.⁶⁸ Actualmente existen organismos en espera de ser validados en este género lo que hace complejo la homologación de las cepas aisladas.⁶⁸

Dentro de este género se realizó una agrupación de varias especies en el complejo *Enterobacter cloacae*, en las que se agruparon las especies *Enterobacter pyrinus*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter nimipressuralis* y *Enterobacter cancerogenus*.⁶⁹ Esta unión se debe a que están genéticamente relacionadas y son fenotípicamente similares.

En las CCM se han evaluado bacterias de este género y se ha encontrado que poseen características electrogénicas y pueden además transferir los electrones hacia

el electrodo de forma directa, por medio de citocromos o ubiquinona (mediador propio).⁷⁰

3.5 *Shewanella oneidensis*

El género *Shewanella* está compuesto por un diverso grupo de bacterias anaerobias facultativas, gram negativas, que poseen movilidad, distribuidas en ambientes marinos y de agua dulce. La sobrevivencia en tales entornos se ve favorecida por la capacidad de emplear un conjunto de diferentes aceptores de electrones que les permite respirar bajo distintas condiciones redox, lo que es una característica distintiva de este género.⁷¹

El uso de *Shewanella oneidensis* en aplicaciones para biorremediación y biotecnología, como las CCM, se debe a que la vía metabólica respiratoria de esta bacteria, les permite reducir metales y otros compuestos, que en la mayoría de los casos son insolubles en un medio con pH neutro lo que hace que no sean accesibles para ingresar al interior de la célula. Esta característica de los sustratos hace necesario un sistema que permita la transferencia de electrones producidos en el interior de la célula hacia el exterior donde se encuentran éstos, este proceso de transferencia de electrones se denomina respiración extracelular.⁷¹⁻⁷³

La respiración extracelular de la *Shewanella oneidensis* es un proceso ampliamente estudiado, que a grandes rasgos implica un grupo de genes y una proteína de membrana citoplasmática. Los electrones producidos durante la oxidación del carbono son transportados por una menaquinona (coenzima) a través

de un complejo citocromico (CymA) ubicado en el lado interno de la membrana hasta llegar a un citocromo periplásmico (MtrA) y finalmente a citocromos terminales (MtrC y Omc) (Figura 5). Los electrones pueden reducir los aceptores insolubles por contacto directo o por mediadores solubles.⁷²⁻⁷⁴

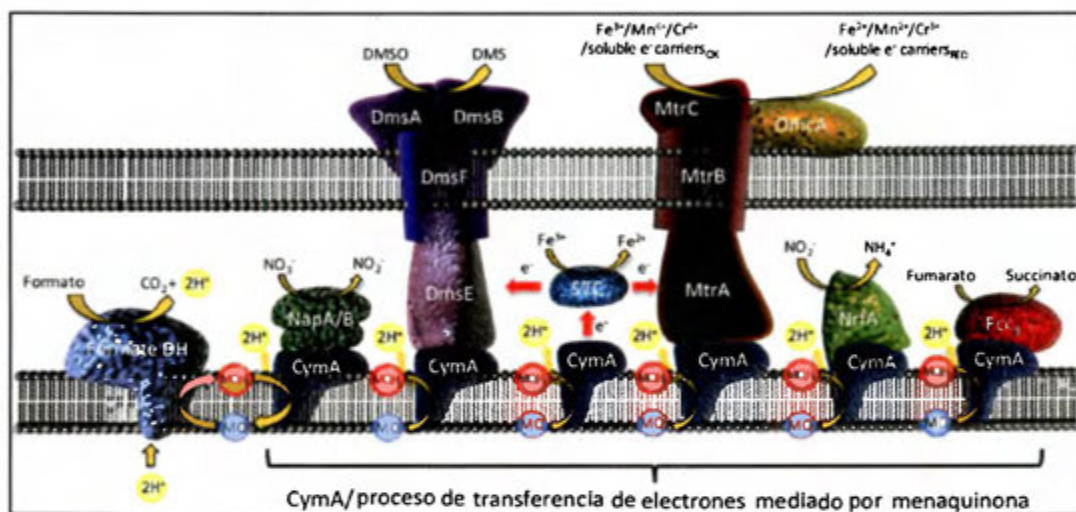


Figura 5. Representación esquemática del proceso de transferencia de electrones realizado por *Shewanella oneidensis* como producto de su respiración extracelular.⁷⁴

3.6 Técnicas Moleculares para la identificación de bacterias

3.6.1 Extracción de ADN

La extracción y el aislamiento del ADN va depender del tipo de con que se trabaje, sin embargo cualquier proceso debe cumplir los criterios básicos de una extracción eficiente para obtener ADN purificado de calidad adecuada para las subsiguientes aplicaciones y sin la presencia de contaminantes.⁷⁵⁻⁷⁷

Inicialmente se da una ruptura de las células bacterianas presentes en la muestra de partida, la pared celular se fragmenta con el uso de enzimas, por ejemplo lisozima y la lisis de la membrana celular se da por medio de detergentes. Producto de la ruptura de la célula se tiene una mezcla de todo el contenido de ésta, por lo que se debe hacer una separación del ADN de material celular restante.⁷⁵⁻⁷⁷

Las proteínas se eliminan precipitándolas mediante la adición de una solución salina, por ejemplo una solución de sulfato de amonio, y se centrifuga. Se agrega ribonucleasa para eliminar el ARN, y se precipita el ADN mediante el uso de isopropanol. El ADN se purifica solubilizándolo en etanol para su posterior precipitación.⁷⁵⁻⁷⁷

Actualmente se encuentran en el mercado un gran número de kits comerciales para extracción de ADN de diferentes tipos de matrices, sean bacterias en suspensión, suelos, sangre entre otros, lo que hace más sencillo y factible realizar el proceso.^{75,76}

La presencia de ADN se confirma mediante electroforesis en un gel de agarosa y posterior tinción con GelRed o algún otro revelador y observación con luz UV o directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350 nm. El ADN purificado se puede cuantificar con un espectrofluorímetro mediante el uso de fluoróforos o marcadores específicos.⁷⁵⁻⁷⁷

3.6.2 Amplificación y secuenciación de ADN

Una de las técnicas más comunes empleada en los laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular sin duda es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en el propiedad natural de las enzimas ADN polimerasa para replicar las hebras del ADN.^{46,78}

Con esta técnica se logra generar copias del gen requerido, mediante el uso de un fragmento de la secuencia de ADN complementario del gen deseado, "primer o cebador"; y la enzima ADN polimerasa termoestable. La elección de los cebadores es importante para obtener la secuencia deseada, en mercado existe una amplia variedad de cebadores para diferentes regiones de ADN de distintos organismos.^{46,78}

El proceso de amplificación de ADN por PCR inicialmente se da una separación de las bandas de ADN, los cebadores van a unirse en su posición correspondiente del ADN molde; la polimerasa realizará la amplificación del ADN para generar las copias de exactas del ADN modelo. El proceso se repite por varios ciclos para generar una

cantidad de copias adecuadas del gen. El proceso de amplificación se comprueba por medio de una electroforesis de agarosa.^{46,78}

Para la secuenciación de la cadena de ADN generada en el PCR, usualmente se utiliza el método de terminación de cadena. Este se basa en realizar 4 diferentes reacciones de amplificación parcial de una cadena sencilla de ADN, un cebador para iniciar la síntesis de ADN, la enzima ADN polimerasa, además en cada reacción se utiliza uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y su respectivo didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) estos últimos detienen la replicación de ADN.^{46,78}

La polimerasa incorpora aleatoriamente un ddNTP con lo que se termina la reacción, lo que genera fragmentos de distintas longitudes los cuales están marcados por una molécula fluorescente. Los diversos fragmentos se separan por electroforesis capilar y se detectan por la fluorescencia emitida en un equipo de secuenciación con lo que se genera un patrón de los nucleótidos.^{46,78}

4. Metodología

4.1 Ubicación

La experimentación se realizó en tres centros de investigación de la Universidad de Costa Rica. La implementación de las CCM se realizó el Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ). El crecimiento de las bacterias, aislamiento y purificación, así como la inoculación de las celdas y los análisis de DQO se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas. La parte molecular del trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

4.2 Material Experimental

Se utilizó agua miel de café procedente del beneficio de Coopetarrazú recolectada en dos períodos, el agua miel utilizada en la primera etapa del proyecto fue recolectada el 29 enero del 2016, guardada en congelación a -3 °C; el agua miel utilizada en la segunda etapa se recolectó el 9 de agosto 2017, guardándose a -3 °C.

Se emplearon Celdas Combustibles Microbianas (CCM) de dos compartimientos separadas por una membrana semipermeable de intercambio iónico construida en el CELEQ y optimizada con anterioridad para su uso con agua miel de café.⁷⁹ Se utilizaron electrodos de fieltro de grafito con conexión de cables de

titanio unidos a cables de cobre conectados a un registrador de datos Fieldlogger de Novus Automation Inc.

4.3 Diseño de experimentación

El desarrollo experimental constó de dos secciones; la selección de las bacterias y la aplicación de éstas en las CCM. Inicialmente se realizaron tres experimentos de CCM con agua residual del proceso del beneficiado de café (sección 3.1) de las que se aislaron las bacterias presentes en los electrodos de las celdas, las bacterias diferentes se identificaron por medio de métodos moleculares y se eligieron las cepas a evaluar.

En la segunda etapa se llevaron a cabo ensayos en las CCM con agua miel de café diluida y sin diluir, el ánodo se inoculó con las bacterias elegidas, se analizó la eficiencia del tratamiento biológico y el rendimiento eléctrico de los ensayos realizados; además de analizar el cambio en el ambiente biológico del ánodo de la celda por la inoculación de la bacteria de prueba. En la Figura 6 se presenta el esquema del diseño experimental realizado.

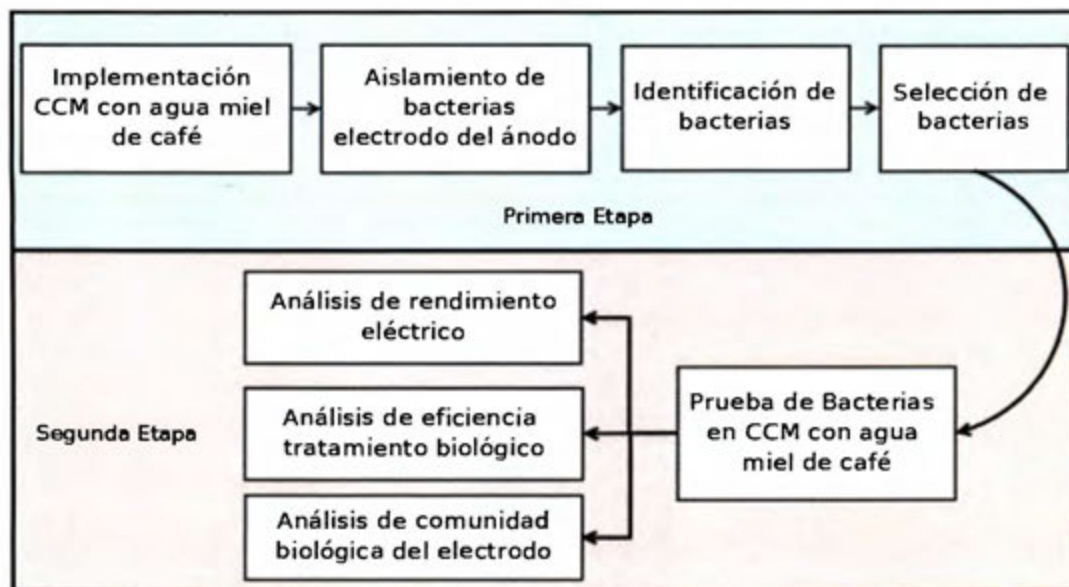


Figura 6. Resumen esquemático de diseño experimental aplicado en el estudio.

4.4 Aislamiento de microorganismos electrogénicos presentes en ánodos de Celdas de Combustible Microbiano

4.4.1 Implementación de las CCM con agua miel de desecho de café como sustrato

En el compartimiento del ánodo se colocó 400 mL de agua miel del residuo de café, previamente pasadas por un colador para eliminar partículas de gran tamaño; mientras que al compartimiento del cátodo se agregó 400 mL de amortiguador de sales de fosfatos de pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$: 42 g/34 g en un litro de agua).

Se inyectó un flujo de nitrógeno por 20 min a la cámara del ánodo para la obtención de condiciones anaerobias. Durante la ejecución de la CCM el cátodo se mantuvo con burbujeo de aire (Figura 7).

Se realizaron tres ensayos, cuya descripción y condiciones se detallan en el cuadro IV. En el primer experimento realizado se utilizó una CCM control con 400 mL de amortiguador de sales de fosfatos tanto en el ánodo como en el cátodo y un electrodo, en la CCM con el agua miel en el ánodo se colocaron tres electrodos. Para el segundo ensayo no se realizó celda control, y se colocaron dos CCM con agua miel con 2 electrodos en cada una. Y por último para el tercer experimento se utilizó una única CCM con agua miel con dos electrodos.

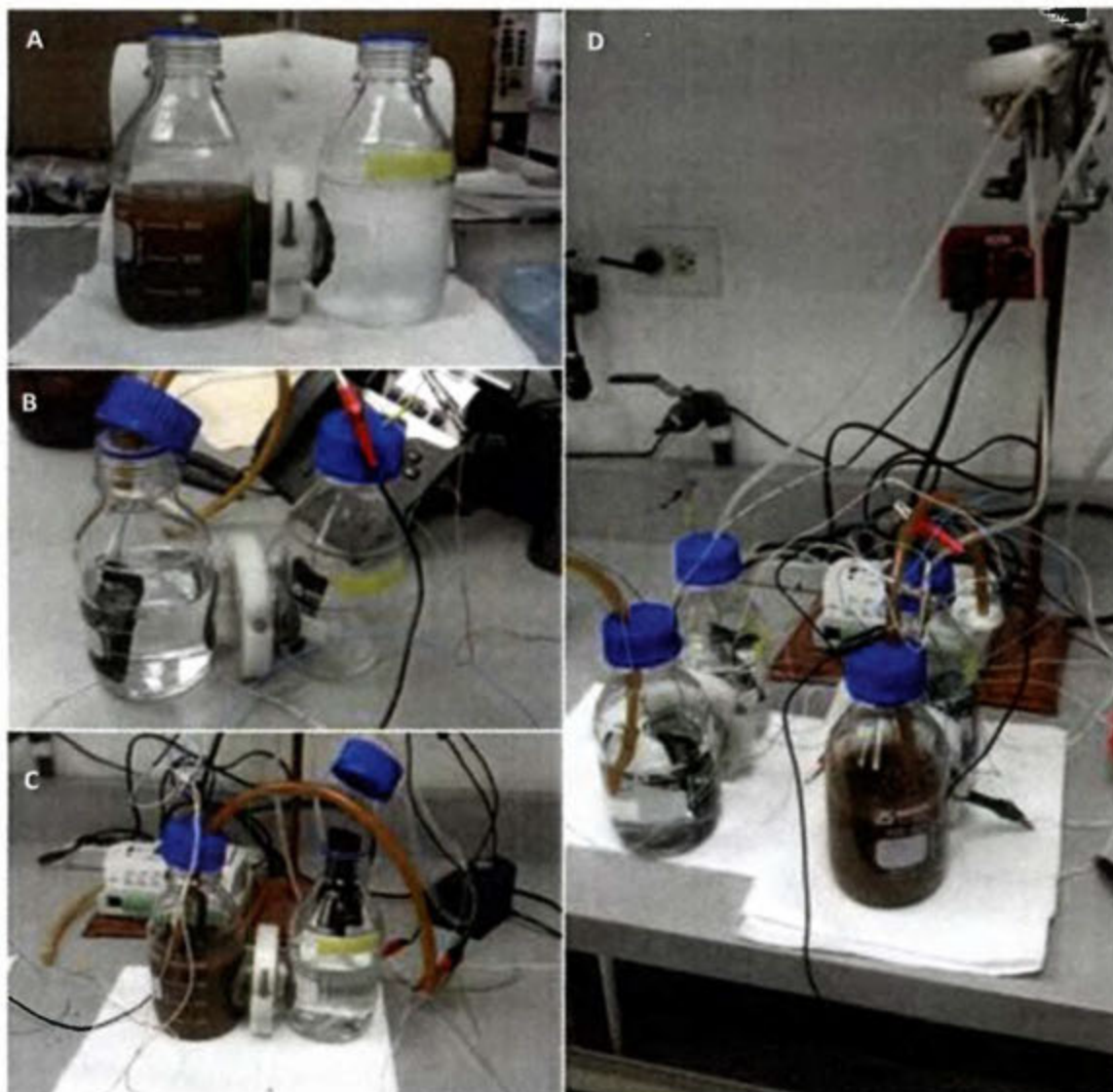


Figura 7. Implementación de CCM con agua miel de café. A) CCM de dos compartimientos separada por una membrana de intercambio iónico. B) Celda blanco con buffer en el ánodo y cátodo. C) CCM con miel de café en el compartimiento del ánodo y buffer en el cátodo de la celda. D) Sistema utilizado para la implementación de las CCM con miel de café.

Cuadro IV. Descripción de experimentos realizados en la implementación de CCM con agua miel de café.

Fecha ensayo	Número de celdas	Electrodos
22 marzo 2017-27 marzo 2017	2	3 réplicas y 1 blanco
31 mayo 2017- 5 junio 2017	2	4 réplicas
23 agosto 2017-28 agosto 2017	1	2 réplicas

4.4.2 Aislamientos de bacterias presentes en ánodos de la CCM.

Cada experimento se realizó durante 5 días. Una vez finalizado el período se muestrearon los electrodos del ánodo de la celda; la biopelícula colectada con un hisopo se inoculó en platos de medio RCM (Reinforced Clostridial Medium, por sus siglas en inglés) y se incubaron durante una semana en una cámara de anaerobiosis (OXOID) a temperatura ambiente.

Una vez crecidas las bacterias se rayaron e incubaron, en las mismas condiciones, hasta obtener colonias individuales puras. Se realizaron pruebas de tinción de Gram para hacer una mejor diferenciación de las bacterias.

Para la caracterización de la comunidad microbiana presente en los electrodos del ánodo de las CCM con sustrato de agua miel de café se utilizaron imágenes de SEM obtenidas en el estudio de la optimización de las CCM para este sustrato.⁷⁹

4.4.3 Tinción de Gram

Se siguió el protocolo suministrado por laboratorio de microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas.

Se realizó un frotis en un portaobjeto limpio, para ello se colocaron 3 gotas de agua, en un portaobjetos y con un asa bacteriológica se tomó parte de una colonia, distribuyéndola bien. Se dejó secar y se pasó la parte de atrás del portaobjeto sobre la llama de un mechero de alcohol para fijar. Se agregó cristal violeta hasta cubrir el frotis durante 2 min y se lavó con agua. Se agregó lugol hasta cubrir el frotis por un minuto, y se eliminó con agua. Posteriormente se agregó con safranina durante 1 min, pasado el tiempo se agregó agua para lavar y se dejó secar.⁸⁰

Se observaron las preparaciones en un microscopio NIKON Eclipse 50i en lente de 100x aumentos, se fotodocumentaron las bacterias con cámara modelo LG-M700 (celular LG Q6+).

4.5 Identificación de las bacterias electrogénicas

A las bacterias morfológicamente distintas en sus características coloniales y tintoriales, se les realizó el proceso de extracción de ADN y amplificación para su posterior secuenciación e identificación.

4.5.1 Extracción de ADN.

El ADN de las bacterias aisladas se extrajo con el kit de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Se suspendió un pellet de bacteria en 480 µL de EDTA 50 mmol/L; se adicionó 30 µL de lisozima y se incubó por 40 min a 37 °C; pasado ese tiempo se centrifugó por 2 min a 13000 x g* y se removió el supernatante.

Al precipitado se le agregó 600 µL de "Nuclei Lysis Solution", se pipetea para agitar y se incubó por 5 min a 80 °C y luego se dejó a temperatura ambiente, se agregó 3 µL de "RNase Solution" se mezcló y se incubó a 37°C por 45 min, pasado el tiempo se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó 200 µL de solución precipitante de proteína y se agitó en un vortex; se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó por 3 min a 13000 g*.

Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio que contenía 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló. Se centrifugó a 13000 g* hasta tener un precipitado, se descartó el sobrenadante. Se adicionó 600 µL etanol a 70% a temperatura ambiente y se mezcló. Se centrifugó por 2 min a 13000 g* y se eliminó el líquido y se dejó secar al aire por 10 min.

Para finalizar, se suspendió el precipitado de ADN en 100 µL "rehydratation Solution" y se guardó en congelación al menos una noche.

Para corroborar si la extracción de ADN realizada fue efectiva, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el producto obtenido (Cleaver scientific

MP-300) durante 40 min a 90 V. Como marcador de tamaño GeneRuler™ (Fermentas). Los resultados se visualizaron en el transiluminador (uvitec).

4.5.2 Amplificación de ADN.

Se amplificó el gen ribosomal ARN 16S al ADN extraído mediante PCR con los imprimadores 1492R y 27F (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de PCR se realizó de acuerdo al orden indicado en el Cuadro V, una vez obtenida la mezcla se llevó al termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler) y se eligió el programa ilustrado en la Figura 8.

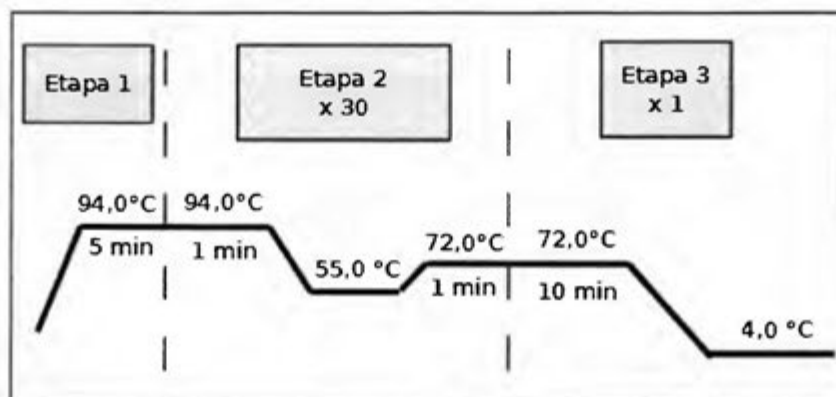


Figura 8. Esquema de proceso termociclador llevado a cabo para el PCR del gen ARN ribosomal 16S del ADN extraído.

Cuadro V. Reactivos empleados para un volumen de reacción de PCR de 50 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
1. H ₂ O	31,3
2. Dream Taq Buffer 10 x	5
3. DNTP mix 2 nmol	5
1. MgCl ₂ 25 m	2,5
5. Primer 27F 10	2
6. Primer 1492R 10	2
7. Taq polimerasa	0,2
8. ADN	2

Se verificó el tamaño de los fragmentos amplificados según lo esperado (1500 pb aproximadamente), por medio de electroforesis en un gel de agarosa (sección 4.1). El gel se observó con ayuda de un transiluminador (Ultraviolet & Laboratory Products) acoplado a una cámara Kodak Edas 290.

4.5.3 Secuenciación e identificación de ADN

El ADN amplificado se purificó y cuantificó para determinar la calidad de material genético. La purificación se realizó con el Kit NucleoSpin® gDNA Clean-up (MACHEREY Y NAGEL).

Una vez purificados, se midió la concentración de ADN y la calidad del mismo en un espectrofotómetro nanodrop 2000c de ThermoScientific. Posteriormente se secuenció con el equipo Applied Biosystem® 3500, HITACHI (CIBCM, Universidad de Costa Rica).

Para el ensamblaje y edición de las secuencias se utilizó el software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2 (Ibis Biosciences). La búsqueda de homología de las secuencias se realizó con la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information. Las secuencias que presentaron una homología de un 97% o mayor se identificaron como la misma unidad taxonómica operativa (OTU).

Se realizó un análisis filogenético con el propósito de identificar las bacterias seleccionadas donde las distancias evolutivas fueron calculadas por inferencias bayesianas. Se utilizó el software MEGA 7.0.26 para alinear mediante MUSCLE las secuencias obtenidas y previamente editadas con las secuencias de las bacterias de la base de datos (Cuadro VI); por medio del software MrsBayes 3.2.6 se obtuvo el árbol filogenético del alineamiento realizado. Para visualizar y editar el árbol filogenético se empleó el software FigTree 1.4.3 y Nitro pro 12.6.1.298.

Cuadro VI. Bacterias y números de accesoión en GeneBank para el análisis de filogenético de las bacterias aisladas de los electrodos del ánodo de CCM con sustrato de agua miel de café.

Especie	Número accesoión GeneBank (16S ARNr)
<i>E. aerogenes</i> NCTC10006	AJ251468
<i>E. Hormaechei</i> CIP 103441	AJ508302
<i>E. mori</i> LGM 25706	EU721605
<i>E. lugwгии</i> EN-119	AJ853891
<i>E. cloacae subsp. dissolvens</i> LGM 2683	Z96079
<i>E. cloacae subsp. cloacae</i> DSM 30054	EF978272
<i>E. cowanii</i> CIP107300	AJ508303
<i>E. oryzae</i> Ola 51	EF488759
<i>E. arachidis</i> Ah-143	EU672801
<i>E. helveticus</i> LGM 23732	DQ273688
<i>E. pulveris</i> 601/05	DQ273684
<i>E. kobei</i> CIP 105566	AJ508301
<i>E. nimipressuralis</i> LMG 10245	Z96077
<i>E. turicensis</i> LGM 23730	DQ273681
<i>E. amnigenus</i> JCM 1237	AB004749
<i>E. cancerogenus</i> LGM 2693	Z96078
<i>E. gergoviae</i> JCM 1234	AB004748
<i>E. asburiae</i> JCM 6051	AB004744
<i>Xenorhabdus poinarii</i> DSM 4768	X82253
<i>L. capillatus</i> YIT 11306	AB365976
<i>L. aquaticus</i> IMCC 1736	DQ664203
<i>L. ceti</i> 142-2T	AM292799
<i>L. harbinensis</i> SBT10908	AB196123
<i>L. shenzhenensis</i> KACC 16878	JX523627
<i>L. cerevisiae</i>	KT445896
<i>L. plantarum subsp. argentoratensis</i> DK0 22T	AJ640078
<i>L. acetotolerans</i> JCM 3825	FR683099
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842	KC429786
<i>L. acidophilus</i> BCRC10695	AY773947
<i>L. antri</i> LGM 22111	AY253659
<i>L. caviae</i> DSM 100239	KT343143
<i>L. fermentum</i> CECT 562	AJ575812
<i>L. buchneri</i> YIT 0077	AB429368
<i>L. composti</i> NRIC 0689	AB268118

Continuación Cuadro IV

<i>L. casei subsp. casei</i> ATCC 393	AP012544
<i>L. paracasei subsp. tolerans</i> NBRC 15906	AB181950
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i> NBRC 15889	AB626054
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> NCDO 604	AB100803

4.6 Selección de cepas para pruebas en CCM

Según los resultados obtenidos por la herramienta BLAST disponible en el sitio NCBI, se seleccionaron las bacterias para las pruebas individuales de la inoculación en las CCM; bajo tres criterios: la clasificación según la tinción Gram y morfología colonial, la identificación de las bacterias y la información referente a éstas en la literatura. Se investigó si existía evidencia de su uso como bacterias electrogénicas y se eligieron dos. Por otro lado se decidió probar la bacteria electrogénica *Shewanella oneidensis* (LMG19005) como parte de las pruebas en las CCM.

4.7 Pruebas de bacterias seleccionadas en CCM con agua miel de café

Se realizaron ensayos de CCM inoculadas con las bacterias seleccionadas, para analizar el efecto de la inoculación de las diferentes bacterias por medio del cambio en la demanda química de oxígeno, en el rendimiento culómbico y en la diferencia de la comunidad biológica existente en el electrodo del ánodo de la celda. Se utilizó el mismo lote de agua miel que en el aislamiento de las bacterias.

4.7.1 Inoculación e implementación de las CCM con las bacterias

Para la evaluación de las bacterias individuales en CCM se llenó la cámara del ánodo con 400 mL de agua miel de café y se inoculó con 10 mL de una suspensión de la bacteria. Para realizar la suspensión de la bacteria de interés se utilizaron dos cultivos frescos de esta, el material bacteriano se recolectó con ayuda de hisopo estéril y se suspendió en 30 mL de agua desionizada estéril, en el caso de las bacterias aisladas, el medio utilizado para los cultivos fue MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para la *Shewanella* se utilizó agar nutritivo.

Las pruebas con la *Shewanella oneidensis* se llevó a cabo con el agua miel sin diluir. En el caso de las otras dos bacterias se realizaron dos ensayos por bacteria, una con el agua miel sin diluir y una con el agua miel diluida.

Para los experimentos con el agua miel diluida, se le añadió a 1400 mL de agua desionizada a 140 mL de agua miel, 400 mL de esta mezcla se agregó en cada uno de los ánodos de las celdas.

Se emplearon controles en todos los ensayos, en las mismas condiciones de las otras celdas pero sin realizarse la inoculación del agua miel. Además en todas las celdas en la cámara del cátodo se colocó 400 mL de buffer de fosfatos de pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$: 42 g /34 g en un litro de agua).

La instalación de las CCM se realizó de igual manera que la descrita en la sección 3.1, la cantidad de bacterias inoculadas en las celdas se determinó por medio de recuento viable en plato.

Para el recuento se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana preparada para la inoculación y se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de agua, el tubo se agitó y se tomó de esta nueva mezcla 1 mL y se transfirió a un nuevo tubo con 9 mL de agua, y se agitó nuevamente; este proceso se repitió hasta lograr seis diluciones (ver Figura 9), de las últimas tres diluciones se tomó 100 μ L en platos con medio de cultivo; MRS para las bacterias II-1-b y II-C1-A o agar nutritivo para la *Shewanella oneidensis*; y se utilizó un asa de vidrio en forma de "L" (asa de Disgralsky) para distribuir el líquido sobre el medio y se dejó en incubación a 37 °C por dos días.

Se tomaron muestras del agua miel antes del ensayo y después del tratamiento de las CCM para medir la demanda química de oxígeno (DQO) antes y después del proceso.

El resumen de los experimentos realizados para las pruebas de las bacterias se observa en el Cuadro VII.

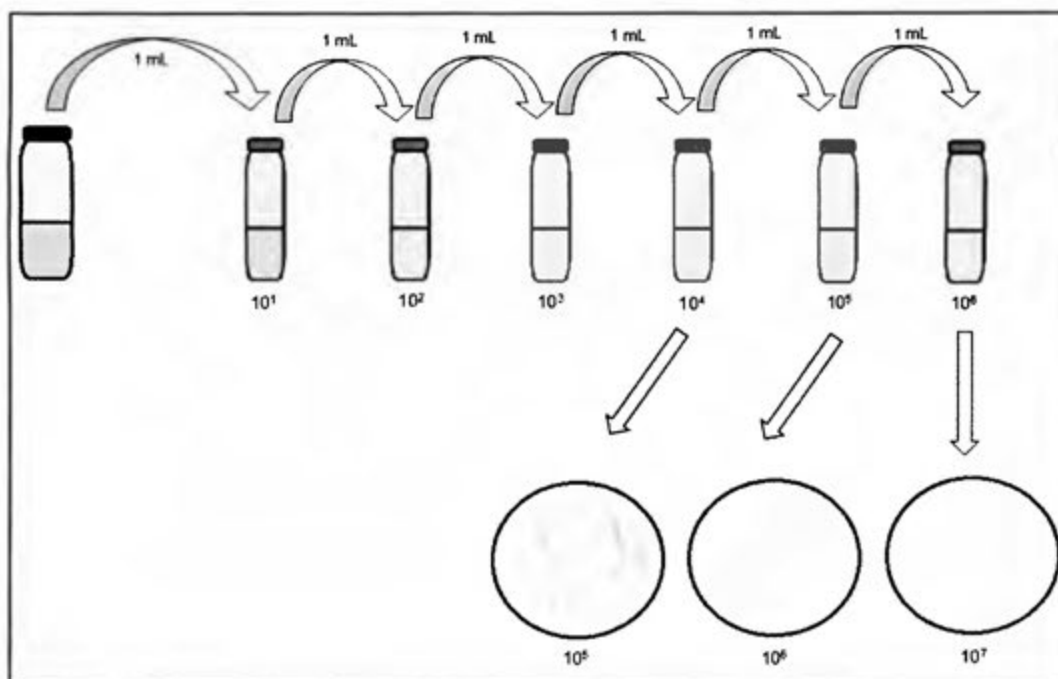


Figura 9. Esquema del proceso de recuento empleado para determinar la cantidad de células inoculadas en las CCM.

Transcurrido siete días, se realizó el recuento a los electrodos de las celdas, los electrodos se colocaron en 100 mL de agua desionizada y estéril, se agitó y se tomó 1 mL de líquido, se colocó en un tubo con 9 mL se agitó y tomó 1 mL de esta nueva mezcla que se colocó en un nuevo tubo con 9 mL de agua, y así nuevamente hasta diluir 10^7 veces (Figura 10). De las tres diluciones seleccionadas se tomó 100 μ L en los platos para recuento y se esparció con un asa Disgralsky, los platos se incubaron por 3 días a 37 °C y se contó las colonias presentes. Se utilizó agar nutritivo para los recuentos de las CCM con *Shewanella oniedensis* y MRS en el caso de las otras bacterias.

Cuadro VII. Resumen de experimentos realizados para las pruebas de las bacterias seleccionadas.

Bacteria	Condiciones CCM	Cantidad de células inoculadas (UFC)	Fecha de ensayo
<i>Shewanella oneidensis</i>	Sin diluir.	$9,6 \times 10^8$	2-9 octubre 2018
II-1-b	Sin diluir	$8,0 \times 10^8$	16-23 mayo 2018
	Diluido	$5,6 \times 10^8$	6-13 junio 2018
II-C1-A	Sin diluir	$1,5 \times 10^8$	23-30 mayo 2018
	Diluido	$1,7 \times 10^8$	30 mayo-6 junio 2018



Figura 10. Representación esquemática de proceso de recuento del electrodo del ánodo después del tratamiento en la CCM.

4.7.2 Rendimiento de tratamiento biológico en pruebas de las bacterias en la CCM.

El rendimiento de tratamiento biológico se determinó por medio de la medición y comparación de la demanda química de oxígeno (DQO) antes y después de las pruebas de la CCM. Para realizar el análisis de DQO se utilizó el equipo de casa comercial HATCH y suplementos de la casa comercial Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), se empleó el reactor modelo DRB 200 de HATCH Company con tubos de reactivo para un rango de concentración de 0-1500 mg/L DQO de WTW.

En el caso del sustrato de agua miel sin diluir, se colocó la muestra en agitación, se tomó 500 μL y se diluyó a 50,00 mL, de esta nueva mezcla en agitación se tomaron 2000 μL y se colocaron en un tubo de reactivo (WTW) se invirtió el tubo tapado para mezclar. En lo que respecta al agua miel de los ensayos diluidos se tomó 1 μL de la muestra en agitación y se colocó en el tubo de reactivo (WTW) y se adicionó 1 μL de agua desionizada.

Los tubos se agitaron y se colocaron en el reactor por dos horas a 150 °C (se usó el programa del equipo), transcurrido el tiempo se esperó a que la temperatura bajara a 120 °C los tubos se sacaron, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para realizar la medición.

Para las pruebas se preparó un blanco y un patrón, como blanco se utilizó 2000 μL de agua en los tubos de reactivo y en el caso del blanco se utilizó ftalato ácido de

potasio (KHF) a una concentración de 1000 mg/L DQO (0,0400 g en 50,00 mL de disolución), para monitorear los resultados del análisis. Para cada muestra se realizaron 2 réplicas y 3 lecturas de cada.

Para las mediciones de concentración de DQO de los tubos se utilizó el equipo DR 900 de HACH Company, en la función DQO alto rango. Para el cálculo del DQO de las muestras se tomó en cuenta el factor de dilución, además de considerar el líquido desplazado del ánodo de las CCM en cada ensayo.

4.7.2.1 Análisis de eficiencia del tratamiento biológico de las CCM implementadas.

Para analizar la eficiencia del tratamiento biológico de las CCM en cada una de las experimento implementado, se determinó el porcentaje de remoción de la carga orgánica (R_{CO}) del agua miel en cada ensayo, por medio de la Ecuación 4.

$$\%R_{CO} = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde DQO_i es la demanda química de oxígeno al inicio de la implementación de las CCM, DQO_f es la demanda química de oxígeno al final del proceso.

4.7.2.2 Análisis de efecto de inoculación en la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.

Para el análisis de la comunidad microbiana se llevaron a cabo dos ensayos, con las bacterias II-1-b y la *Shewanella* (Cuadro VIII). Los experimentos se realizaron con

tres réplicas y un control, se utilizó agua miel sin diluir y se inoculó según lo descrito en la sección 4.7.1, el periodo de implementación de las CCM fue de 7 días.

Se colocaron los electrodos de los ánodos en bolsas estériles (por separado) y se les agregó 10 mL de agua y se agitaron para lograr desprender la biopelícula, se tomó 1 mL de esta suspensión en un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm para obtener un pellet.

Cuadro VIII. Experimentos realizados para el análisis del efecto de la inoculación en las CCM sobre la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.

Fecha experimento	Condición de experimental	Bacteria inoculada	Electrodos
12 - 19 julio de 2018	Natural	II-1-b	3 réplicas y 1 control
2 -9 octubre de 2018	Natural	<i>Shewanella</i>	3 réplicas y 1 control

4.7.2.3 Extracción y cuantificación de ADN para análisis de la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.

Al material sedimentado se le agregó 1000 μ L de buffer de lisis de bacterias, una pequeña cantidad (punta de espátula) de perlas de vidrio y 100 μ L de lisozima.

El tubo se colocó a 60 °C por 30 minutos, agitándolo cada 5 en un vortex durante un minuto colocándolo 1 min más en hielo para un choque térmico y regresándolo a 60 °C; el proceso se repitió durante los 30 min.

Una vez finalizado el proceso anterior se le agregó 100 μL de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10%, y se repitió el proceso de incubación a 60 °C, con la agitación y enfriamiento en hielo descritos anteriormente.

La suspensión obtenida se divide en dos porciones de igual volumen (para obtener al final del proceso dos réplicas de cada muestra), a cada una se le agregó 250 μL de fenol y 250 μL de cloroformo, se invirtieron los tubos para mezclar en tres ocasiones y se centrifugó a 13200 rpm por 15 min.

Se tomó la fase menos densa, se midió el volumen recolectado, sin llevarse parte de la otra fase para evitar contaminación, y se descartó la fase densa; y se colocó en nuevos tubos; a la fase recuperada se le agregó cloroformo en la misma cantidad de volumen de esta; se invirtió el tubo en tres ocasiones para mezclar y se centrifugó a 13200 rpm por 15 min. Nuevamente se recolectó la fase menos densa con los mismos cuidados y se midió el volumen recolectado.

A esta fase se le adicionó acetato de sodio 3 mol/L de pH 5,2; el volumen agregado fue una cantidad equivalente a la décima parte del volumen de la fase recuperada. Además se agregó un volumen equivalente de etanol al 95% colocándolo por las paredes del tubo lentamente; se invirtió los tubos en tres ocasiones para mezclar y se dejaron a -2 °C por aproximadamente 12 horas.

Después del proceso de reposo se centrifugaron los tubos a 13200 rpm por 15 min, se invirtió los tubos cuidadosamente para eliminar el líquido, se agregó 300 μL

de etanol a 70% se agitó en vortex y se centrifugó a 13200 rpm por 15 min; una vez centrifugado los tubos se inclinaron para eliminar el líquido, y se colocaron a 60 °C para secar completamente.

Una vez seco el pellet se agregó 50 µL de agua estéril en la plantilla de calentamiento para facilitar a solubilización y se agitó en el vortex por 1 min.

Se determinó la calidad del ADN extraído en el espectrofotómetro nanodrop 2000c de ThermoScientific y se corrió un gel de agarosa 1% (sección 4.1).

4.7.2.4 Determinación de la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.

Una parte del ADN obtenido de cada se envió al Laboratorio de biología molecular de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) con el propósito de realizar el análisis de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), para analizar la diferencia en la comunidad microbiana de los electrodos del ánodo de las celdas.

Se utilizó el Software Uvisoft-UvibandMax software (Uvitec Cambridge, Cambridge, United Kingdom) con el resultado del DGGE-PCR generado por análisis para realizar un estudio de la homología de las bacterias presente en cada electrodo

4.7.3 Análisis de datos, rendimiento eléctrico.

Se realizaron gráficas de corriente versus tiempo del electrodo control y del promedio de los electrodos de las celdas inoculadas (promedio de las réplicas) de los ensayos realizados (sección 6.1, Cuadro IV) con su respectiva desviación estándar por

medio del software Capstone™ 1.12.0 de Pasco Scientific, para analizar el comportamiento en las CCM.

Se determinó la corriente máxima de los electrodos, la densidad de corriente máxima. Además se realizó el cálculo del rendimiento eléctrico (% ϵ_{Cb}) de las CCM realizadas, Ecuación 5.

Donde M es la masa molar de oxígeno, $\int_0^{t_b} I dt$ se calculó como el área debajo de la curva por medio del software Capstone™ 1.12.0 de Pasco Scientific; F es la constante de Faraday; b es el número de electrones producidos por mol de sustrato; V_{An} es el volumen de la miel en el ánodo de la celda y ΔDQO es la diferencia entre el DQO inicial y el DQO final de la miel del ánodo.

$$\% \epsilon_{Cb} = \frac{M * \int_0^{t_b} I dt}{F * b * V_{An} * \Delta DQO} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

4.8 Análisis estadístico

Se utilizaron la prueba t Student y Análisis de Varianza (ANOVA), para analizar los diferentes resultados asociados a la corriente generada en los ensayos realizados para la prueba de las bacterias seleccionadas. Las pruebas se realizaron en los softwares estadísticos R (versión 3.4.4) y R Studio (versión 1.1.463).

La corriente máxima obtenida en cada ensayo se analizó mediante una prueba t student para comparar los resultados del electrodo control del promedio de los electrodos inoculados. La Hipótesis nula: la corriente máxima del electrodo inoculado puede ser igual o menor que la corriente máxima en el electrodo control; la hipótesis alternativa: los electrodos inoculados presentan una corriente máxima mayor que el electrodo control. La prueba se realizó con un nivel de confianza de 95%.

Adicional a la prueba anterior a los ensayos con agua miel diluida con las bacterias II-1-b y II-C₁-A, se realizó una segunda prueba t student. La Hipótesis nula: la corriente máxima del electrodo inoculado puede ser igual o mayor que la corriente máxima en el electrodo control; la hipótesis alternativa: los electrodos inoculados presentan una corriente máxima menor que el electrodo control. La prueba se realizó con un nivel de confianza de 95%.

Se realizó un ANOVA a la diferencia de la densidad de corriente máxima, el porcentaje de remoción de la carga orgánica y para la eficiencia culombica entre electrodo inoculado y el electrodo control. La prueba se aplicó de forma separada para los datos de los electrodos inoculados de los ensayos con agua miel sin diluir y con las agua miel diluida, para valorar si la especie inoculada interviene en el rendimiento de la CCM.

5. Resultados y Discusión

5.1 Aislamiento de microorganismos electrogénicos presentes en los ánodos de las CCM.

Las imágenes SEM (Figura 11) realizadas a las superficies de los electrodos dan un indicio de la variabilidad de los microorganismos que podrían estar presentes en los electrodos de los ánodos de las CCM. Además muestran la predominancia levaduras y de bacilos de dos tamaños, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en las pruebas de Gram (Cuadro IX)

En la comunidad presentes en la Figura 11 podrían haber microorganismos que no se lograran aislar en un medio artificial por las condiciones del cultivo realizado o por la cantidad en la que estuvieran presentes en los electrodos, ya que el crecimiento de las bacterias es dependiente de las condiciones del medio en el que se desarrollan, además únicamente alrededor de 1% de las bacterias de la Tierra son cultivables,^{81,82} en lodos activados se ha logrado aislar hasta 15% de la comunidad microbiana existente.⁸³

Por otro lado se puede observar la presencia de estructuras filamentosas delgadas (Figura 11), que podrían ser parte de la matriz extracelular de las bacterias presentes en la biopelícula; estructuras similares se han reportado como sistemas de conexión entre las bacterias, como pilus.⁸⁴

En los cultivos realizados al muestrear los electrodos, se observaron diferentes morfotipos (Figura 12), los cuales en su mayoría se encontraron en todos los electrodos, sin embargo algunas colonias únicamente fueron aisladas de un electrodo específico.

De los tres ensayos (sección 4.7.1) se aislaron 17 morfotipos que mediante la tinción de Gram y morfología colonial permitieron seleccionar los diferentes aislamientos para su posterior secuenciación e identificación.

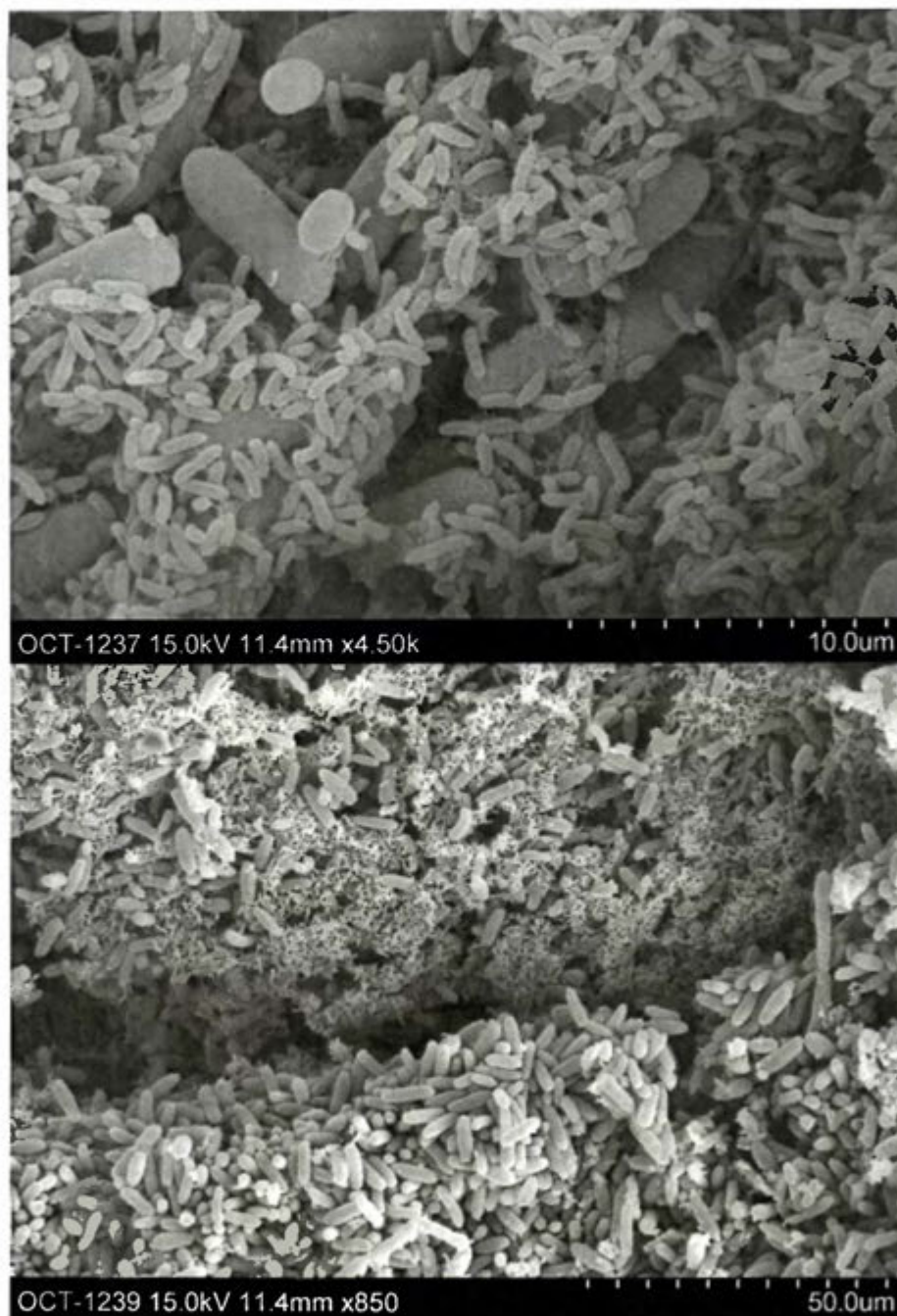


Figura 11. Imagen SEM de electrodo del ánodo de la CCM implementada con agua miel de café, para la observación cualitativa de la comunidad microbiana.

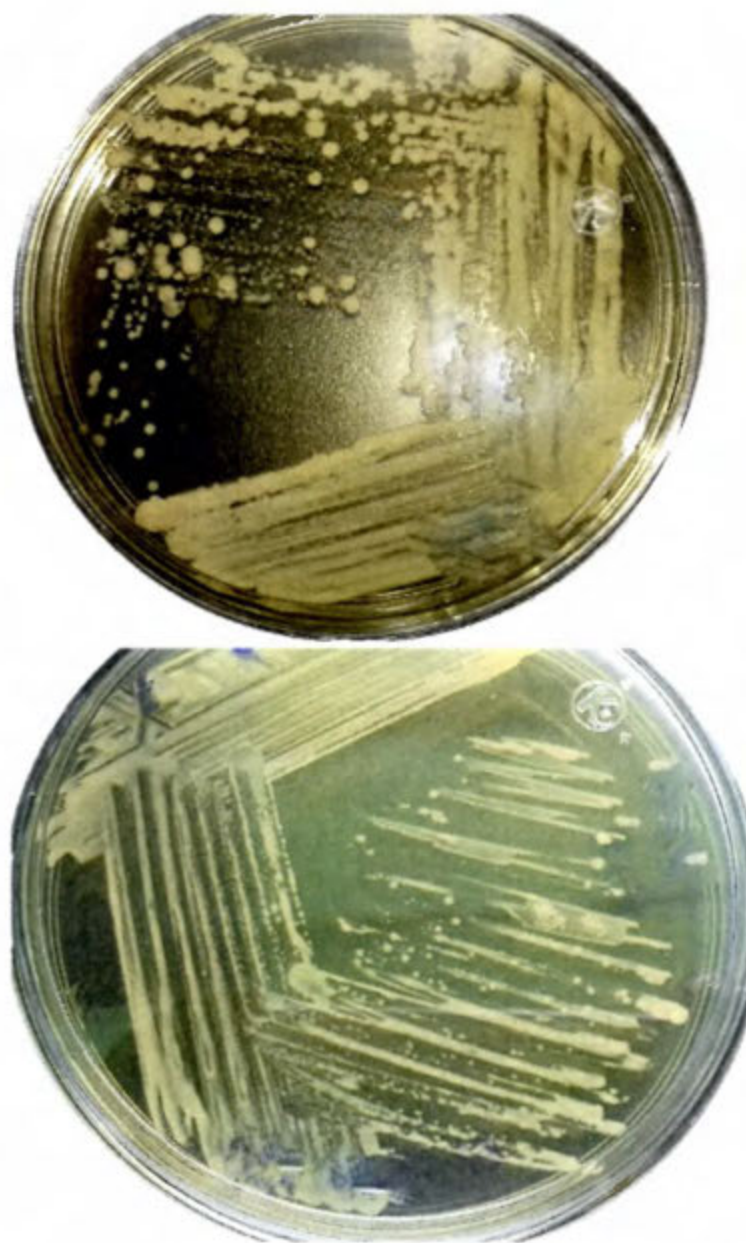


Figura 12. Bacterias cultivables extraídas de los electrodos de las celdas, para aislar las bacterias diferentes en apariencia.

En los electrodos se observó una predominancia de bacterias gram positivas en los aislamientos (Cuadro IX). No obstante, el aislamiento II-1-b, fue un bacilo gram negativo. También se distinguió, mediante la forma del cultivo y la prueba de gram, una levadura entre los aislamientos (Figura 13).

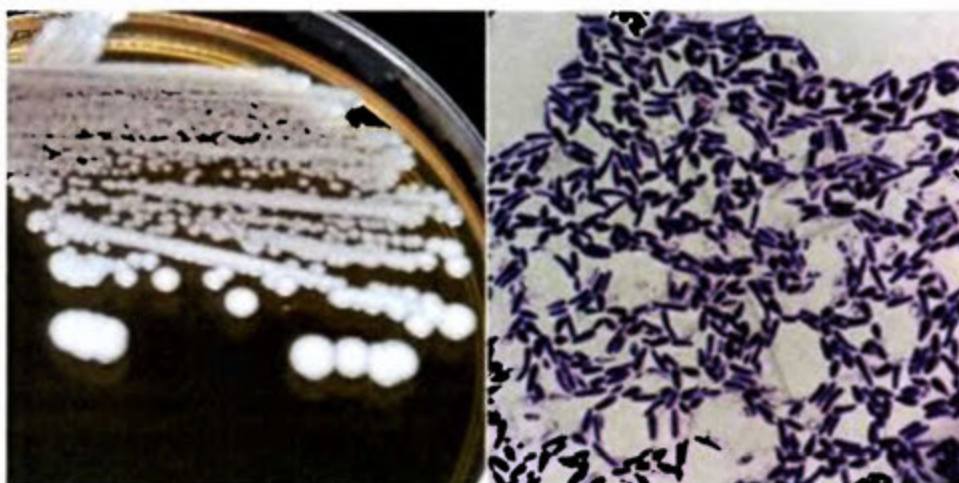


Figura 13. Levadura aislada de electrodo de ánodo de CCM, aislamiento 2B₂-T (cuadro I). A) cultivo de levadura en medio MRS. B) Prueba de tinción de gram de aislamiento 2B₂-T.

Con la información obtenida de las pruebas realizadas y del aspecto de las colonias bacterianas se lograron agrupar y seleccionar para la identificación nueve diferentes bacterias (Cuadro IX). Se observó que las bacterias repetidas no solo pertenecen a un mismo ensayo si no que se comparten en los electrodos de los

experimentos realizados en diferentes momentos, esto debido a que las pruebas se realizaron bajo condiciones similares y se utilizó el mismo sustrato.

Cuadro IX. Resultados de las pruebas de gram realizadas a los aislamientos bacterianos provenientes de los electrodos de los ánodos de las CCM implementadas con miel de café.

Aislamiento	Morfología	Bacterias identificadas
1A ₂ -P	Bacilo Gram +	Si
1B-N	Bacilo Gram +	No asociada a II-C ₁ -A
2A ₂ -B	Bacilo Gram +	Si
2B ₂ -T	Levadura	No
I-C ₁	Bacilo Gram +	Si
II-C ₁ - A	Bacilo Gram +	Si
II-C ₁ - B	Bacilo Gram +	Si
II-C ₁ - C	Bacilo Gram +	Si
I-C ₂	Bacilo Gram +	Si
II-C ₂ - A	Bacilo Gram +	No, asociada a II-C ₁ - C
II-C ₂ - B	Bacilo Gram +	No, asociada a II-C ₁ - A
II-C ₂ - C	Bacilo Gram +	Si
I-1-a	Bacilo Gram +	No, asociada a I-C ₂
I-2-c	Bacilo Gram +	No, asociada a 1A ₂ -P y 2A ₂ -B
I-2-d	Bacilo Gram +	No, asociada a I-C ₁ , I-C ₂
I-2-e	Bacilo Gram +	No, asociada a 1A ₂ -P y 2A ₂ -B
II-1-b	Bacilo Gram -	Si

5.2 Identificación de bacterias aisladas de los electrodos de ánodo de CCM.

Los resultados de las homologías de las bacterias secuenciadas se presentan en el Cuadro X. Como se observa (Cuadro X) los aislamientos coincidieron con varias especies de un mismo género e incluso con géneros diferentes, lo cual sirvió como base para encontrar la homología real o más cercana de cada bacteria, ya que se emplearon esas coincidencias para seleccionar las bacterias adecuadas para la realización del análisis filogenético.⁸³

Se observó que una de las bacterias se relaciona genéticamente con el género *Enterobacter*, mientras que las otras ocho con lactobacilos. Estos resultados indican que los electrodos de las CCM no presentan variabilidad de géneros, lo que se puede deber a las características del agua miel empleada.

El agua miel presenta una alta carga orgánica componiéndose mayormente de celulosa, hemicelulosa y lignina, además de contener glucosa y fructuosa (alrededor de 5%), compuestos cuya oxidación generan ácidos orgánicos lo que deriva en un bajo pH, el cual ronda en un valor de 3 a 4.^{11,79,85} Ambiente que limita la composición bacteriana de la comunidad existente en el agua miel, lo que explica que no se encuentren diferentes géneros bacterianos. Las bacterias pertenecientes a

Enterobacter y *Lactobacillus* poseen la capacidad de establecerse en ambientes con niveles de acidez alto.^{62,67}

Cuadro X. Resultados de estudio de la homología de las bacterias aisladas mediante la secuencia del ADN del gen 16S ARNr obtenidos con la herramienta de BLAST de la NCBI.

Nombre bacteria aislada	Homología
1A ₂ -P	99% <i>Lactobacillus casei</i> 99% <i>Lactobacillus paracasei</i> 99% <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
2A ₂ -B	100% <i>Lactobacillus casei</i> 100% <i>Lactobacillus paracasei</i> 100% <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
I-C ₁	99% <i>Lactobacillus casei</i> 99% <i>Lactobacillus paracasei</i>
II-C ₁ - A	100% <i>Lactobacillus harbinensis</i> 98% <i>Lactobacillus perolens</i> 98% <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 98% <i>Lactobacillus shezhenensis</i>
II-C ₁ - B	98% <i>Lactobacillus paracasei</i> 98% <i>Lactobacillus casei</i> 98% <i>Lactobacillus fermentum</i> 98% <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
II-C ₁ - C	99% <i>Lactobacillus casei</i> 99% <i>Lactobacillus paracasei</i>
I-C ₂	99% <i>Lactobacillus casei</i> 99% <i>Lactobacillus paracasei</i> 99% <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
II-C ₂ -C	99% <i>Lactobacillus casei</i> 99% <i>Lactobacillus paracasei</i>
II-1-b	99% <i>Enterobacter cloaee</i> 99% <i>Enterobacter homaechei</i> 99% <i>Enterobacter asburiae</i>

Además los morfotipos 1A₂-P, 2A₂-B, I-C₂; presentan coincidencia con *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteria que está relacionada con los lactobacilos⁸⁶ (Cuadro X) esto se debe a la poca especificidad del gen 16S ARNr para distinguir de manera eficiente, a nivel de especie e incluso de género, cuando se presenta una relación genómica muy cercana, razón por la se presentan tantas coincidencias en BLAST realizado para las bacterias aisladas.⁸⁷ Por otro lado la amplia coincidencia en el BLAST también se debe a que la base de datos incluye una gran cantidad de bacterias que no se encuentran documentadas e identificadas adecuadamente.⁸⁸⁻⁹⁰

La construcción de los arboles filogenéticos permite tener una idea más certera de la identidad real de los aislamientos secuenciados.⁹¹ En el Cuadro X se observa que el aislamiento II-1-b presenta coincidencia para tres especies de *Enterobacter* con un porcentaje muy alto, por otro lado el análisis filogenético (Figura 14) permitió asociar esta bacteria específicamente con *E. asburiae* JCM 6051^T, ya que se presentó una agrupación con alto porcentaje de coincidencia, con un “bootstrap” de 89%; además se observa una agrupación con un porcentaje de probabilidad del 83% con *Enterobacter cancerogenus* lo que coincide con otros estudios.^{67,92} Además se observa (Figura 14) una ramificación característica para este género en el árbol filogenético, con relaciones características, como la relación entre *E. cloacae* con *E. cowanii* con 70% de probabilidad y con *E. kobei* (65% contingencia)^{67,92}, sumado a las

asociaciones de las bacterias pertenecientes al grupo *E. cloacae* (*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cancerogenus*) que presentan porcentajes mayores 66%.^{67,92}

A pesar de que preliminarmente algunas de las bacterias coincidieron con *Leuconostoc pseudomesenteroides* en el análisis filogenético no se presentó una relación estrecha a éstas (anexo), se observó que este género se ve relacionado con los lactobacilos⁸⁶ por un ancestro cercano, sin embargo las cepas de *Leuconostoc* se agruparon en una rama separada de las bacterias de estudio (con una contingencia de la posición de 86%), por lo que no se utilizaron en el análisis final (Figura 15).

De las cuatro coincidencias preliminares para la bacteria II-C₁-A (Cuadro X) se logró por medio del análisis de filogenético una homología, con una verosimilitud de 89%, con *Lactobacillus harbinensis* SBT 10908^T (Figura 15) especie que presenta un mayor porcentaje de similitud en los resultados del BLAST (Cuadro X).

En el caso de los demás aislamientos no se logró hacer una diferenciación a nivel de especie como en los casos antes descritos, debido a la naturaleza de las coincidencias de estas bacterias, ya que exhiben similitud con *L. paracasei*, *L. casei* y *L. tolerans*, bacterias altamente relacionadas entre ellas. La similitud entre estas especies y las subespecies de estas es tan grande, que lograr una diferenciación entre las ellas es muy complicado.⁶⁶

La utilización de gen 16S ARNr y de otros marcadores en la diferenciación entre *L. paracasei* y *L. casei* no ha sido suficiente, debido a la cercana relación bioquímica entre éstas, además de que ambas especies pueden presentar polimorfismos y transferencia horizontal de genes, lo que complican los análisis filogenéticos.^{93,94} Estas similitudes son tan estrechas que incluso al analizar características fisiológicas como vías de fermentación, ensayo de carbohidratos, configuración de ácido láctico o análisis de peptidoglicanos no se obtienen resultados claros que permitan la diferenciación.⁹⁴

Se ha propuesto la utilización de la técnica Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) como solución para la diferenciación de especies tan relacionadas como *Lactobacillus sp.*, que permite caracterizar especies microbianas mediante la secuenciación conjunta de fragmentos de varios genes de mantenimiento, normalmente siete.^{87,93,94} Recientemente se logró un avance en la discriminación de especies del grupo *L. casei* mediante el desarrollo de un ensayo con la técnica MLST, donde se logró cebadores que permiten una metodología más robusta.⁹³

Cabe resaltar que las bacterias I-C₁-B y II-C₂-C, si bien se encuentran junto con los demás aislamientos y con las bacterias *L. paracasei* y *L. casei*, presentan una relación más cercana entre ellas que con las demás, al mostrar una pequeña agrupación distintiva con un "bootstrap" de 71%.

Los resultados de estudios filogenéticos (Figura 14Figura 15) presentan un nivel de confianza alto, en las posiciones y relaciones mostradas en los árboles, ya que los porcentajes exhibidos en las homologías de las bacterias aisladas son superiores al 71% lo que permite afirmar que las bacterias fueron bien caracterizadas, además las agrupaciones observadas son las reportadas en otros análisis para este grupo.^{95,96}

Por otro lado es importante mencionar que en la realización de los arboles filogenéticos se utilizaron cepas que han sido utilizadas previamente en análisis filogenéticos, para los géneros en cuestión, en diferentes estudios, además se evaluó el tipo de cepa utilizada y la documentación que las respaldan, al ser bacterias de colección, para garantizar mayor confiabilidad en los resultados. Las coincidencias del BLAST con mayor porcentaje de similitud no fueron empleadas en el análisis filogenético al no cumplir las características mencionadas.

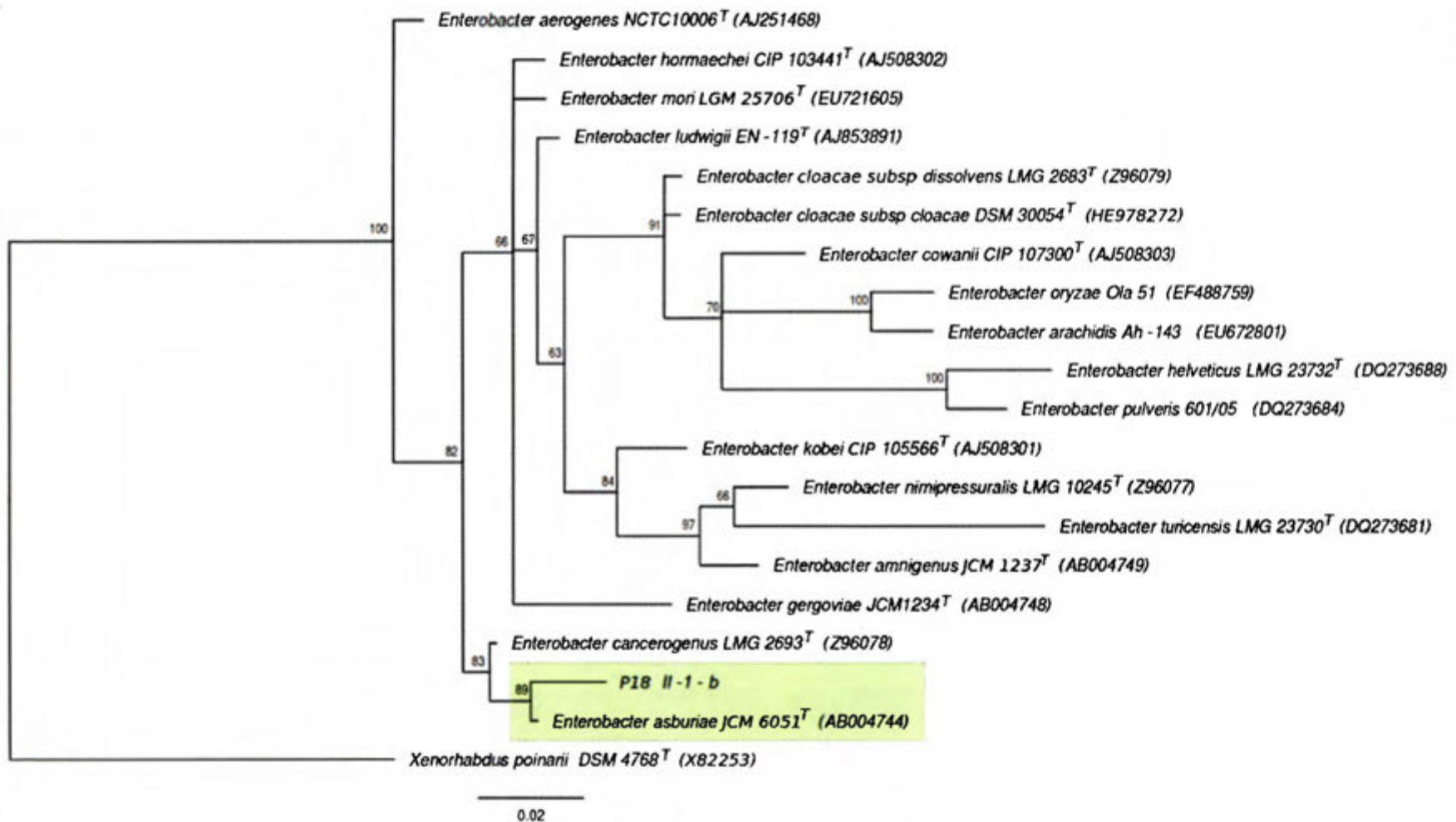


Figura 14. Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA para bacteria II-1-b y especies de *Enterobacter*.

Con *Xenorhabdus poinarii* DSM 4768^T como outgroup

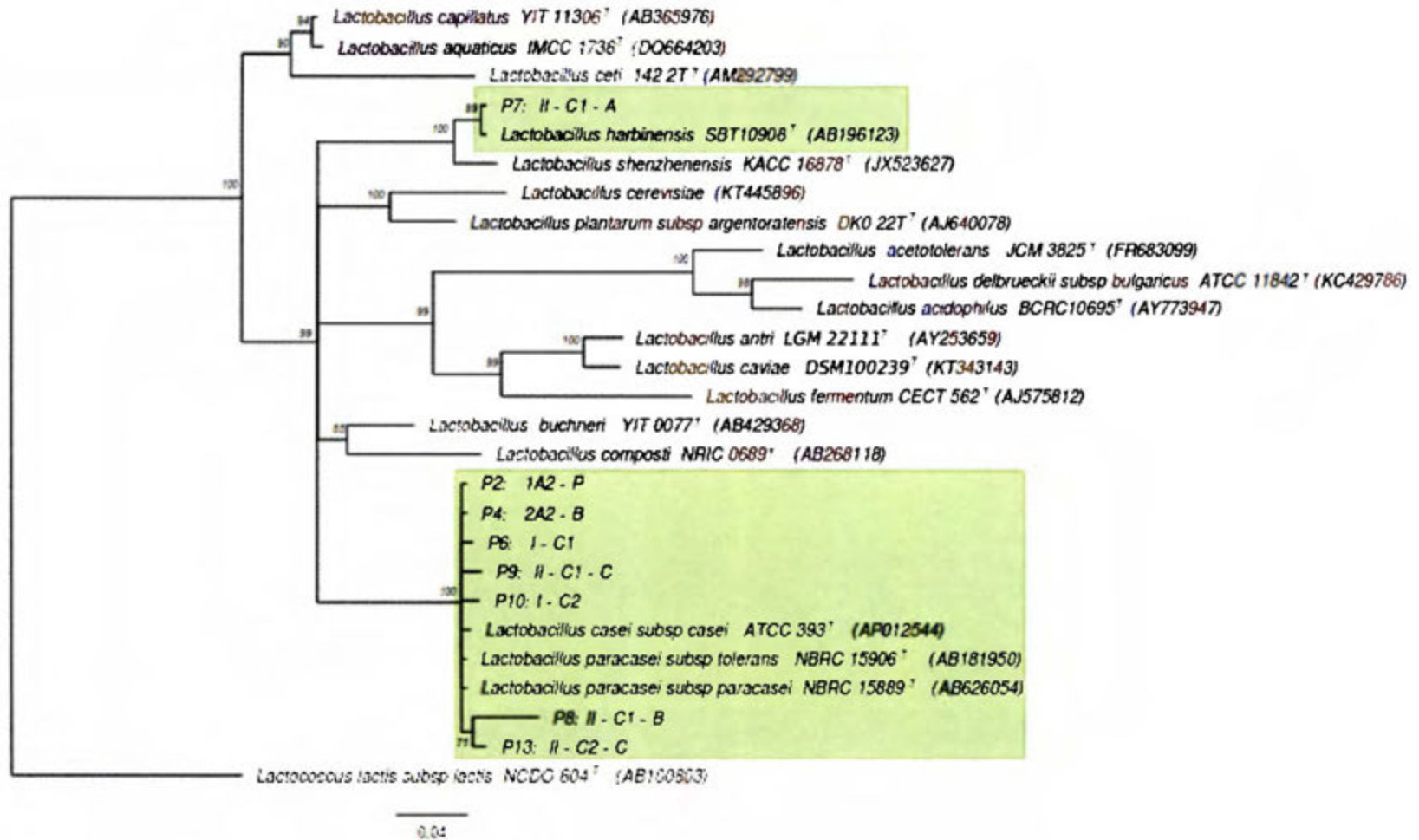


Figura 15. Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA bacterias aisladas de ánodos de CCM con agua miel de café y especies de *Lactobacillus*. Con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T como outgroup.

5.3 Selección de bacterias para la realización de pruebas en CCM

Se seleccionó las bacterias II-C1-A y II-1-b ya que corresponden a especies diferentes de bacterias. Estos resultados sirvieron de base para la búsqueda de evidencia electrogénica de estas bacterias.

Los lactobacilos como se mencionó anteriormente (sección 3) son de gran interés en muchas áreas, en CCM se han empleado bacterias como *L. bulgaricus* con la obtención de corriente máxima de 0,302 mA.⁶³ Por otro lado al utilizar *L. pentosus* se ha obtenido 8,09 mW/m² en CCM con agua residual de productos lácteos⁹⁷ y 5,04 mW/m² con agua residual sintética con 50 mg/L de extracto de levadura.⁶⁴ En CCM con agua residual doméstica se encontró en la biopelícula del ánodo las bacterias *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus casei*, y se logró 650 mA/m³ al inocular *L. casei* en las CCM.⁶⁵ En sueros residuales de la industria de producción de quesos se obtuvo 75 μ A con el uso de *L. bulgaricus* y 68 μ A con *L. casei*.⁶⁶

En lo que respecta a bacterias del género *Enterobacter*, en CCM con lodos activados se obtuvo una densidad de corriente máxima de 2,26 A/m² asociada a *Enterobacter sp.*⁷⁰ Además en CCM con agua residual enriquecida con acetato se obtuvo 0,42 mA producto de la inoculación de *Enterobacter cloacae*.⁹⁸ Esta misma bacteria se utilizó en CCM con diferentes sustratos en los se obtuvo densidad de corriente máxima de 493 mA/m² con sacarosa, 486 mA/m² con glicerol, 328 mA/m² con glucosa, en n-acetil-D-glucosamina 307 mA/m², 119 mA/m² con celulosa y 62 mA/m² con lactato.⁹⁹

Estos reportes se consideraron alentadores para seleccionar las especies II-1-b (*E. asburiae*) y II-C₁-A (*L. harbinensis*) para realizar la segunda etapa del estudio y realizar la inoculación de las CCM con estas bacterias.

5.4 Valoración del efecto de inoculación de las bacterias en la CCM

5.4.1 Eficiencia del tratamiento biológico y eléctrico de la CCM

En las Figuras 16, 17 y 18 se muestran los resultados de los experimentos de las CCM con sustrato de agua miel diluida y sin diluir inoculada con las bacterias seleccionadas. Tal y como se observa en las figuras, inicialmente se da un incremento pronunciado en la generación de corriente en las CCM hasta llegar a un punto máximo, se estabiliza por un tiempo para posteriormente disminuir lentamente; en el caso del experimento con la inoculación de *Enterobacter asburiae* (II-1-b) con sustrato de agua miel sin diluir (Figura 16) y el ensayo con la *Shewanella* (Figura 18) la fase de estabilización se prolongó por más tiempo. El aumento pronunciado de corriente ocurre en los dos primeros días producto de la fermentación de los compuestos de carbono por parte de la flora microbiana y está relacionado probablemente con la fase exponencial de crecimiento bacteriano, posteriormente a la obtención del máximo de corriente se iniciaría una fase estacionaria.¹⁰⁰

Para los ensayos realizados con sustrato de agua miel de café a baja concentración inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) la prueba t student ($p=0,05$) indicó que se generó una corriente máxima significativamente menor para ambos experimentos con respecto a la corriente generada por el electrodo control (Anexo 4: Figura E20 y E22). Al darse una disminución en la materia orgánica disponible y al aumentar la cantidad de microorganismos presentes es de suponer que las bacterias utilicen rutas más simples para lograr el crecimiento y no se de una liberación de electrones

en la misma proporción que en la celda sin inocular; ya que en las CCM la mayoría del sustrato se utiliza para el crecimiento bacteriano y no para la generación de electricidad.^{101,102}

Al analizar la corriente máxima generada entre los experimentos diluidos inoculados con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) no se comprueba por medio del ANOVA ($p=0,05$) que haya una influencia positiva de estas especies en el rendimiento de CCM (Figura 19). Se obtuvo una corriente máxima de 1,9 mA en una CCM con agua residual inoculada con *Enterobacter cloacae*, valor no muy lejano a los obtenidos en los ensayos.⁹⁸

En el caso de las CCM implementadas con sustrato de agua miel sin diluir la prueba t student ($p=0,05$) mostró que la corriente máxima es significativamente mayor en los electrodos inoculados en comparación que en el electrodo control (Figuras 16, 17 y 18). Se ha observado que a mayor concentración del sustrato se da una mayor generación de corriente, ya que se da un aumento en la velocidad de las reacciones enzimáticas asociadas a la liberación de los electrones; sumado a que la mayor cantidad de microorganismos en el medio, producto de la inoculación, incrementa el número de procesos metabólicos que se pueden llevar a cabo.^{101,103}

Al comparar la corriente máxima generada por electrodos con las diferentes inoculaciones en la CCM con el sustrato de agua miel sin diluir (Figura 20), no se pudo comprobar diferencia significativa en la inoculación entre la corriente generada por las especies utilizadas como inóculos.

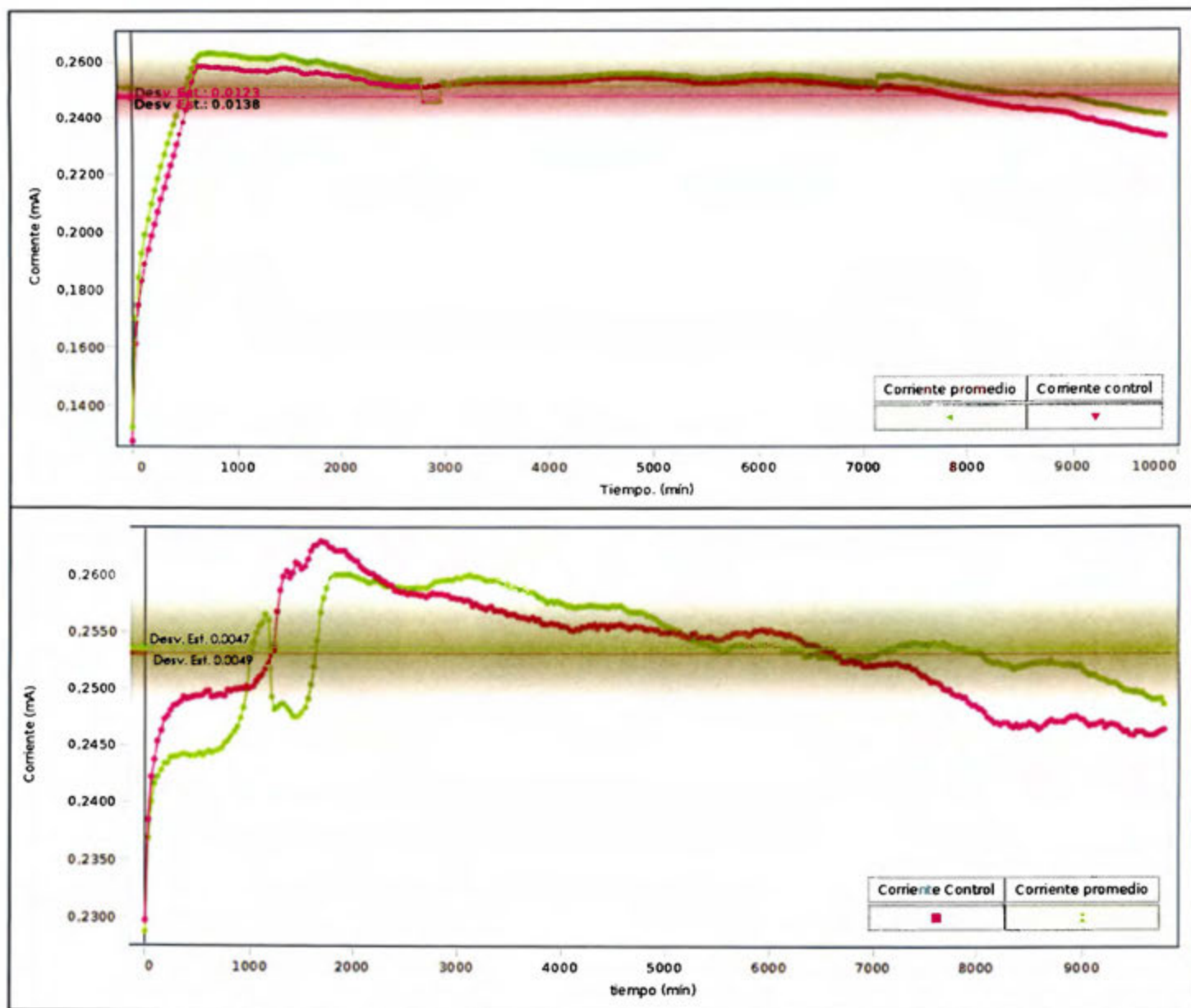


Figura 16. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel

de café inoculada con II-1-b. A) con agua miel sin diluir. B) Con agua miel diluida.

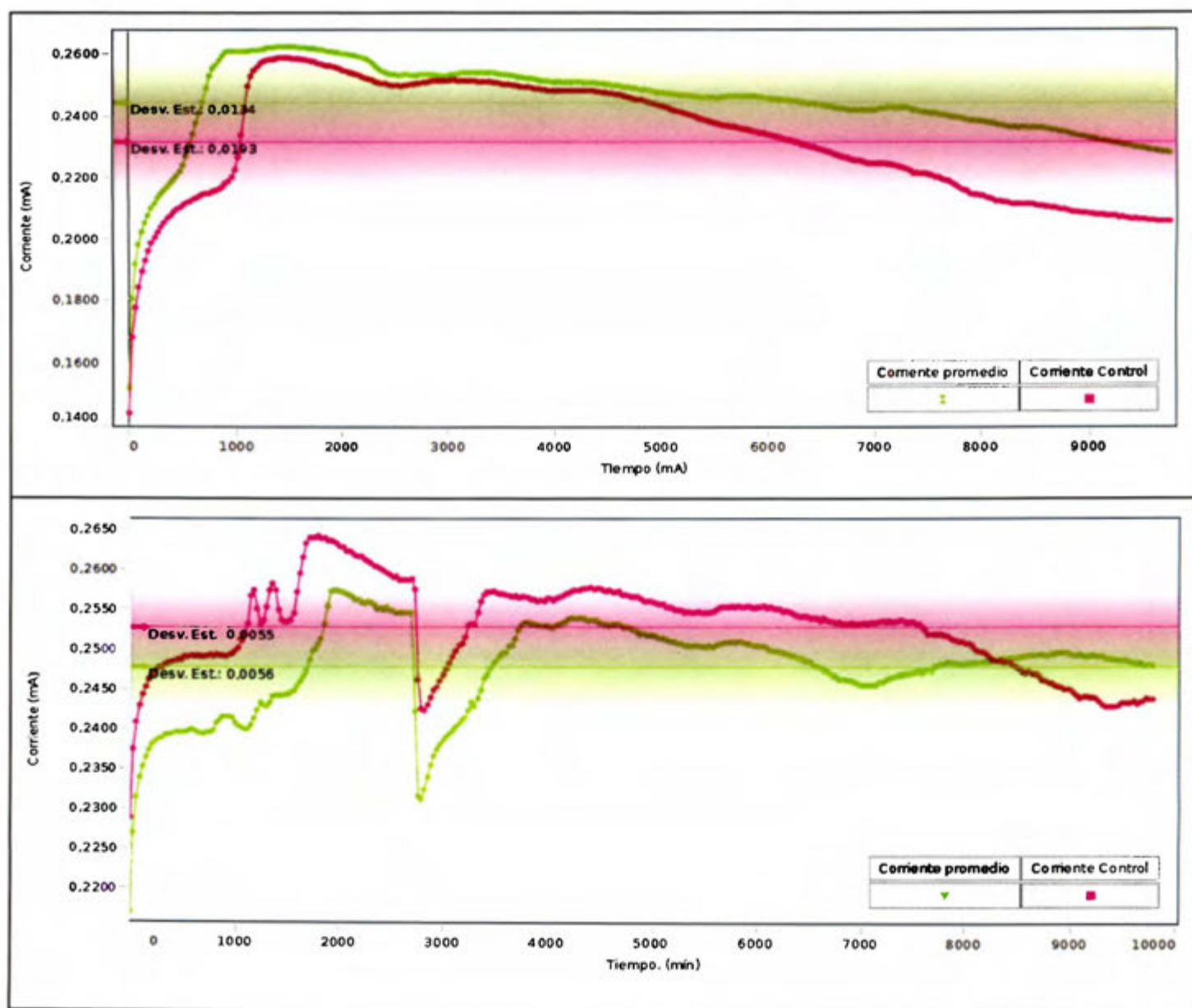


Figura 17. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel

de café inoculada con II-C1-A. A) con agua miel sin diluir. B) Con agua miel diluida.

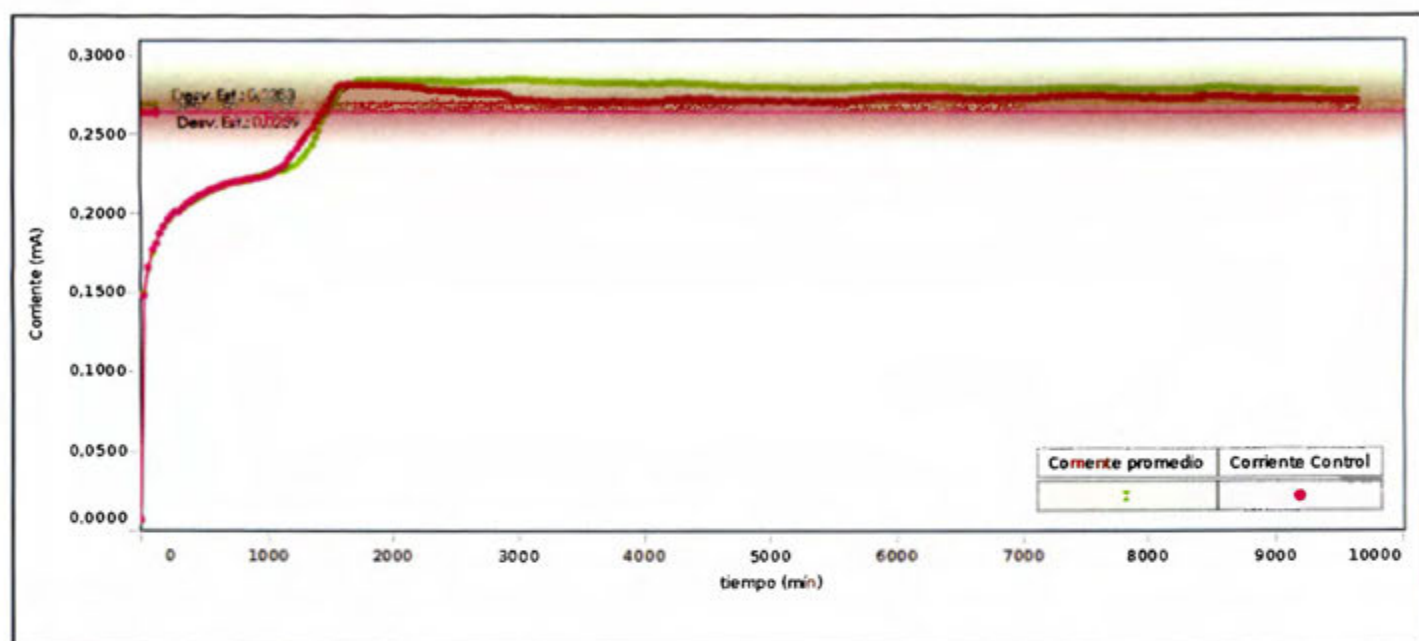


Figura 18. Datos de corriente en función del tiempo obtenidas en las CCM con agua miel de café sin diluir inoculada *Shewanella oneidensis*.

Cuadro XI. Resumen de resultado obtenidos en prueba t student para cada ensayo realizado al comparar la corriente máxima en el electrodo inoculado contra el electrodo control. Con un nivel de confianza de 95%.

	II-1-b sin diluir	II-1-b diluido	II-C1-A sin diluir	II-C1-A diluido	<i>Shewanella oneidensis</i>
Valor p	$6,197 \times 10^{-13}$	1	$3,783 \times 10^{-12}$	1	$1,049 \times 10^{-10}$
Hipótesis aceptada	Alternativa	Nula	Alternativa	Nula	Alternativa

Ho= Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.

HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control

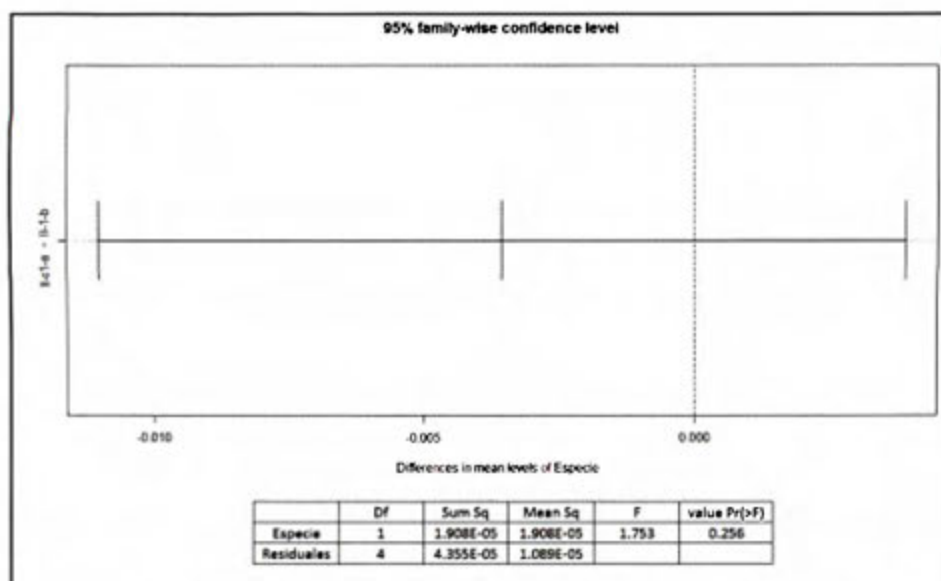


Figura 19. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima generada en CCM con agua miel de café diluida inoculadas con II-1-b y II-C1-A.

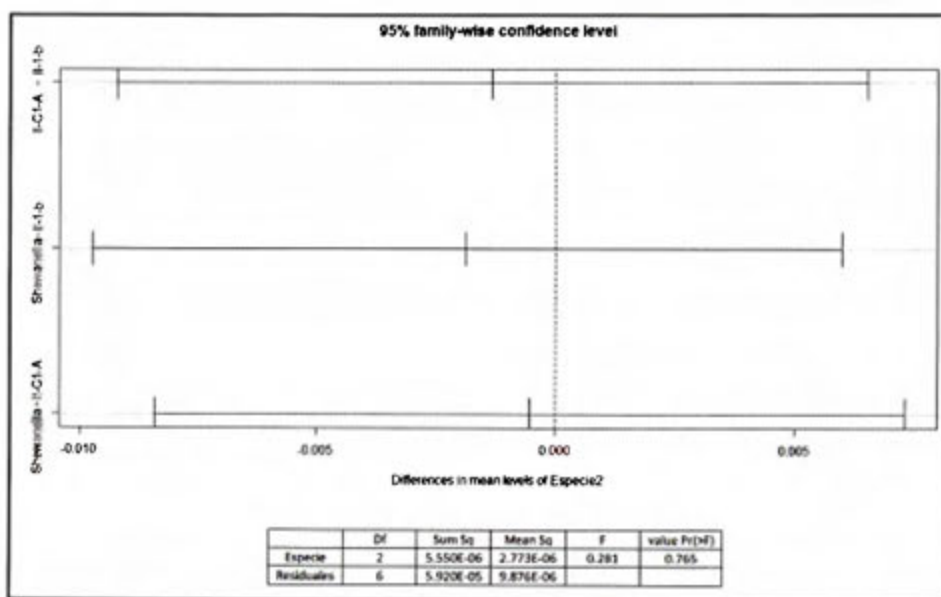


Figura 20. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de corriente máxima generada en la CCM con sustrato de agua miel sin diluir inoculadas con II-1-b, II-C1-A y *Shewanella*.

En el estudio del efecto de las especies inoculadas sobre la densidad de corriente máxima generada por las CCM, a través de la ANOVA ($p=0,05$), no se comprobó una diferencia significativa, las discrepancias absolutas entre el electrodo inoculado y el control oscilaron en valores de $3-6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Anexo 4, Figura E25, E29). El valor de densidad de corriente más alto fue de $8,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, valor que al compararlo con datos de otros sustratos es muy bajo, por ejemplo en sustratos como ácido glucorónico²¹ que se obtuvo $1180 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y agua residual de la industria de chocolate²⁴ $302 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (ver Cuadro II, sección 2), sin embargo se puede observar que en el caso de CCM con estiércol de granjas¹⁹ el valor es menor ($4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

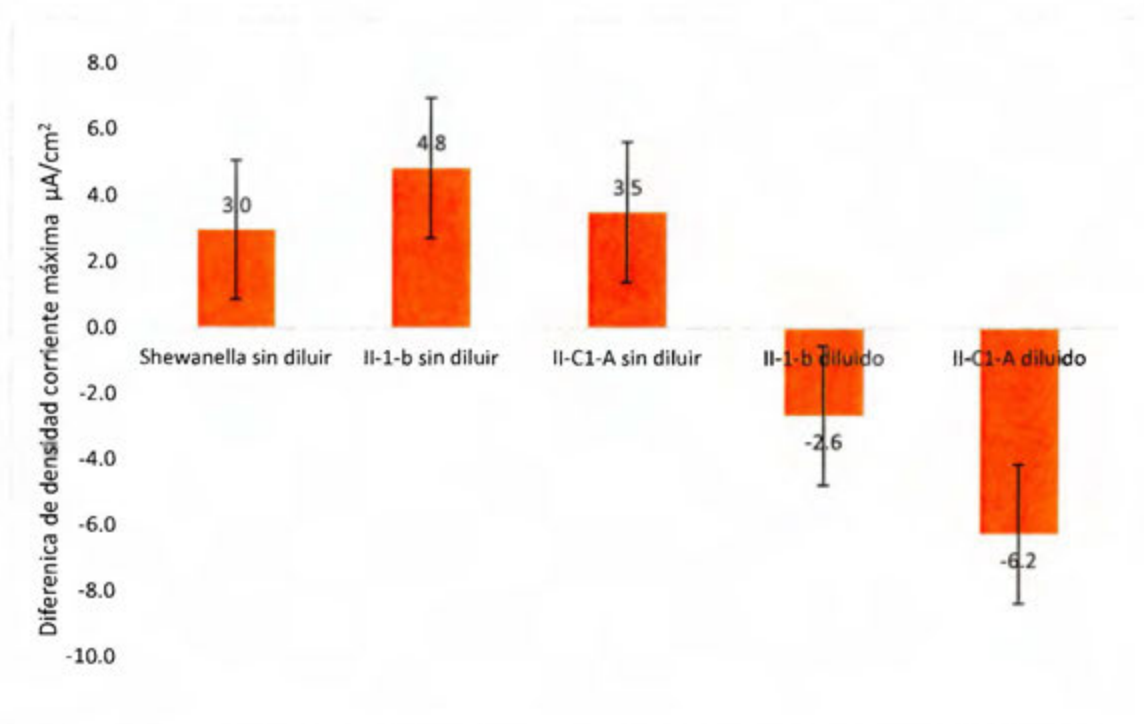


Figura 21. Comparación de la diferencia de la densidad de corriente máxima de las CCM con agua miel de café inoculadas con las bacterias seleccionadas.

En cuanto a la remoción de carga orgánica se observa que los valores oscilan entre 11 - 53 % remoción (Figura 22) siendo mayores en los ensayos con agua miel sin diluir. En el ensayo con la *Shewanella* se presenta el menor valor de porcentaje de remoción de la carga orgánica tanto en el electrodo control como en el inoculado, lo que es un indicativo de que las discrepancias en los resultados de este ensayo con respecto a los demás se presentaron por las condiciones ambientales en que se desarrollaron. Además los análisis de varianza ($p=0,05$) no indican diferencias significativas producto de las especies inoculadas al comparar la discrepancia entre el electrodo inoculado y el control (ver anexo, Figura E26 y E30). Por lo que no podría afirmarse que la concentración del sustrato ocasione una inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados reflejan que el tratamiento biológico del agua miel de café es medianamente eficiente, ya que se lograron remociones cercanas al 50% de la carga orgánica total del agua miel de café en un periodo de 7 días y teniéndose reportes de remociones de hasta 80% en seis días.⁵²

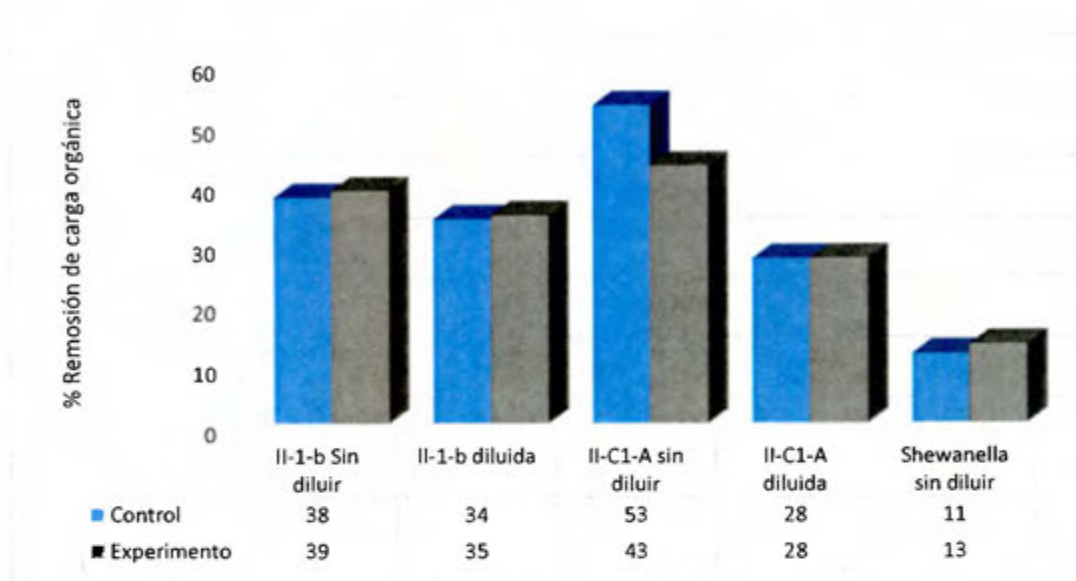


Figura 22. Comparación del porcentaje de remoción de la carga orgánica en el tratamiento del agua miel de café en las CCM con las diferentes bacterias inoculadas.

En el gráfico mostrado en la Figura 23 se observa el rendimiento culombico de los diferentes tratamientos. Llama la atención que el rendimiento en los ensayos diluidos, comparados con los ensayos con sustrato de agua miel sin diluir son mucho mayores, esto puede deberse a que en sistemas con alta demanda química de oxígeno los microorganismos optan por rutas metabólicas menos eficientes en la transferencia de electrones hacia los electrodos de la CCM.^{4, 5, 6} Como se observa en la ecuación 5, de la sección experimental, la eficiencia culombica depende inversamente de la cantidad de materia orgánica removida por lo tanto, a pesar de que en los experimentos con sustrato sin diluir se presenta una remoción de 50% la diferencia entre los DQO final e inicial es

mayor en un orden de magnitud que en los experimentos con el sustrato diluido, lo que hace que el dato obtenido sea tan bajo (Figura 23).

Al comparar los ensayos de las CCM realizadas con el agua miel sin diluir, por medio de análisis de varianza ($p=0,05$) (Ver anexo, Figura E27, E31), no existe diferencias significativa en la eficiencia culombica de las CCM por lo que no se puede comprobar que las bacterias tengan una influencia significativa. En agua residual tratada con *Enterobacter cloacae* se obtuvo una eficiencia culombica de 3,2% con un porcentaje de remoción de carga orgánica de 58%⁹⁸, valores muy cercanos a los obtenidos en las CCM con sustrato diluido.

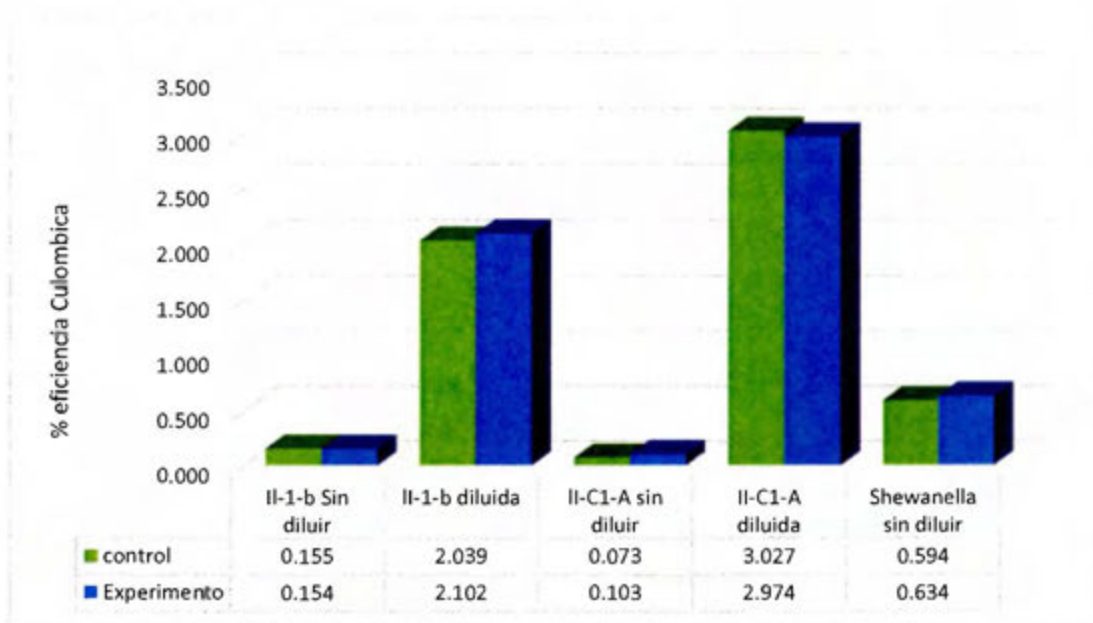


Figura 23. Comparación de las eficiencias culombicas de las CCM con agua miel de café inoculada con las bacterias seleccionadas.

Si bien se han empleado CCM que presentan generación de corriente y eficiencias coulombicas muy grandes en comparación con las realizadas en este estudio, en su mayoría utilizan sustratos simples con concentración de crecimiento idóneas y cargas orgánicas bajas, como es el caso de CCM con acetato (60 % eficiencia coulombica)¹⁷, glucosa (23% eficiencia coulombica)²¹ y ácido glucónico (30% eficiencia coulombica)²¹ por mencionar algunos ejemplos; sin embargo en sustratos más complejos los rendimientos de las CCM tienden a ser más bajos ya que se necesita una comunidad microbiana más diversa, además de la posibilidad de presencia de compuestos que limiten el crecimiento bacteriano.¹⁰¹

El agua miel de café está compuesto en un mayor porcentaje por celulosa y lignina (alrededor de 20%)^{79,85}, compuestos que no son metabolizados por todo tipo de bacteria. Además el proceso de degradación de este tipo de sustancia en conjunto con la generación de electricidad es poco común y hay poca evidencia del empleo de los dos procesos en las CCM.²⁵ Se ha observado que consorcios de las bacterias *C. cellulolyticum* y *G. sulfurreducens* poseen la capacidad de generar electricidad en el proceso de metabolización de celulosa y lignina en CCM.^{100,104} Las bacterias inoculadas en los ensayos no se han reportado con la capacidad de metabolizar este tipo de sustrato por lo que los rendimientos de la CCM están limitados a la materia que es viable, que representa no más del 5 % del agua miel.^{79,85}

Si bien los resultados indican que el proceso de tratamiento para el agua miel de café para la generación de electricidad en CCM puede mejorar, dada la complejidad del sustrato es un comienzo alentador.

5.4.2 Efecto de la inoculación en la comunidad microbiana del electrodo del ánodo.

En la Figura 24 se muestra el patrón resultante del análisis de la comunidad bacteriana presente en los electrodos en los dos ensayos realizados con la inoculación de II-1-b (*E. asburiae*) y *Shewanella oneidensis*. Las bandas b, c y d están presentes tanto en los electrodos inoculados con las bacterias en estudio como en los electrodos controles.

Las bandas b y d se encontraron bien definidas en los electrodos mientras que la banda c se presentó con diferentes intensidades (Figura 24), siendo más tenue en el electrodo control del tratamiento con II-a-b y en el III electrodo del tratamiento con *Shewanella oneidensis*. La diferencia de las intensidades podría atribuirse a una diferencia en la concentración de la bacteria asociada a esta banda, siempre y cuando se hayan usado un volumen definido en cada pocillo. La inoculación de la cepa *Enterobacter* (II-1-b) parece no favorecer la presencia de la bacteria asociada a la banda c, ya que en el control se observa de forma más intensa que en los electrodos inoculados. Sin embargo al no observarse una similitud entre los electrodos inoculados con la *Shewanella* no se puede afirmar que la diferencia observada se deba a la inoculación de la bacteria.

Por otro lado las bandas e, f, g, i y j solo se observaron en los electrodos del ensayo en el que se inoculó *Enterobacter asburiae* (II-1-b) (Figura 24), estas bandas se encuentran en los cuatro electrodos, lo que indica que esta banda no sufrió alteración producto de la inoculación realizada, aunque si es notorio que las bandas en el III electrodo son más sutiles, lo que implica una afectación particular en la CCM de este electrodo lo que ocasionó una

menor concentración de bacterias asociadas a estas bandas ya que únicamente el electrodo III presenta la diferencia.

En el ensayo en el que se inoculó *Shewanella oneidensis* (Figura 24) se encontraron las bandas k y l; que se comparten en los cuatro electrodos de este tratamiento pero no están presentes en los otros electrodos de la prueba con *Enterobacter*. Si bien existe una diferencia entre los dos ensayos con respecto a estas bandas, no se debe a la inoculación de la bacteria en las CCM, ya que también está presente en el control. Esta discrepancia entre ensayos se puede deber a la variabilidad propia del agua miel de café y además a las condiciones de las CCM, ya que se implementaron en distintos momentos.^{105,106}

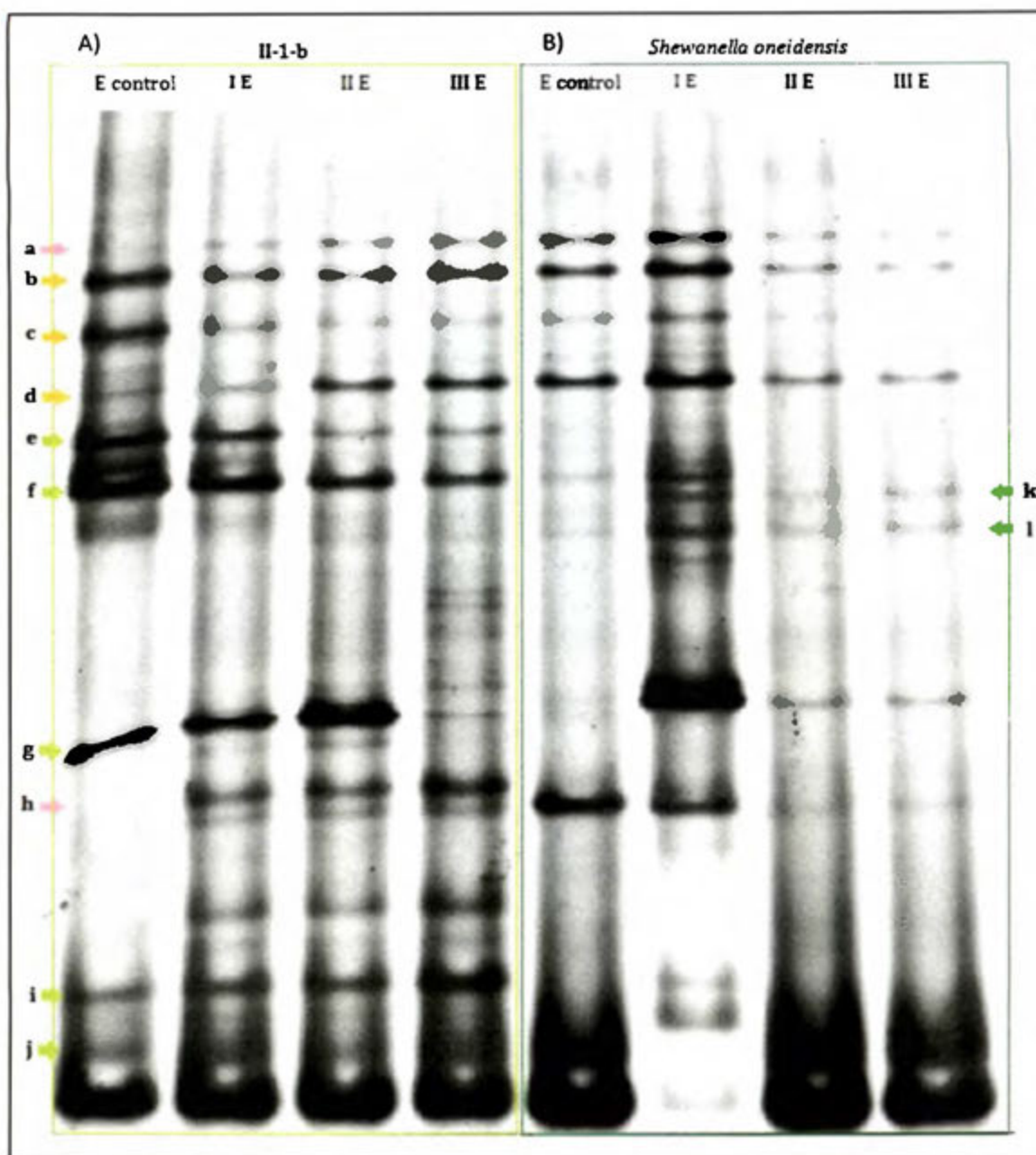


Figura 24. Patrón de banda de PCR-DGGE de la región v3 de ADNr 16S de bacterias amplificadas con el par de cebadores 357FGC-518R. A) CCM inoculadas con II-1-b. B) CCM inoculadas con *Shewanella oneidensis*

En los resultados de DGGE se observó que dos bandas; bandas a y h (Figura 24); están presentes en todos los electrodos de los dos ensayos con excepción del electrodo control del tratamiento con inóculo *Enterobacter asburiae*, lo que indica que factores a nivel de microambiente pudieron afectar a los microorganismos relacionados con estas bandas.^{107,108}

La diferencia en las bandas en cada electrodo se evidencia en el dendrograma generado a partir de los resultados del DGGE (Figura 25), se observa que se genera una división entre los dos ensayos realizados, esta separación es esperable, dado a que las CCM se realizaron en dos momentos diferentes, y aunque se emplearon las mismas condiciones ambientales y mismo sustrato, mediaron procesos de congelación y descongelación los cuales afectan directamente la comunidad microbiana existente en el agua miel;^{105,106} y como consecuencia de esto, no se tiene una semejanza cercana entre los dos controles.

En el ensayo realizado con la bacteria *Enterobacter asburiae* se puede observar que existe una diferencia importante entre la comunidad microbiana de los electrodos, la cual es mayor al 10%. La composición de la comunidad microbiana de la biopelícula de los electrodos I y II está más cercana entre ellos que con los demás electrodos, con una homología de casi el 90%, esta cercanía se debe probablemente a que estos electrodos estaban en el ánodo de la misma CCM, con las mismas condiciones ambientales.^{105,106} A su vez se observa (Figura 25) una asociación cercana al 80% de homología entre la agrupación de los electrodos I y II con el electrodo III, cabe destacar que estos electrodos corresponden a las CCM que fueron inoculadas con la bacteria, mientras que la relación del electrodo

control con los demás electrodos es de aproximadamente 65% de homología, lo cual, si se toma en cuenta la variabilidad propia del sistema, indica que la inoculación con la bacteria *Enterobacter asburiae* afectó la comunidad bacteriana en los electrodos I, II y III.

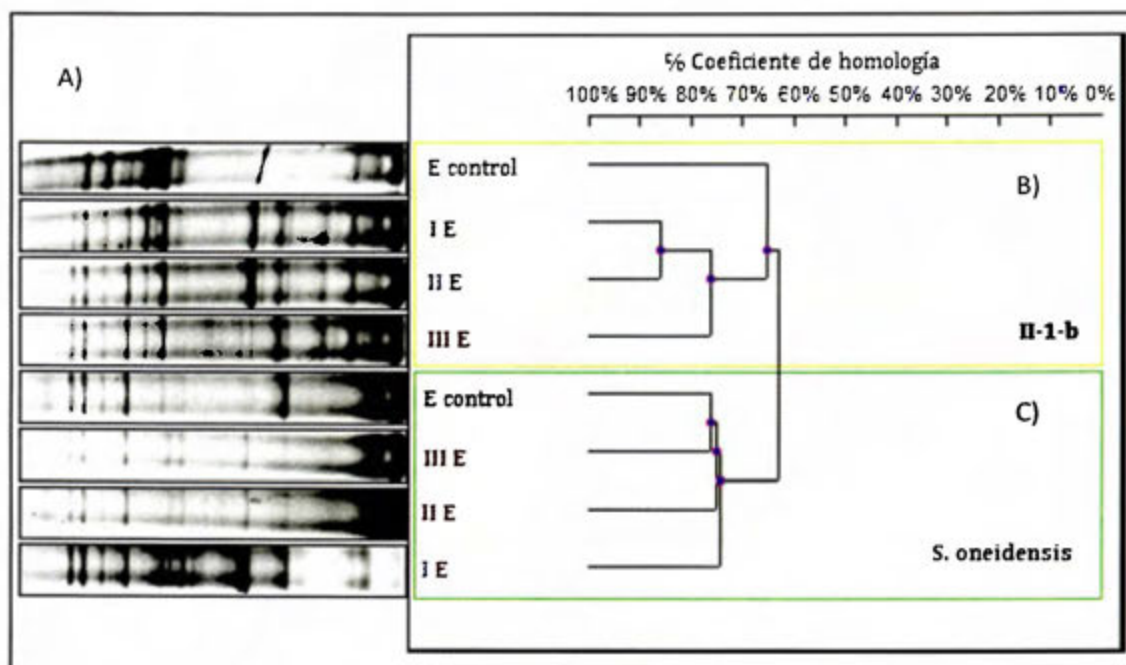


Figura 25. Dendrograma de patrón de bandas obtenido a partir de DGGE basado en el región V3 de ADNr 16S de la comunidad microbiana (bacterias) presente en los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café. A) bandas del DGGE. B) CCM inoculadas con II-1-b. C) CCM inoculadas con *S. oneidensis*. Los perfiles se agruparon por correlación de Dice y el método de grupos de pares no ponderados por promedios aritméticos (UPGMA, por siglas en inglés).

Las agrupaciones generadas en el ensayo realizado al inocular *Shewanella oneidensis* están más cercanas unas de otras según su homología que en el caso anterior (Figura 25). La mayor similitud entre los electrodos se da entre el control con el III electrodo (alrededor 75% similitud), el electrodo I es que difiere en mayor medida a la los demás electrodos, sin embargo esta diferencia es alrededor de 3%. Lo que indica que no existió un factor de cambio que provocara una discrepancia en la comunidad microbiana de los electrodos de la CCM.

El agua miel de café es un sustrato de composición compleja, que presenta un alto porcentaje de material de difícil degradación (~20%) y una acidez que lo convierten en un ambiente muy selectivo no accesible a todo tipo de microorganismo,^{79,85} lo que pudo ocasionar que la *Shewanella oneidensis* no lograra crecer en esas condiciones, sin alterar la comunidad microbiana de los electrodos. La *Shewanella oneidensis* tiene preferencia por el lactato como sustrato y ambientes con pH entre 6-8.^{43,44,71-73}

La secuenciación de las bandas producto de amplificación a partir de los marcadores generales para hongos ITS1/ITS4 anidado en ITS1/ITS2 mostró la presencia de las levaduras perteneciente al género *Pichia* y *Sacharomyces*.

6. Conclusiones generales y Recomendaciones

La investigación realizada permitió el aislamiento e identificación de bacterias electrogénicas presentes en los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café del Beneficio Coopetarrazú, no existió gran variabilidad de especies, se tuvo una dominancia del género *Lactobacillus*; sin embargo se encontró una bacteria perteneciente al género *Enterobacter* y la presencia de levaduras del género *Pichia* y *Saccharomyces*.

La bacteria II-1-b coincidió con la *Enterobacter asburiae* JCM6051^T y II-C₁-A con *Lactobacillus harbinensis* SBT10908^T. Las demás bacterias se agruparon con *Lactobacillus casei sub casei* ATCC 393T; *Lactobacillus paracasei sub tolerans* NBRC 15906T y *Lactobacillus paracasei sub paracasei* NBRC 15889T.

En el análisis de los parámetros de corriente máxima, densidad de corriente máxima, porcentaje de remoción de carga orgánica y eficiencia culombica de la CCM al comparar el valor generado por el electrodo control y electrodo inoculado, se demostró que la inoculación de las diferentes bacterias no generó una diferencia significativa. Por lo tanto no se pudo comprobar el efecto del inóculo en el rendimiento de la CCM.

Los resultados indican que en los procesos con sustrato diluido el sistema operó una ruta metabólica que no favorece la liberación de electrones hacia los electrodos del ánodo, lo que pudo ser producto de las características del agua miel.

Los factores que pueden afectar el desarrollo de las bacterias en los electrodos de las CCM pueden ser muy diversos, en el caso de la inoculación de la bacteria *Enterobacter*

asburiae se evidenció una afectación sobre la comunidad microbiana presente en los electrodos producto de la adición de esta bacteria. Por otro lado la inoculación de la *Shewanella oneidensis* no fue un factor que cambiara la comunidad microbiana en los electrodos. A su vez las características de la composición del agua miel parecen no haber favorecido el crecimiento de la *Shewanella* inoculada, al ser un sustrato muy complejo.

Para mejorar la identificación de las bacterias faltantes se recomienda utilizar el sistema MLST con secuencias de genes de mantenimiento como *mutL* (reparación de ADN), *tuf* (factor de elongación), *recA* (recombinación homóloga de ADN), *rpoA* (cataliza la transcripción de ADN), *pepR* (regulador transcripcional), *dnaK* (replicación de ADN) y *dnaJ/dnaK* (respuesta a la hiperosmótica).

Se sugiere probar una de las bacterias del grupo *L. casei/paracasei* ya que existen reportes de bacterias electrogénicas. Además de analizar otras condiciones como pH, temperatura, enriquecimiento del sustrato y el efecto de mediadores en las CCM inoculadas con las bacterias de estudio.

Al tener altas cantidades lignina, celulosa y hemicelulosa en el sustrato, se propone la utilización del consorcio *C. cellulolyticum* y *G. sulfurreducens*, bacterias que logran metabolizar estos compuestos en conjunto con la generación de electrones, para mejorar el rendimiento de las CCM.

7. Referencias

1. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* **74**, 63–67 (2000).
2. Vidalí, M. Bioremediation . An overview. *Pure Appl. Chem.* **73**, 1163–1172 (2001).
3. Du, Z., Li, H. & Gu, T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* **25**, 464–482 (2007).
4. Shukla, A. K., Suresh, P., Berchmans, S. & Rajendran, A. Biological fuel cells and their applications. *Curr. Sci.* **87**, 455–468 (2004).
5. Reddy, L. V., Pradeep Kumar, S. & Wee, Y.-J. Microbial Fuel Cells (MFCs) -a novel source of energy for new millennium. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 956–964 (2010).
6. Rabaey, K. & Verstraete, W. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* **23**, 291–298 (2005).
7. Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L. & Vanbroekhoven, K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* **101**, 1533–1543 (2010).
8. Mora Ramirez, S. S. *Desempeño del sector agropecuario en el 2017.* (2018).

9. ICAFE. Informe de actividad cafetalera. *Instituto de café de Costa Rica* (2016). Available at: <http://www.icafe.cr/sector-cafetalero/informacion-de-mercado/informes-de-la-actividad-cafetalera/>. (Accessed: 7th June 2017)
10. Esquivel, P. & Jiménez, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* **46**, 488–495 (2012).
11. Murthy, P. S. & Madhava Naidu, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resour. Conserv. Recycl.* **66**, 45–58 (2012).
12. Singh, D., Baranwal, Y., Pratap, D., Kumar, B. & Chaudhary, R, K. Microbial fuel cells: A green technology for power generation. *Ann. Biol. Res.* **1**, 128–138 (2010).
13. Arends, J. B. A. & Verstraete, W. 100 years of microbial electricity production: three concepts for the future. *Microb. Biotechnol.* **5**, 333–346 (2012).
14. Potter, M. C. & Waller, A. D. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **84**, 260–276 (1911).
15. Davis, J. B. & Yarbrough, H. F. Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell. *Science (80-)*. **137**, 615–616 (1962).
16. Xing, D., Cheng, S., Logan, B. E. & Regan, J. M. Isolation of the exoelectrogenic denitrifying bacterium *Comamonas denitrificans* based on dilution to extinction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1575–1587 (2010).
17. Logan, B., Cheng, S., Watson, V. & Estadt, G. Graphite fiber brush anodes for

- increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3341–3346 (2007).
18. Zuo, Y., Maness, P.-C. & Logan, B. E. Electricity Production from Steam-Exploded Corn Stover Biomass. *Energy & Fuels* **20**, 1716–1721 (2006).
 19. Scott, K. & Murano, C. A study of a microbial fuel cell battery using manure sludge waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 809–817 (2007).
 20. Catal, T., Xu, S., Li, K., Bermek, H. & Liu, H. Electricity generation from polyalcohols in single-chamber microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 849–854 (2008).
 21. Catal, T., Li, K., Bermek, H. & Liu, H. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *J. Power Sources* **175**, 196–200 (2008).
 22. Feng, Y., Wang, X., Logan, B. E. & Lee, H. Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 873–880 (2008).
 23. Wen, Q., Wu, Y., Cao, D., Zhao, L. & Sun, Q. Electricity generation and modeling of microbial fuel cell from continuous beer brewery wastewater. *Bioresour. Technol.* **100**, 4171–4175 (2009).
 24. Patil, S. A. *et al.* Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. *Bioresour. Technol.* **100**, 5132–5139 (2009).

25. Huang, L. & Logan, B. E. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 349–355 (2008).
26. Heilmann, J. & Logan, B. E. Production of Electricity from Proteins Using a Microbial Fuel Cell. *Water Environ. Res.* **78**, 531–537 (2006).
27. Cha, J., Choi, S., Yu, H., Kim, H. & Kim, C. Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochemistry* **78**, 72–79 (2010).
28. Li, W.-W., Sheng, G.-P., Liu, X.-W. & Yu, H.-Q. Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* **102**, 244–252 (2011).
29. Min, B. & Logan, B. E. Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5809–5814 (2004).
30. Zhang, F., Ge, Z., Grimaud, J., Hurst, J. & He, Z. Long-Term Performance of Liter-Scale Microbial Fuel Cells Treating Primary Effluent Installed in a Municipal Wastewater Treatment Facility. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 4941–4948 (2013).
31. Ha, P. T., Lee, T. K., Rittmann, B. E., Park, J. & Chang, I. S. Treatment of alcohol distillery wastewater using a bacteroidetes-dominant thermophilic microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 3022–3030 (2012).
32. Bond, D. R., Bond, D. R., Holmes, D. E. & Tender, L. M. Electrode-Reducing

- Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* (80-.). **295**, 483–485 (2010).
33. Ringeisen, B. R. *et al.* High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2629–2634 (2006).
 34. Pham, C. A. *et al.* 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 (2003).
 35. Islam, M. A. *et al.* Ultrasound driven biofilm removal for stable power generation in microbial fuel cell. *Energy and Fuels* **31**, 968–976 (2017).
 36. Ha, P. T., Tae, B. & Chang, I. S. Performance and bacterial consortium of microbial fuel cell fed with formate. *Energy and Fuels* **22**, 164–168 (2008).
 37. Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M. & Verstraete, W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3401–3408 (2005).
 38. Cooney, M. J., Roschi, E., Marison, I. W., Comminellis, C. & von Stockar, U. Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 358–365 (1996).
 39. Vega, C. A. & Fernández, I. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*.

- Bioelectrochemistry Bioenerg.* **17**, 217–222 (1987).
40. McKinlay, J. B. & Zeikus, J. G. Extracellular Iron Reduction Is Mediated in Part by Neutral Red and Hydrogenase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3467–3474 (2004).
 41. Dynamic Behaviors of Redox Mediators within the Hydrophobic Layers as an Important Factor for Effective Microbial Fuel Cell Operation. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 437–440 (2003).
 42. Chaudhuri, S. K. & Lovley, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1229–1232 (2003).
 43. Jong, B. C. *et al.* Enrichment, Performance, and Microbial Diversity of a Thermophilic Mediatorless Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6449–6454 (2006).
 44. Park, H. II, Sanchez, D., Cho, S. K. & Yun, M. Bacterial Communities on Electron-Beam Pt-Deposited Electrodes in a Mediator-Less Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6243–6249 (2008).
 45. Wu, Y., Liu, T., Li, X. & Li, F. Exogenous electron shuttle-mediated extracellular electron transfer of *Shewanella putrefaciens* 200: Electrochemical parameters and thermodynamics. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 9306–9314 (2014).
 46. Losdish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology*. (Médica Panamericana, 2005).
 47. Lee, H. S. *et al.* The roles of biofilm conductivity and donor substrate kinetics in a

- mixed-culture biofilm anode. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 12799–12807 (2016).
48. Zhang, L. *et al.* Startup Performance and Anodic Biofilm Distribution in Continuous-Flow Microbial Fuel Cells with Serpentine Flow Fields: Effects of External Resistance. *Ind. Eng. Chem. Res.* **56**, 3767–3774 (2017).
49. Cheng, K. Y., Ho, G. & Cord-Ruwisch, R. Affinity of Microbial Fuel Cell Biofilm for the Anodic Potential. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 3828–3834 (2008).
50. Jumma, S. & Patil, N. Microbial Fuel Cell: Design and Operation. *Rev. Microbiol.* 0–8 (2016).
51. Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. & Ieropoulos, I. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources* **356**, 225–244 (2017).
52. Wu, S. *et al.* A novel pilot-scale stacked microbial fuel cell for efficient electricity generation and wastewater treatment. *Water Res.* **98**, 396–403 (2016).
53. Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. & Befort, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20260–20264 (2011).
54. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2008).
55. Negroni, M. *Microbiología estomatológica: Fundamentos y Guía práctica*. (Médica Panamericana, 2009).
56. Varela, G. & Grotiuz, G. *Fisiología y Metabolismo Bacteriano*. Instituto de higiene, Universidad de la Republica Uruguay. Available at:

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/fisiologiyametabolismobacteriano.pdf>.

(Accessed: 2nd July 2018)

57. Fatemi, S. Bioelectricity Generation in Mediator - Less Microbial Fuel Cell: Application of Pure and Mixed Cultures. *Iran. J. Energy Environ.* **3**, 104–108 (2012).
58. Lin, C.-W., Wu, C.-H., Chiu, Y.-H. & Tsai, S.-L. Effects of different mediators on electricity generation and microbial structure of a toluene powered microbial fuel cell. *Fuel* **125**, 30–35 (2014).
59. Makarova, K. *et al.* Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15611–15616 (2006).
60. Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M. & García, A. Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* **4**, 35 (2016).
61. Martín, R. *et al.* Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb. Cell Fact.* **12**, 71 (2013).
62. Zou, Y. *et al.* Lactobacillus shenzhenensis sp. nov., isolated from a fermented dairy beverage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 1817–1823 (2013).
63. Arbianti, R. *et al.* Performance Optimization of Microbial Fuel Cell (MFC) Using Lactobacillus bulgaricus. *MAKARA J. Technol. Ser.* **17**, 32–38 (2013).
64. Vilas Boas, J., Oliveira, V. B., Marcon, L. R. C., Simões, M. & Pinto, A. M. F. R. Optimization of a single chamber microbial fuel cell using Lactobacillus pentosus:

- Influence of design and operating parameters. *Sci. Total Environ.* **648**, 263–270 (2019).
65. Nastro, R. A. *et al.* Performances and microbiology of a microbial fuel cell (MFC) fed with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Proc. 6th Eur. Fuel Cell - Piero Lunghi Conf. EFC 2015* (2015).
66. Darmawan, M. D., Hawa, L. C. & D, A. B. D. Performance of microbial fuel cell double chamber using mozzarella cheese whey substrate Performance of microbial fuel cell double chamber using mozzarella cheese whey substrate. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **131**, 1–6 (2018).
67. Duan, Y.-Q. *et al.* *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie Van Leeuwenhoek* **108**, 1161–1169 (2015).
68. Doijad, S. *et al.* *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 968–974 (2016).
69. Hoffmann, H. & Roggenkamp, A. Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5306–5318 (2003).
70. Tkach, O., Liu, L. & Wang, A. Electricity Generation by *Enterobacter* sp. of Single-Chamber Microbial Fuel Cells at Different Temperatures. *J. Clean Energy Technol.* **4**, 36–42 (2015).

71. Hau, H. H. & Gralnick, J. A. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 237–258 (2007).
72. Kane, A. L., Bond, D. R. & Gralnick, J. A. Electrochemical Analysis of *Shewanella oneidensis* Engineered To Bind Gold Electrodes. *ACS Synth. Biol.* **2**, 93–101 (2013).
73. El-Naggar, M. Y. *et al.* Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18127–18131 (2010).
74. McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N. & Jeuken, L. J. C. Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J. Biol. Chem.* **287**, 14215–14225 (2012).
75. Nicholl, D. *An introduction to genetic Engineering*. (Cambridge University Press, 2008).
76. Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z. & Forney, L. J. Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. *PLoS One* **7**, e33865 (2012).
77. Claassen, S. *et al.* A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **94**, 103–110 (2013).
78. Kaufman, R. I. & Nixon, B. T. Use of PCR to isolate genes encoding sigma54-dependent activators from diverse bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 3967–3970 (1996).

79. Cárdenas López, D. Evaluación de la generación eléctrica de una celda de combustible microbiana con electrodo de grafito modificado para el tratamiento de agua miel de café. (Universidad de Costa Rica, 2018).
80. Jeffrey, P. *Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology*. (Jones and Bartlett Publisher, 2007).
81. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. & Wade, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**, 1–7 (2010).
82. Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. Isolating 'Uncultivable' Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science (80-.)*. **296**, 1127–1129 (2002).
83. Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *MICROBIOL. REV.* **59**, 143–169 (1995).
84. Zhang, J., Zhang, E., Scott, K. & Burgess, J. G. Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2984–2992 (2012).
85. Enden, J. C. von & Calvert, K. C. REVIEW OF COFFEE WASTE WATER CHARACTERISTICS AND APPROACHES TO TREATMENT. (2010).
86. De Vuyst, L. & Vandamme, E. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. *Microbiology*,

- Genetics and Applications*. (Springer Science and Business Media, 1994).
doi:10.1007/978-1-4615-2668-1
87. Glaeser, S. P. & Kämpfer, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 237–245 (2015).
 88. Nilsson, R. H. *et al.* Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS One* **1**, e59 (2006).
 89. Vilgalys, R. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytol. Trust* **160**, 4–5 (2003).
 90. Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. & Panchal, G. On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytol.* **160**, 43–48 (2003).
 91. Wang, X., Jordan, I. K. & Mayer, L. W. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. in *Molecular Medical Microbiology* (ed. Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, J. S.) 517–536 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9
 92. Madhaiyan, M. *et al.* Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 1 (2013).
 93. Bottari, B. *et al.* Effective identification of *Lactobacillus casei* group species: Genome-based selection of the gene *mutL* as the target of a novel multiplex PCR assay.

- Microbiol. (United Kingdom)* **163**, 950–960 (2017).
94. lacumin, L. *et al.* High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiol.* **46**, 357–367 (2015).
 95. lacumin, L. *et al.* High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiol.* **46**, 357–367 (2015).
 96. Wu, J. Caracterización de bacterias lácticas en subproductos industriales de piña (*Anana cosmosus* L.Merr) y determinación de su capacidad de su potencial probiótico en jugo de piña. (Universidad de Costa Rica, 2016).
 97. Vilas Boas, J. *et al.* Effect of operating and design parameters on the performance of a microbial fuel cell with *Lactobacillus pentosus*. *Biochem. Eng. J.* **104**, 34–40 (2015).
 98. Nimje, V. R. *et al.* Microbial fuel cell of *Enterobacter cloacae*: Effect of anodic pH microenvironment on current, power density, internal resistance and electrochemical losses. *Int. J. Hydrogen Energy* **36**, 11093–11101 (2011).
 99. Rezaei, F. *et al.* Simultaneous Cellulose Degradation and Electricity Production by *Enterobacter cloacae* in a Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3673–3678 (2009).
 100. Shewa, W. A., Lalman, J. A., Chaganti, S. R. & Heath, D. D. Electricity production from

- lignin photocatalytic degradation byproducts. *Energy* **111**, 774–784 (2016).
101. Revelo, D. M., Hurtado, N. H. & Ruiz, J. O. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Inf. tecnológica* **24**, 7–8 (2013).
 102. Sacco, N., Bonetto, M. C. & Cortón, E. Generación de Electricidad en una Celda de Combustible Microbiana Mediada Utilizando Micro-ánodos Descartables. *Ibersensor* **6**, 388–392 (2008).
 103. Sharma, Y. & Li, B. Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC). *Int. J. Hydrogen Energy* **35**, 3789–3797 (2010).
 104. Ren, Z., Ward, T. E. & Regan, J. M. Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4781–4786 (2007).
 105. Haines, R. B. The effect of freezing on bacteria. in *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **124**, 451–463 (1938).
 106. Alrabadi, N. I. The Effect of Freezing on Different Bacterial Counts in Raw Milk. *Int. J. Biol.* **7**, 9–12 (2015).
 107. Mikaelyan, A., Meuser, K. & Brune, A. Microenvironmental heterogeneity of gut compartments drives bacterial community structure in wood- and humus-feeding higher termites. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, 210 (2017).

108. Karlo, A., Ziembinska, A., Pilarczyk, M. & Surmacz-g, J. MOLECULAR MONITORING OF BACTERIAL AND MICROALGAL BIOCENOSSES ' BIODIVERSITY IN HIGH LOADED FARMING PONDS. *ECOL CHEM ENG S* **22**, 425–437 (2015).

Anexos

Anexo 1. Fotografías de aislamientos obtenidos de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.



Figura E1. Aislamiento II-1-b de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.

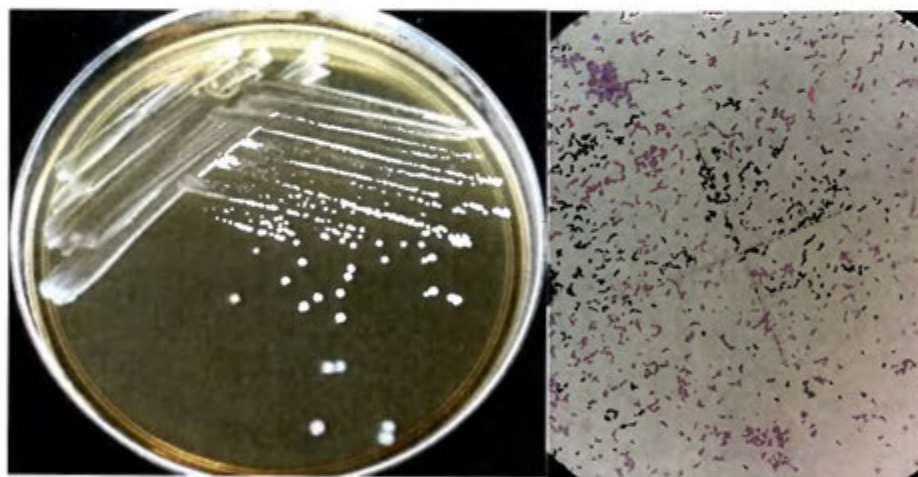


Figura E2. Bacteria II-C₁-A aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.

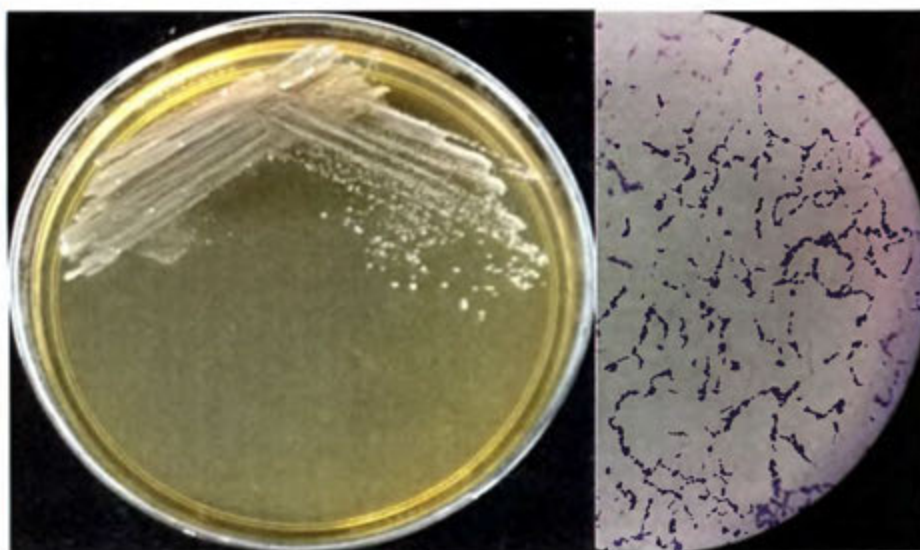


Figura E3. Bacteria 1A2-P aislada de electrodo del ánodo de las CCM con agua miel de café.

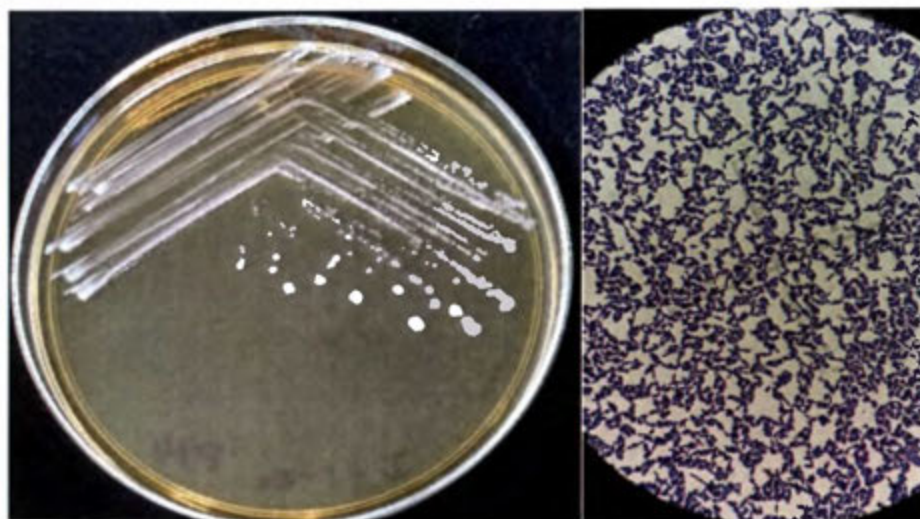


Figura E4. Bacteria I-1-a aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.

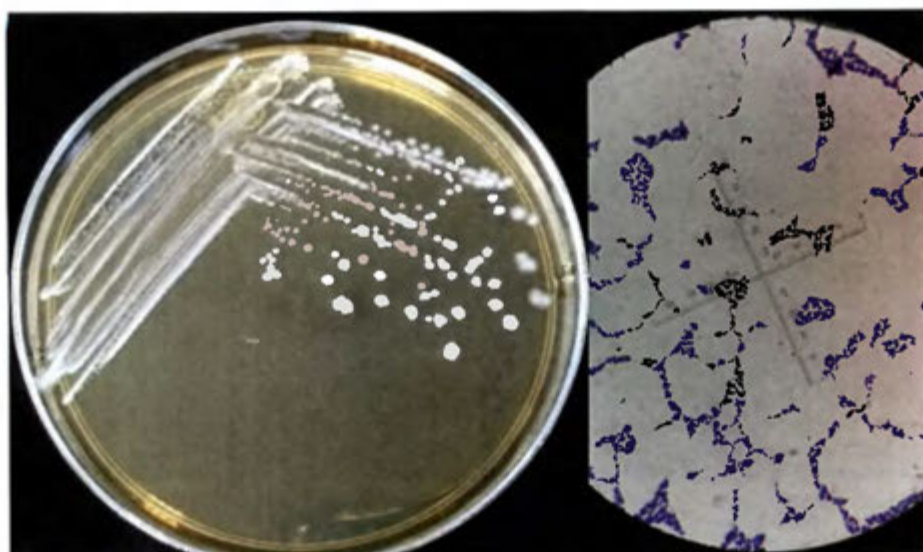


Figura E5. Bacteria I-2-c aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.

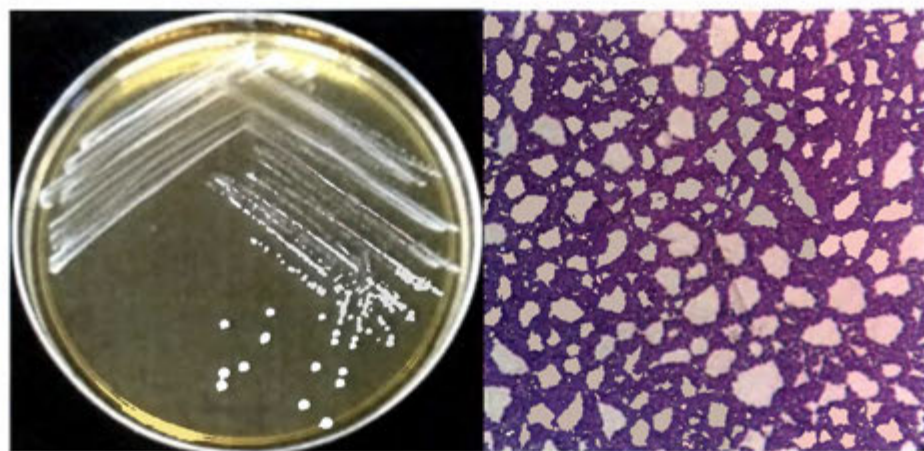


Figura E6. Bacteria II-C₂-C aislada de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.

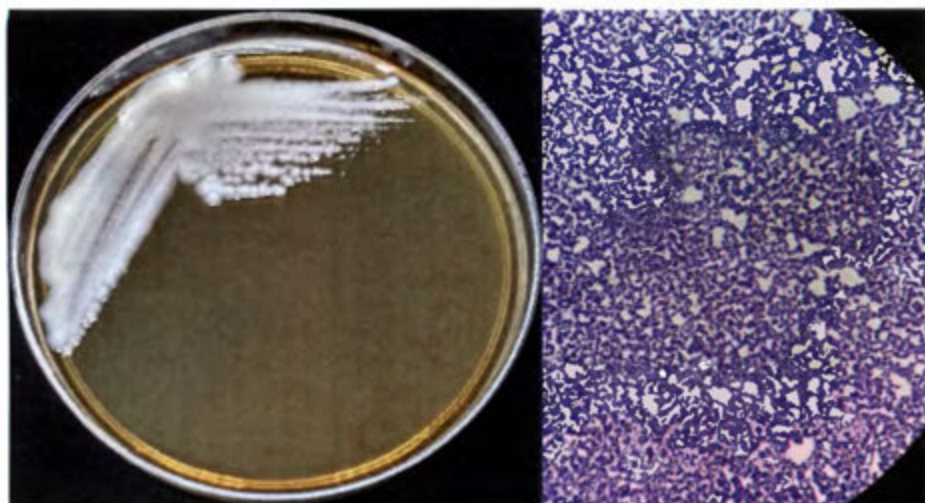


Figura E7. Aislamiento I-2-e de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.

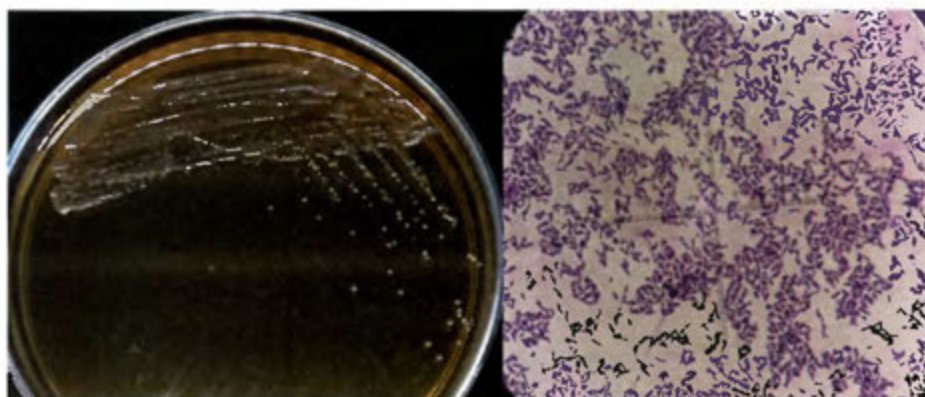


Figura E8. Aislamiento I-2-d de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café.



Figura E9. Aislamiento 2B₂-T de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café

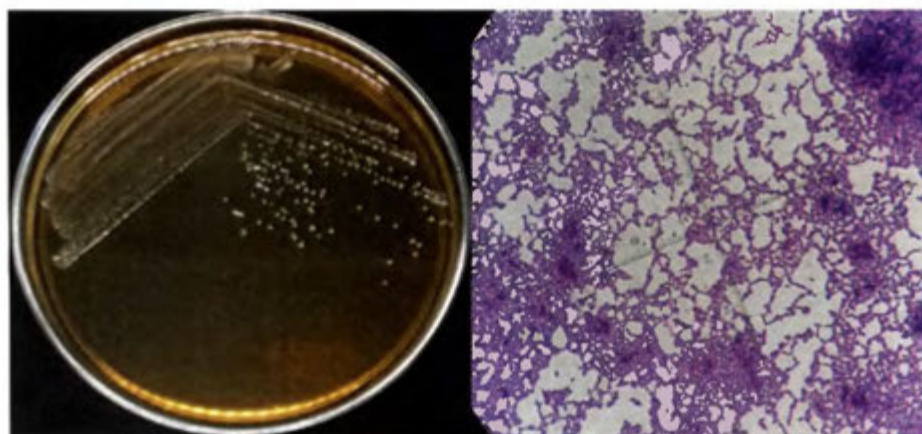


Figura E10. Aislamiento II-C₁-C de los electrodos del ánodo de las CCM con agua miel de café

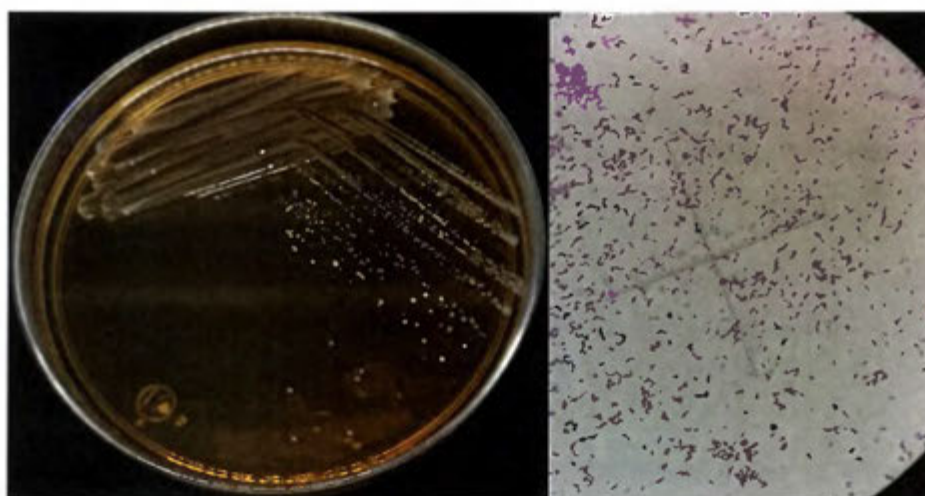


Figura E11. Aislamiento 2A₂-B de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café.



Figura E12. Aislamiento 1B-N de los electrodos del ánodo de la CCM con agua miel de café



Figura E13. Aislamiento II-C₂-A de los electrodos de ánodo de la CCM con agua miel de café

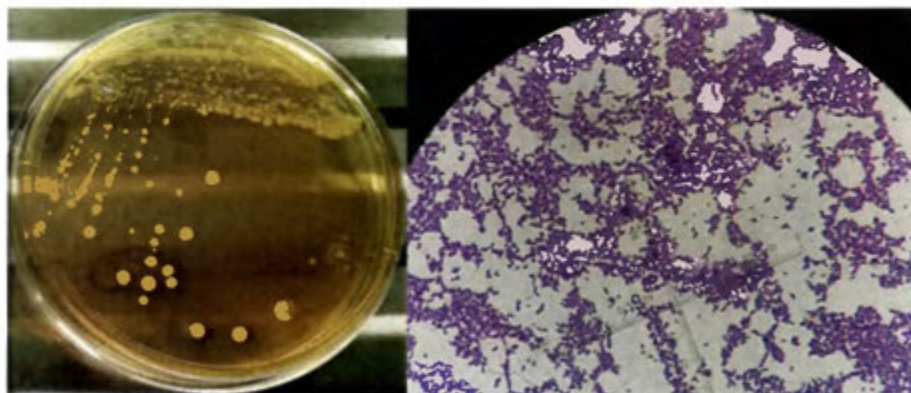


Figura E14. Aislamiento II-C₂-B de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.



Figura E15. Bacteria I-C₁ aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café



Figura E16. Bacteria II-C₁-B aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.

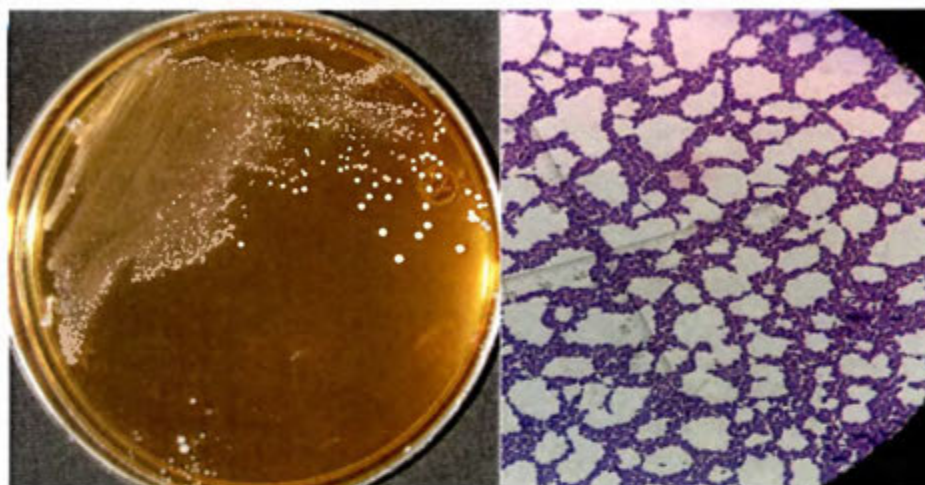


Figura E17. Bacteria I-C₂ aislada de electrodo del ánodo de la CCM con agua miel de café.

Anexo 2. Resultados de amplificación de bacterias aislada por medio cadena de la Polimerasa (PCR).

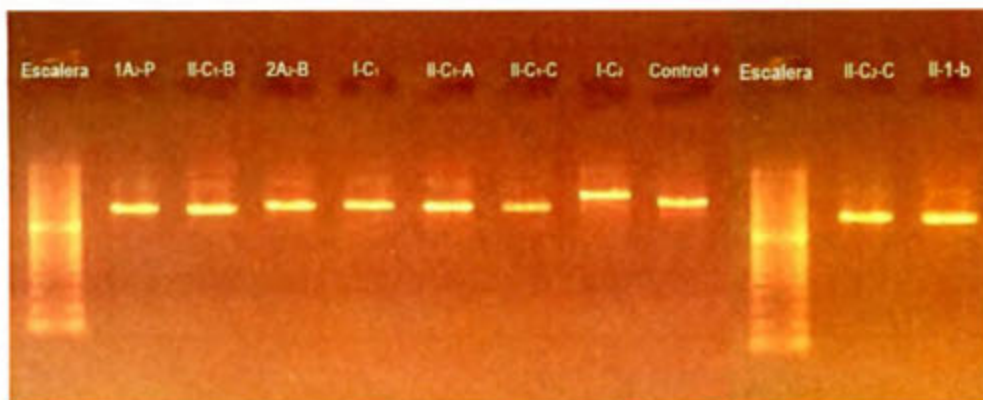


Figura E18. Productos de PCR obtenidos por medio de los Primers 27F y 1429R, purificado. Gel de agarosa al 1%, teñidos con Gel-Red (10000 X), corridos a 90V por 35 min.

Cuadro A1. Resultados de análisis de pureza de especies amplificadas para secuenciación.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	A260	A280	260/280	260/230
1A ₂ -P	38,6	0,772	0,419	1,84	1,94
2A ₂ -B	29,3	0,585	0,327	1,79	1,72
I-C ₁	32,0	0,640	0,352	1,82	1,72
II-C ₁ -A	35,6	0,712	0,384	1,85	1,83
II-C ₁ -B	38,2	0,765	0,439	1,12	1,74
II-C ₁ -C	32,7	0,654	0,360	1,82	1,83
I-C ₂	14,4	0,287	1,666	1,73	1,03
II-C ₂ -C	79,9	1,598	0,922	1,22	1,73
II-1-b	38,9	0,777	0,650	1,75	1,65

Anexo 3. Resultado Filogenético preliminar para bacterias del género *Lactobacillus*

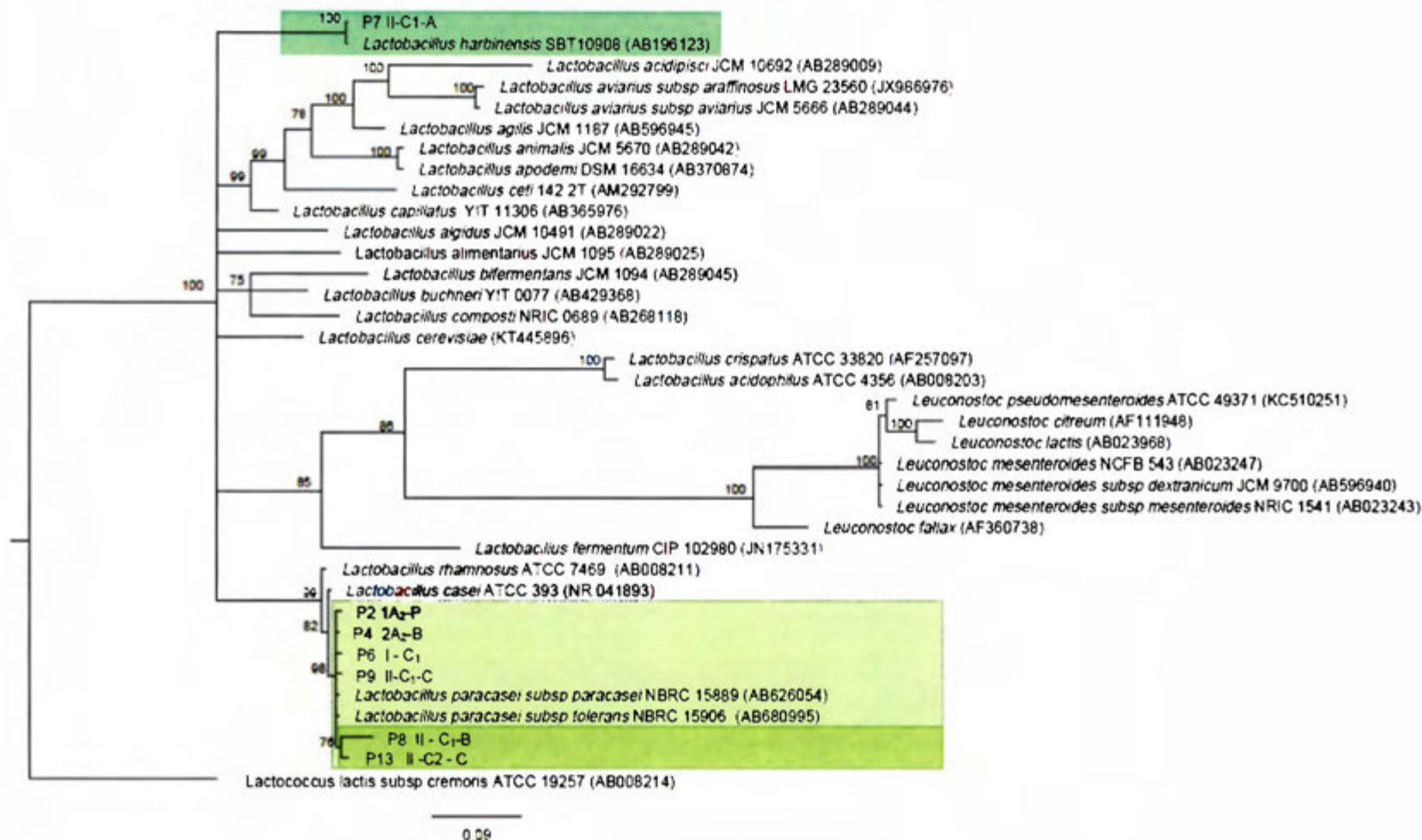



Figura E19. Árbol de máxima probabilidad basado en las secuencias del gen 16S rRNA bacterias aisladas de ánodos de CCM con agua miel de café y especies de *Lactobacillus*. Con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257^T como outgroup.

Anexo 4. Resultados de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

	Dirección de investigaciones Sección de Fitoprotección Laboratorio Biología Molecular	CORBANA-DI-SF-BM-IFSER-094-2018 Fecha: 1 de noviembre de 2018
---	---	--

<p>Servicio solicitado: Diversidad de hongos y bacterias.</p> <p>Solicitante: Dra. Lidieth Uribe. Centro de Investigaciones Agronómicas. CIA UCR.</p> <p>Fecha de solicitud: 26 de octubre de 2018.</p> <p>Tipo de producto (s) evaluado (s): Ácidos nucleicos totales.</p>

Aislamiento y muestreo realizado por: Dra. Lidieth Uribe. CIA

Cuadro 1. Diversidad genética de hongos y bacterias según el índice de Shannon Wiener (H'), calculado con el programa Past 3 a partir de imágenes analizadas con el programa UVI 1D).

#	ID Usuario	Concentración ADN total (ul)	Relación 260/280 (nm)	H'	
				Hongos*	Bacterias*
1	EADN 1	55.6	1,72	2,526	2,524
2	EADN 2	165.1	2,02	2,528	2,809
3	EADN 3	75.6	1,92	2,45	2,754
4	EADN 4	45.8	1,75	2,615	2,918
5	EADN 5	259.7	2,01	2,371	2,329
6	EADN 6	62	1,82	2,74	2,839
7	EADN 7	92.4	1,9	2,807	2,35
8	EADN 8	130	1,84	2,586	2,146

*Interpretación del índice.

Valor del índice	Diversidad genética
1 a 2	Baja
2 a 3	Mediana
3 a 4	Alta

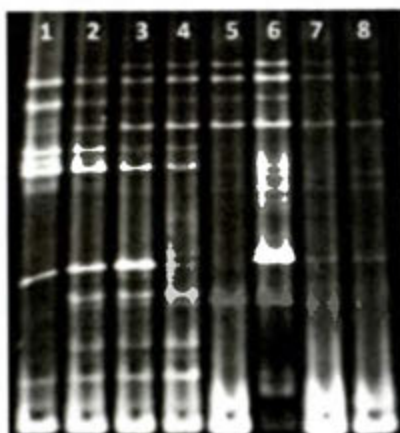


Figura 3. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) del producto de amplificación a partir de los marcadores generales para bacterias: 357F GC/518R según Sekiguchi et al 2002.

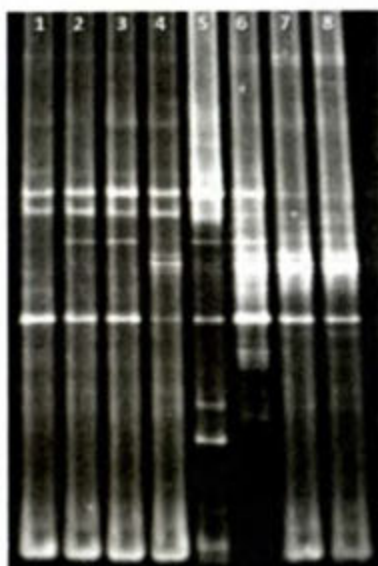


Figura 4. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) del producto de amplificación a partir de los marcadores generales para hongos: ITS1/ITS4 anidado en ITS1/ITS2 según Valasková y Baldrian 2009.

Nota: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados por parte de terceras personas ajenas al proceso de análisis y a CORBANA S.A.

Técnica utilizada: PCR punto final Gel en Gradiente Desnaturalizante.

Instrumento o equipo utilizado: Applied Biosystems® Gen Amp® Thermal Cycler.

C.B.S Scientific DGGE System.



Responsable: *M.Sc. Ana Maria Conejo Barboza*

Tel: 40 02 46 85

Email: anconejo@corbana.co.cr

CC:

M.Sc. Mauricio Guzmán, Coordinador de Fitoprotección

Archivo

Anexo 5. Resultados de pruebas estadísticas

Resultados de Prueba t student realizadas para corriente máxima de los diferentes ensayos realizados

Two Sample t-test	
data: mean2 and mean1	
t = 73,997, df = 8, p-value = 6,197e-13	
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0	
95 percent confidence interval:	
0,004562392	Inf
sample estimates:	
mean of x mean of y	
0,26282	0,25814
Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.	
HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control	

Figura E20. Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%.

Two Sample t-test	
data: conc2 and conc1	
t = 59, df = 8, p-value = 3.783e-12	
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0	
95 percent confidence interval:	
0.003428427	Inf
sample estimates:	
mean of x	mean of y
0.26220	0.25866
Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.	
HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control	

Figura E21. Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A). Comparación de corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%.

Two Sample t-test	
data: dil2 and dil1	
t = -39.598, df = 8, p-value = 1	
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0	
95 percent confidence interval:	
-0.00293149	Inf
sample estimates:	
mean of x	mean of y
0.2600	0.2628
Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.	
HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control	

Two Sample t-test	
data: nueva2 and nueva1	
t = -39.598, df = 8, p-value = 9.096e-11	
alternative hypothesis: true difference in means is less than 0	
95 percent confidence interval:	
-Inf	-0.00266851
sample estimates:	
mean of x	mean of y
0.2600	0.2628
Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. mayor o igual que el electrodo control.	
HA= Los electrodos inoculados presentan menor corriente máx. que el electrodo control	

Figura E22. Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%.

<p>Two Sample t-test</p> <p>data: dil4 and dil3</p> <p>t = -94.469, df = 8, p-value = 1</p> <p>alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0</p> <p>95 percent confidence interval:</p> <p>-0.00681149 Inf</p> <p>sample estimates:</p> <p>mean of x mean of y</p> <p>0.25724 0.26392</p>
<p>Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.</p> <p>HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control</p>

<p>Two Sample t-test</p> <p>data: otra2 and otra1</p> <p>t = -94.469, df = 8, p-value = 8.799e-14</p> <p>alternative hypothesis: true difference in means is less than 0</p> <p>95 percent confidence interval:</p> <p>-Inf -0.00654851</p> <p>sample estimates:</p> <p>mean of x mean of y</p> <p>0.25724 0.26392</p>
<p>Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. mayor o igual que el electrodo control.</p> <p>HA= Los electrodos inoculados presentan menor corriente máx. que el electrodo control</p>

Figura E23. Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A). Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%.

Two Sample t-test
data: Shew2 and shew1
t = 38.897, df = 8, p-value = 1.049e-10
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0
95 percent confidence interval:
0.00300893 Inf
sample estimates:
mean of x mean of y
0.28460 0.28144
Ho=Los electrodos inoculados presentan una corriente máx. menor o igual que el electrodo control.
HA= Los electrodos inoculados presentan mayor corriente máx. que el electrodo control

Figura E24. Resultado de prueba T para CCM con agua miel de café diluido inoculada con *Shewanella oneidensis*. Comparación de la corriente máxima electrodo inoculado contra el electrodo control. Con nivel de confianza 95%.

Resultados de Análisis de Varianza (Anova) realizadas para los diferentes parámetros analizados.

Resultados para comparación de ensayos realizados con agua miel de café sin diluir.

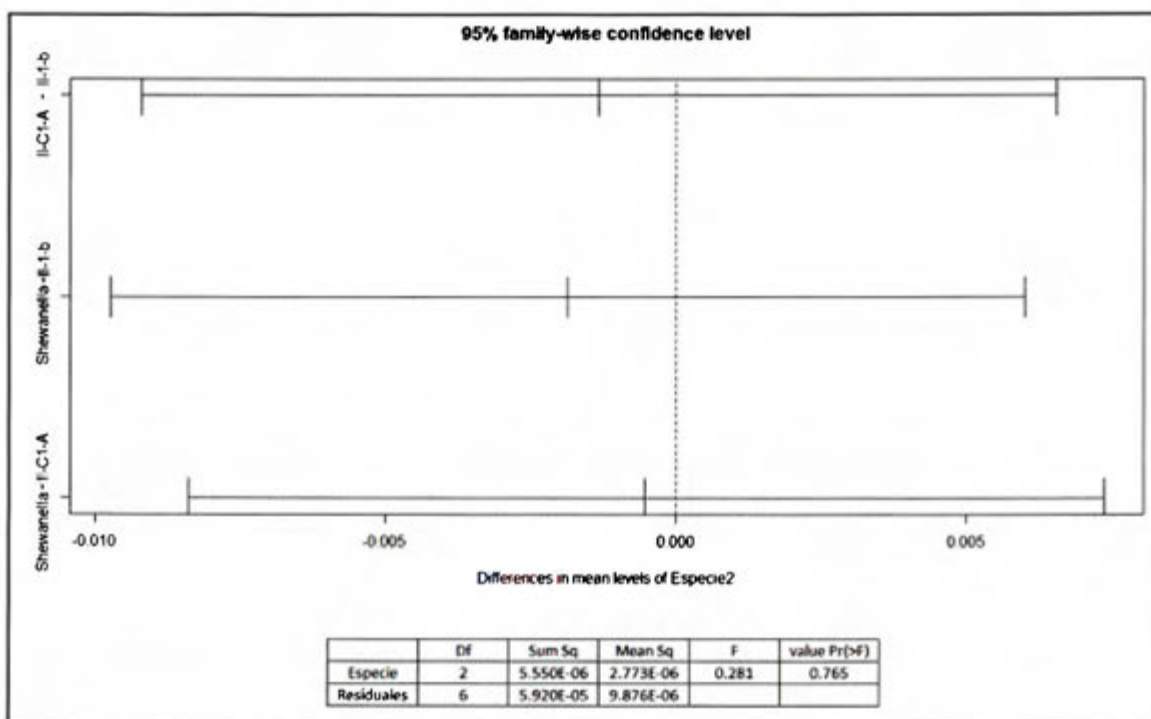


Figura E25. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima entre el electrodo control y el electrodo inoculado obtenidas en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis*.

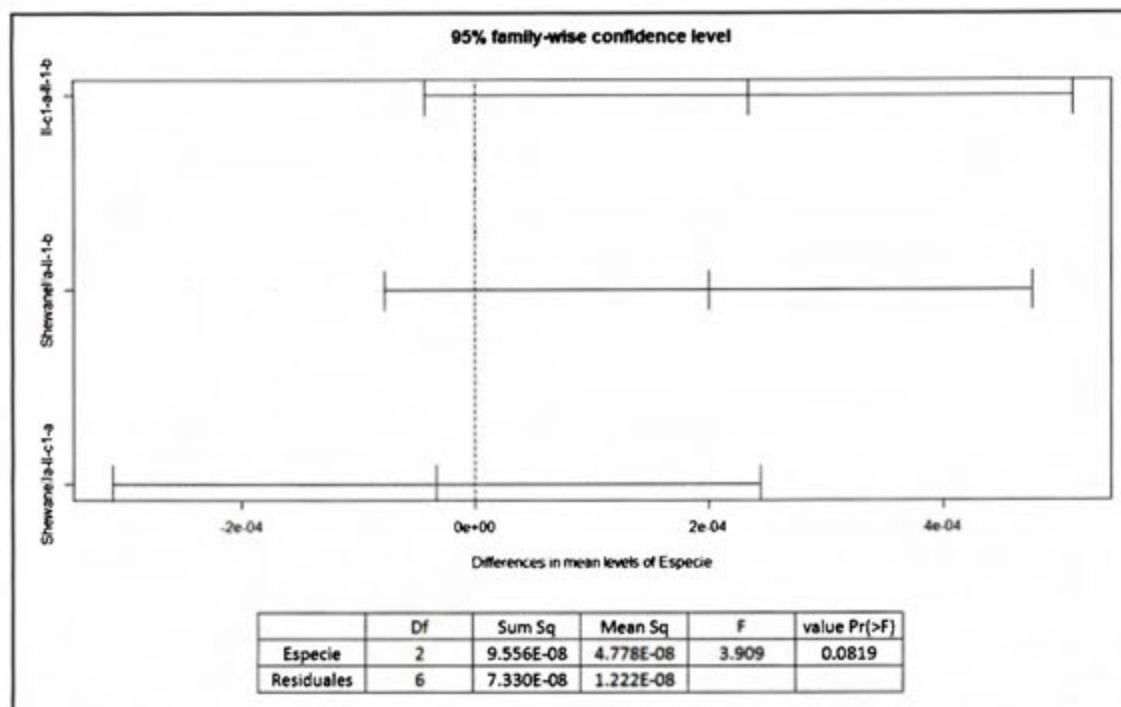


Figura E26. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia entre densidad corriente máxima del electrodo control y el electrodo inoculado obtenida en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis*.

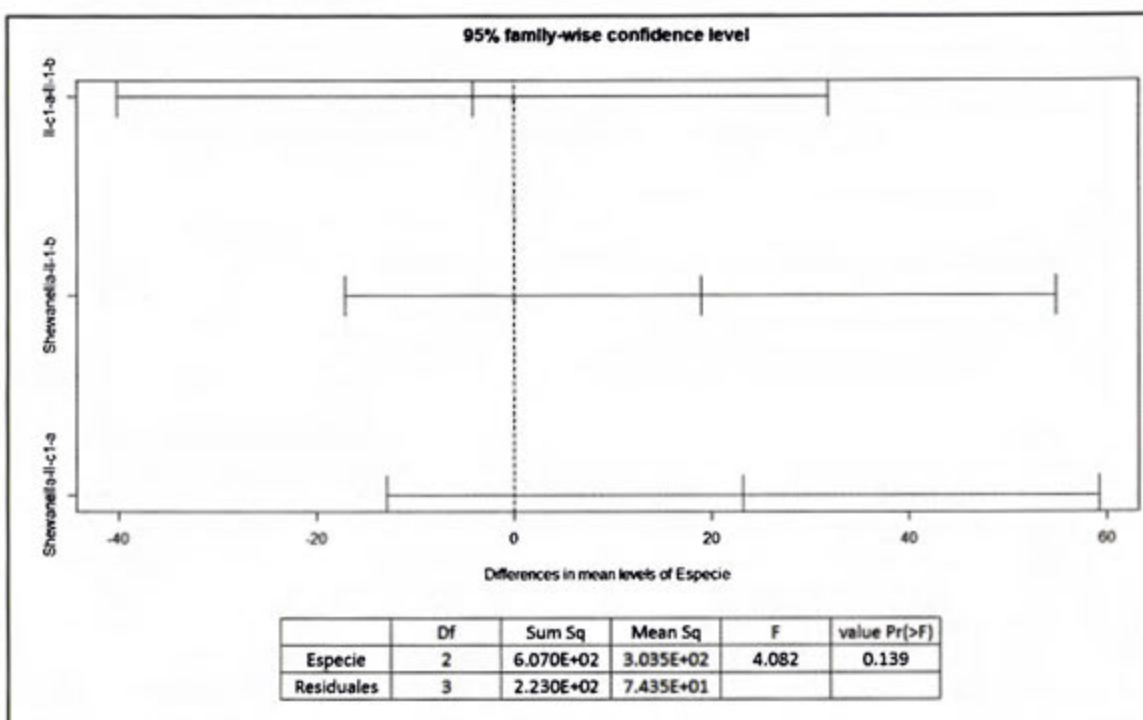


Figura E27. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de DQO obtenida entre el electro control y electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir con *Enterobacter asburiae* (Il-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (Il-C1-A) y *Shewanella oneidensis*

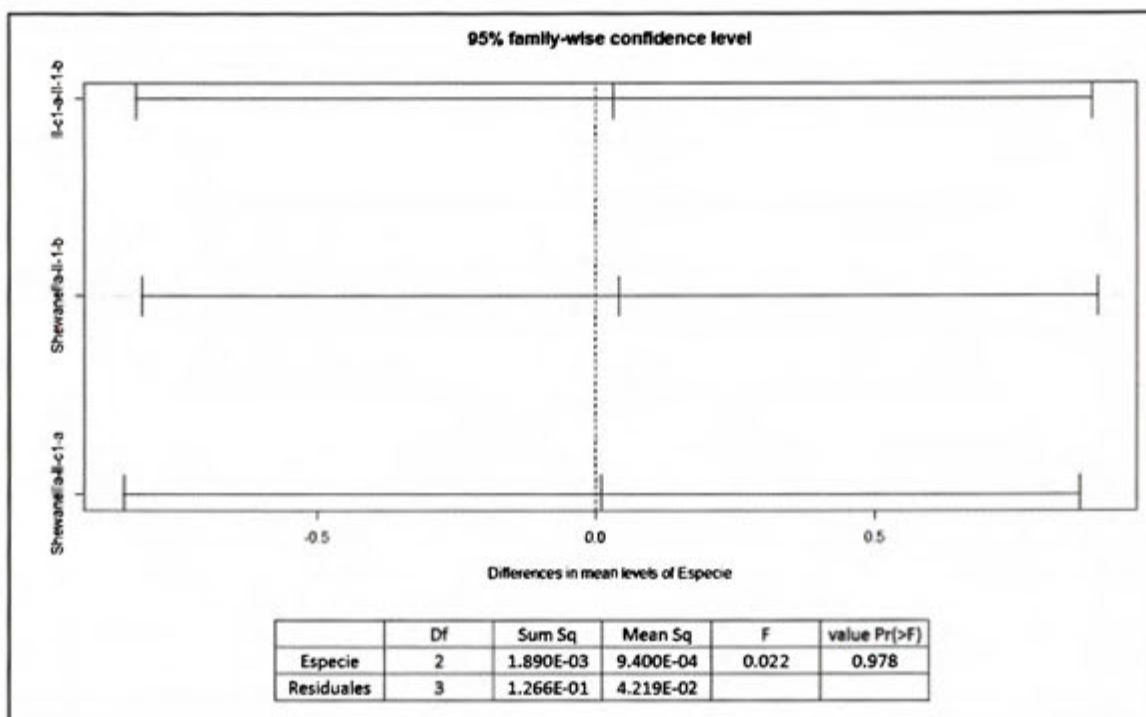


Figura E28. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la eficiencia coulombica obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café sin diluir con *Enterobacter asburiae* (II-1-b), *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A) y *Shewanella oneidensis*

Resultados para comparación de ensayos realizados con agua miel de café diluida.

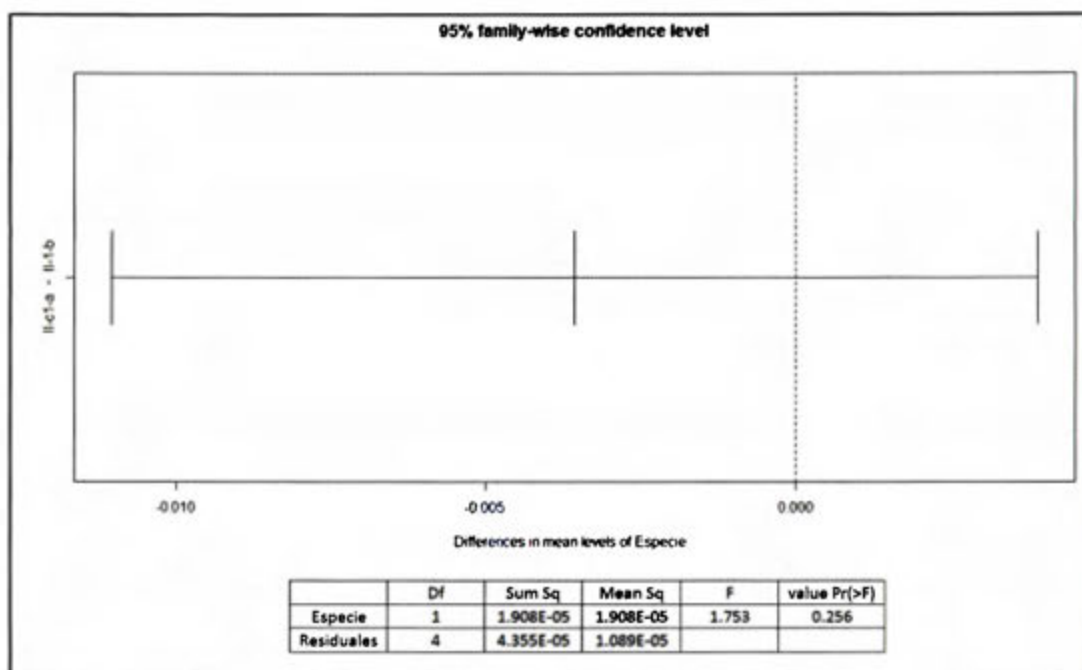


Figura E29. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la corriente máxima obtenidas por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A).

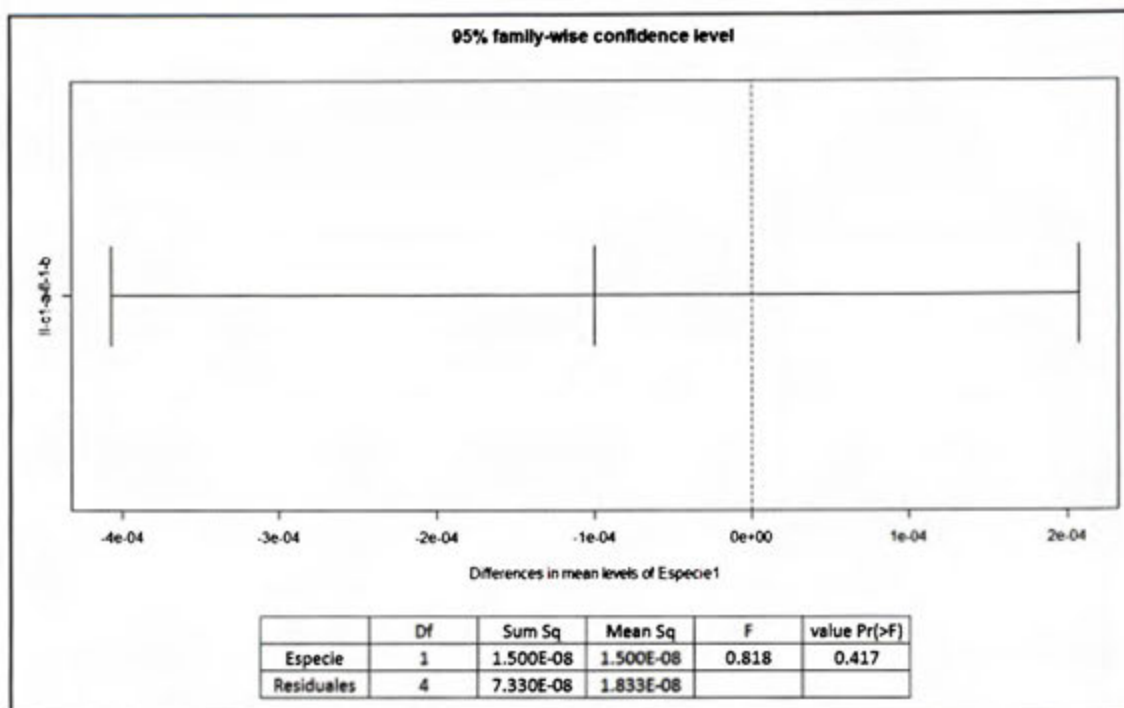


Figura E30. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la densidad de corriente máxima obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C1-A).

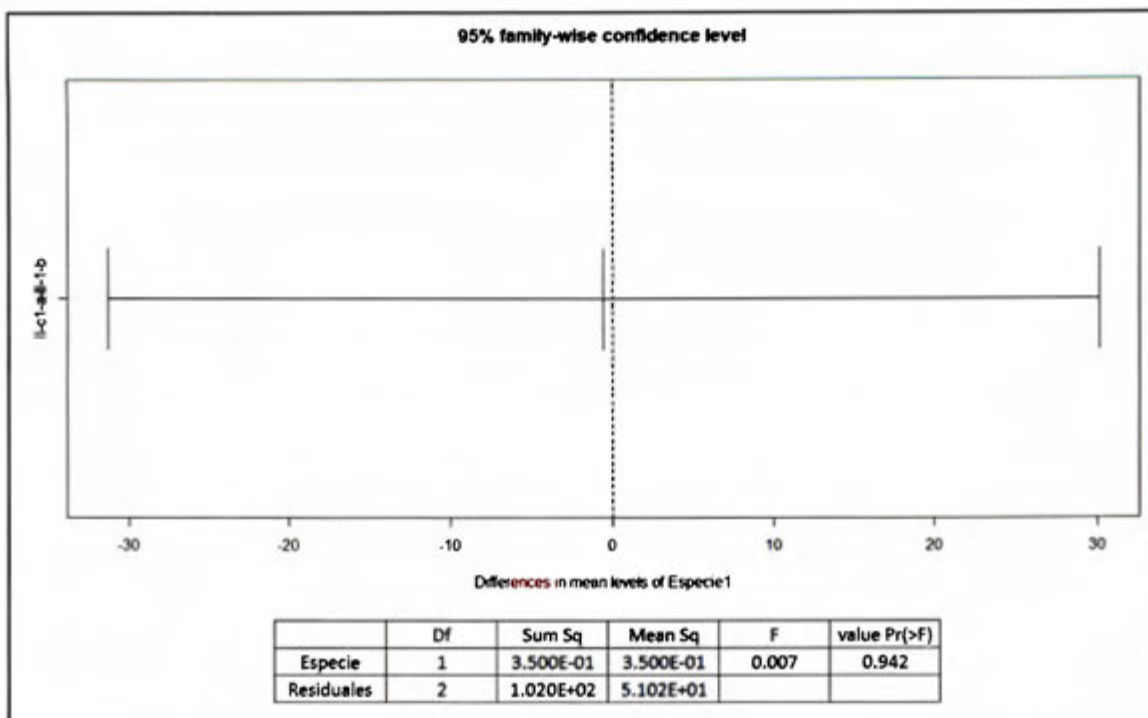


Figura E31. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la DQO obtenida por el electrodo control y el electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A).

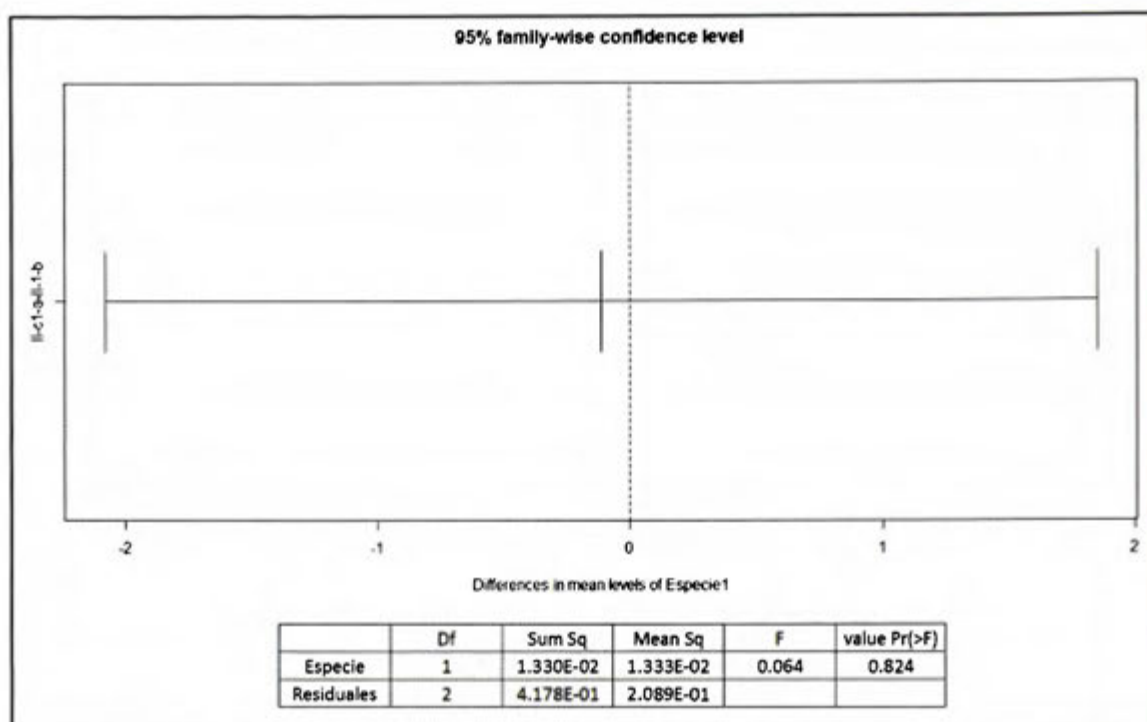


Figura E32. Resultado de ANOVA realizado a la diferencia de la eficiencia culombica obtenida por el electrodo control y electrodo inoculado en los ensayos realizados en CCM con agua miel de café diluidas con *Enterobacter asburiae* (II-1-b) y *Lactobacillus harbinensis* (II-C₁-A).

Apéndice

Apéndice A. Datos experimentales

Apéndice A.1. Datos de corridas de CCM con agua miel de café en pruebas con las bacterias II-1-b, II-C1-A y *Shewanella oneidensis*.

Cuadro B1. Datos de corriente en el tiempo de la ensayo de CCM con II-1-b inoculada.

CCM realizada con agua miel sin diluir					CCM realizada con agua miel diluida				
Tiempo (min)	Control (mA)	Réplica 1 (mA)	Réplica 2 (mA)	Réplica 3 (mA)	Tiempo (min)	Control (mA)	Réplica 1 (mA)	Réplica 2 (mA)	Réplica 3 (mA)
0	0,1276	0,1295	0,1224	0,1454	0	0,2297	0,2272	0,2258	0,2331
30	0,1611	0,1627	0,1570	0,1904	30	0,2385	0,2344	0,2348	0,2415
60	0,1745	0,1761	0,1709	0,2050	60	0,2422	0,2367	0,2384	0,2448
90	0,1828	0,1845	0,1796	0,2132	90	0,2438	0,2382	0,2404	0,2463
120	0,1888	0,1904	0,1864	0,2194	120	0,2454	0,2387	0,2412	0,2467
150	0,1938	0,1952	0,1926	0,2247	150	0,2463	0,2393	0,2415	0,2476
180	0,1983	0,1998	0,1986	0,2299	180	0,2473	0,2397	0,2421	0,2483
210	0,2025	0,2039	0,2042	0,2341	210	0,2476	0,2399	0,2424	0,2478
240	0,2068	0,2079	0,2092	0,2380	240	0,2481	0,2403	0,2427	0,2488
270	0,2112	0,2119	0,2140	0,2420	270	0,2485	0,2402	0,2429	0,2488
300	0,2153	0,2161	0,2186	0,2448	300	0,2486	0,2406	0,2428	0,2485
330	0,2192	0,2202	0,2232	0,2474	330	0,2489	0,2406	0,243	0,249
360	0,2228	0,2241	0,2276	0,2493	360	0,2493	0,2407	0,2434	0,2489
390	0,2263	0,2282	0,2320	0,2512	390	0,2491	0,2406	0,2433	0,2487
420	0,2300	0,2323	0,2365	0,2527	420	0,2492	0,2406	0,243	0,2486
450	0,2338	0,2364	0,2415	0,2545	450	0,2493	0,2406	0,2433	0,2485
480	0,2381	0,2410	0,2460	0,2563	480	0,2494	0,2405	0,2433	0,2486
510	0,2428	0,2463	0,2490	0,2579	510	0,2494	0,241	0,2435	0,2488
540	0,2479	0,2515	0,2515	0,2595	540	0,2495	0,2408	0,2432	0,2484
570	0,2528	0,2564	0,2544	0,2613	570	0,2497	0,2406	0,2439	0,2486
600	0,2566	0,2601	0,2572	0,2630	600	0,2498	0,241	0,2436	0,249

630	0,2582	0,2616	0,2599	0,2642	630	0,2493	0,2411	0,2436	0,2486
660	0,2582	0,2616	0,2612	0,2650	660	0,2494	0,2411	0,2437	0,2487
690	0,2582	0,2615	0,2614	0,2653	690	0,2495	0,2413	0,2437	0,2488
720	0,2581	0,2614	0,2616	0,2656	720	0,2495	0,2416	0,244	0,2487
750	0,2580	0,2613	0,2616	0,2657	750	0,2494	0,2421	0,2442	0,2492
780	0,2579	0,2612	0,2615	0,2659	780	0,2499	0,2424	0,2447	0,2492
810	0,2578	0,2610	0,2614	0,2658	810	0,2498	0,2429	0,2451	0,2494
840	0,2578	0,2609	0,2613	0,2657	840	0,25	0,2435	0,2457	0,2495
870	0,2577	0,2608	0,2613	0,2656	870	0,25	0,2441	0,2465	0,2496
900	0,2576	0,2606	0,2613	0,2656	900	0,2501	0,245	0,2475	0,2498
930	0,2576	0,2606	0,2612	0,2655	930	0,2501	0,2465	0,2486	0,2501
960	0,2574	0,2604	0,2610	0,2654	960	0,2502	0,2487	0,2511	0,2503
990	0,2573	0,2603	0,2609	0,2652	990	0,2501	0,2523	0,2542	0,2506
1020	0,2572	0,2601	0,2607	0,2650	1020	0,2502	0,2547	0,2566	0,2509
1050	0,2569	0,2598	0,2605	0,2648	1050	0,2507	0,2555	0,2577	0,2516
1080	0,2567	0,2596	0,2603	0,2646	1080	0,251	0,2559	0,2579	0,2526
1110	0,2565	0,2592	0,2601	0,2644	1110	0,2513	0,256	0,2584	0,2531
1140	0,2564	0,2592	0,2600	0,2643	1140	0,2518	0,2562	0,2586	0,2548
1170	0,2564	0,2592	0,2600	0,2643	1170	0,2524	0,2557	0,2581	0,2541
1200	0,2564	0,2592	0,2600	0,2643	1200	0,2535	0,2456	0,2476	0,2548
1230	0,2564	0,2591	0,2600	0,2643	1230	0,254	0,2441	0,2461	0,2543
1260	0,2564	0,2591	0,2599	0,2642	1260	0,2568	0,2447	0,2466	0,2538
1290	0,2563	0,2589	0,2600	0,2642	1290	0,2587	0,2457	0,2475	0,2525
1320	0,2565	0,2590	0,2601	0,2644	1320	0,2599	0,2463	0,2484	0,2515
1350	0,2568	0,2593	0,2604	0,2646	1350	0,2604	0,2466	0,2485	0,2501
1380	0,2570	0,2595	0,2606	0,2649	1380	0,2598	0,2464	0,2483	0,2493
1410	0,2572	0,2598	0,2608	0,2651	1410	0,2602	0,2461	0,2483	0,2483
1440	0,2575	0,2600	0,2610	0,2653	1440	0,2611	0,2463	0,2486	0,2475
1470	0,2575	0,2599	0,2610	0,2652	1470	0,261	0,2467	0,2492	0,2468
1500	0,2573	0,2596	0,2608	0,2648	1500	0,2605	0,2476	0,2496	0,2465
1530	0,2571	0,2594	0,2603	0,2644	1530	0,2608	0,2484	0,2506	0,2463
1560	0,2569	0,2592	0,2600	0,2641	1560	0,2614	0,2495	0,2512	0,2466
1590	0,2565	0,2588	0,2596	0,2636	1590	0,2622	0,2512	0,2527	0,2474
1620	0,2560	0,2583	0,2590	0,2630	1620	0,2626	0,2528	0,2543	0,2485
1650	0,2557	0,2581	0,2587	0,2627	1650	0,2627	0,2549	0,2566	0,2511
1680	0,2557	0,2579	0,2585	0,2625	1680	0,263	0,2565	0,2587	0,2548
1710	0,2559	0,2581	0,2589	0,2631	1710	0,2629	0,2569	0,259	0,2581
1740	0,2560	0,2582	0,2588	0,2631	1740	0,2628	0,2567	0,2591	0,2606
1770	0,2561	0,2583	0,2588	0,2631	1770	0,2625	0,2566	0,2591	0,2634
1800	0,2559	0,2582	0,2585	0,2629	1800	0,2624	0,2565	0,259	0,2643
1830	0,2556	0,2578	0,2581	0,2625	1830	0,2622	0,2566	0,259	0,2644

1860	0,2555	0,2576	0,2579	0,2623	1860	0,2622	0,2565	0,2589	0,2646
1890	0,2554	0,2574	0,2576	0,2620	1890	0,2622	0,2566	0,2588	0,2646
1920	0,2552	0,2572	0,2573	0,2618	1920	0,2622	0,2565	0,2588	0,2647
1950	0,2550	0,2569	0,2570	0,2616	1950	0,2618	0,2564	0,2589	0,2648
1980	0,2550	0,2567	0,2567	0,2614	1980	0,2616	0,2567	0,2585	0,2647
2010	0,2548	0,2565	0,2564	0,2611	2010	0,2613	0,2564	0,2587	0,2646
2040	0,2547	0,2563	0,2561	0,2609	2040	0,2612	0,2563	0,2585	0,2646
2070	0,2547	0,2562	0,2558	0,2605	2070	0,2608	0,2562	0,2584	0,2642
2100	0,2543	0,2560	0,2553	0,2602	2100	0,2605	0,256	0,2584	0,2643
2130	0,2540	0,2557	0,2550	0,2598	2130	0,2604	0,2559	0,2582	0,2642
2160	0,2538	0,2556	0,2547	0,2596	2160	0,2602	0,2559	0,2581	0,264
2190	0,2537	0,2556	0,2543	0,2593	2190	0,2601	0,256	0,2582	0,2641
2220	0,2534	0,2554	0,2541	0,2590	2220	0,2599	0,2562	0,258	0,2639
2250	0,2530	0,2551	0,2537	0,2586	2250	0,2598	0,2562	0,2582	0,2638
2280	0,2526	0,2547	0,2533	0,2581	2280	0,2595	0,2558	0,2581	0,2637
2310	0,2525	0,2546	0,2529	0,2576	2310	0,2594	0,2557	0,2579	0,2634
2340	0,2522	0,2543	0,2526	0,2574	2340	0,2592	0,2557	0,2579	0,2633
2370	0,2521	0,2540	0,2524	0,2571	2370	0,2591	0,2556	0,258	0,2633
2400	0,2519	0,2539	0,2521	0,2569	2400	0,2587	0,2554	0,2578	0,2632
2430	0,2516	0,2538	0,2519	0,2566	2430	0,2586	0,2556	0,2578	0,2633
2460	0,2516	0,2536	0,2517	0,2563	2460	0,2585	0,2554	0,2579	0,2633
2490	0,2515	0,2536	0,2515	0,2561	2490	0,2585	0,2555	0,258	0,263
2520	0,2513	0,2535	0,2513	0,2558	2520	0,2583	0,2554	0,2581	0,263
2550	0,2512	0,2534	0,2513	0,2558	2550	0,2584	0,2553	0,2579	0,2633
2580	0,2510	0,2534	0,2512	0,2556	2580	0,2583	0,2553	0,2579	0,2632
2610	0,2510	0,2531	0,2510	0,2555	2610	0,2583	0,2556	0,258	0,2631
2640	0,2508	0,2534	0,2510	0,2556	2640	0,2582	0,2554	0,258	0,263
2670	0,2509	0,2535	0,2509	0,2557	2670	0,2582	0,2555	0,2581	0,263
2700	0,2510	0,2536	0,2509	0,2560	2700	0,2581	0,2553	0,2581	0,2631
2730	0,2512	0,2537	0,2504	0,2563	2730	0,2582	0,2554	0,2583	0,2632
2760	0,2513	0,2538	0,2504	0,2565	2760	0,2584	0,2558	0,2584	0,2635
2790	0,2507	0,2531	0,2270	0,2565	2790	0,2583	0,256	0,2587	0,2635
2820	0,2509	0,2529	0,2269	0,2567	2820	0,2583	0,2561	0,2587	0,2635
2850	0,2510	0,2529	0,2274	0,2568	2850	0,2583	0,2562	0,2588	0,2636
2880	0,2511	0,2531	0,2269	0,2571	2880	0,2582	0,2562	0,2588	0,2636
2910	0,2513	0,2533	0,2262	0,2575	2910	0,2582	0,2561	0,2589	0,2637
2940	0,2515	0,2535	0,2259	0,2577	2940	0,258	0,2562	0,2588	0,2636
2970	0,2517	0,2540	0,2456	0,2581	2970	0,258	0,2562	0,2589	0,2638
3000	0,2518	0,2541	0,2454	0,2584	3000	0,2579	0,2565	0,2592	0,2638
3030	0,2519	0,2544	0,2416	0,2586	3030	0,2579	0,2564	0,259	0,2638
3060	0,2521	0,2546	0,2418	0,2589	3060	0,2577	0,2565	0,2593	0,2639

3090	0,2522	0,2548	0,2420	0,2591	3090	0,2578	0,2565	0,2593	0,2639
3120	0,2524	0,2550	0,2420	0,2592	3120	0,2577	0,2566	0,2594	0,264
3150	0,2524	0,2551	0,2454	0,2592	3150	0,2573	0,2565	0,2594	0,2638
3180	0,2524	0,2550	0,2454	0,2592	3180	0,2575	0,2565	0,2594	0,2638
3210	0,2525	0,2552	0,2455	0,2595	3210	0,2572	0,2565	0,2594	0,2636
3240	0,2526	0,2553	0,2456	0,2597	3240	0,2571	0,2565	0,2592	0,2634
3270	0,2527	0,2553	0,2456	0,2598	3270	0,257	0,2562	0,2589	0,2633
3300	0,2527	0,2554	0,2457	0,2599	3300	0,2571	0,2562	0,259	0,2634
3330	0,2528	0,2552	0,2456	0,2599	3330	0,2572	0,2561	0,259	0,2633
3360	0,2527	0,2552	0,2457	0,2599	3360	0,2569	0,2562	0,2591	0,2632
3390	0,2528	0,2552	0,2458	0,2600	3390	0,2569	0,2561	0,259	0,2633
3420	0,2529	0,2553	0,2460	0,2602	3420	0,2569	0,2561	0,2588	0,2629
3450	0,2528	0,2553	0,2460	0,2602	3450	0,2568	0,2561	0,2587	0,2629
3480	0,2529	0,2553	0,2461	0,2603	3480	0,2565	0,2559	0,2587	0,2629
3510	0,2530	0,2553	0,2462	0,2605	3510	0,2565	0,2557	0,2585	0,2626
3540	0,2530	0,2553	0,2462	0,2605	3540	0,2565	0,2556	0,2584	0,2627
3570	0,2530	0,2553	0,2463	0,2606	3570	0,2564	0,2555	0,2585	0,2624
3600	0,2530	0,2553	0,2461	0,2606	3600	0,2563	0,2554	0,2584	0,2624
3630	0,2530	0,2553	0,2461	0,2605	3630	0,2563	0,2556	0,2584	0,2623
3660	0,2528	0,2552	0,2459	0,2604	3660	0,2562	0,2554	0,2582	0,2621
3690	0,2529	0,2552	0,2460	0,2605	3690	0,2561	0,2553	0,2581	0,2622
3720	0,2529	0,2552	0,2461	0,2607	3720	0,2563	0,2553	0,2583	0,262
3750	0,2529	0,2553	0,2462	0,2607	3750	0,256	0,2551	0,2581	0,2618
3780	0,2529	0,2552	0,2460	0,2606	3780	0,2561	0,2549	0,2579	0,2615
3810	0,2528	0,2551	0,2459	0,2606	3810	0,2558	0,2547	0,2576	0,2616
3840	0,2527	0,2551	0,2460	0,2606	3840	0,2557	0,2544	0,2576	0,2613
3870	0,2528	0,2551	0,2461	0,2606	3870	0,2557	0,2543	0,2575	0,2611
3900	0,2528	0,2552	0,2461	0,2606	3900	0,2558	0,2544	0,2575	0,2613
3930	0,2529	0,2552	0,2462	0,2607	3930	0,2557	0,2545	0,2574	0,261
3960	0,2529	0,2552	0,2463	0,2606	3960	0,2557	0,2544	0,2574	0,2612
3990	0,2529	0,2551	0,2463	0,2606	3990	0,2555	0,2543	0,2574	0,261
4020	0,2528	0,2551	0,2463	0,2605	4020	0,2555	0,2542	0,2571	0,2611
4050	0,2528	0,2551	0,2466	0,2606	4050	0,2554	0,254	0,257	0,2607
4080	0,2528	0,2550	0,2464	0,2606	4080	0,2552	0,2541	0,257	0,2607
4110	0,2529	0,2552	0,2467	0,2608	4110	0,2551	0,2537	0,2569	0,2606
4140	0,2530	0,2552	0,2469	0,2608	4140	0,2553	0,2536	0,2569	0,2607
4170	0,2531	0,2553	0,2468	0,2609	4170	0,2552	0,2537	0,257	0,2608
4200	0,2531	0,2554	0,2469	0,2610	4200	0,2554	0,2539	0,2569	0,2608
4230	0,2531	0,2554	0,2469	0,2610	4230	0,2554	0,254	0,2569	0,2608
4260	0,2532	0,2553	0,2470	0,2610	4260	0,2556	0,254	0,257	0,2609
4290	0,2531	0,2554	0,2471	0,2611	4290	0,2555	0,2542	0,257	0,2607

4320	0,2533	0,2555	0,2472	0,2612	4320	0,2557	0,2542	0,257	0,2608
4350	0,2533	0,2556	0,2474	0,2613	4350	0,2553	0,2539	0,2571	0,2607
4380	0,2534	0,2558	0,2476	0,2614	4380	0,2556	0,254	0,2569	0,2607
4410	0,2535	0,2558	0,2478	0,2615	4410	0,2556	0,2538	0,2569	0,2608
4440	0,2537	0,2559	0,2477	0,2615	4440	0,2553	0,2539	0,257	0,2605
4470	0,2538	0,2559	0,2478	0,2616	4470	0,2556	0,2537	0,2571	0,2607
4500	0,2538	0,2560	0,2480	0,2617	4500	0,2555	0,254	0,2572	0,2607
4530	0,2539	0,2560	0,2481	0,2619	4530	0,2556	0,2541	0,2569	0,2607
4560	0,2540	0,2562	0,2482	0,2619	4560	0,2557	0,2541	0,2569	0,2608
4590	0,2542	0,2563	0,2482	0,2619	4590	0,2555	0,254	0,2568	0,2606
4620	0,2542	0,2564	0,2481	0,2619	4620	0,2555	0,2537	0,2569	0,2603
4650	0,2541	0,2563	0,2481	0,2619	4650	0,2553	0,2536	0,2565	0,2603
4680	0,2541	0,2563	0,2480	0,2619	4680	0,2554	0,2535	0,2565	0,2602
4710	0,2541	0,2563	0,2481	0,2619	4710	0,2555	0,2534	0,2566	0,2601
4740	0,2542	0,2564	0,2483	0,2620	4740	0,2554	0,2535	0,2565	0,26
4770	0,2542	0,2564	0,2484	0,2620	4770	0,2554	0,2533	0,2566	0,2601
4800	0,2543	0,2564	0,2484	0,2621	4800	0,2553	0,2534	0,2564	0,2601
4830	0,2542	0,2565	0,2484	0,2621	4830	0,2552	0,2531	0,2562	0,2599
4860	0,2542	0,2564	0,2482	0,2620	4860	0,2553	0,2531	0,2563	0,2598
4890	0,2541	0,2563	0,2483	0,2619	4890	0,2552	0,2529	0,2562	0,2596
4920	0,2540	0,2562	0,2482	0,2619	4920	0,2552	0,2527	0,2558	0,2595
4950	0,2540	0,2562	0,2482	0,2619	4950	0,2549	0,2524	0,2557	0,2593
4980	0,2540	0,2562	0,2483	0,2619	4980	0,2549	0,2522	0,2556	0,2591
5010	0,2539	0,2562	0,2482	0,2619	5010	0,2549	0,2519	0,2556	0,259
5040	0,2538	0,2560	0,2481	0,2618	5040	0,2549	0,252	0,2553	0,2588
5070	0,2537	0,2560	0,2479	0,2616	5070	0,255	0,252	0,2552	0,2587
5100	0,2537	0,2559	0,2478	0,2615	5100	0,2548	0,2519	0,2551	0,2587
5130	0,2535	0,2558	0,2478	0,2614	5130	0,2549	0,2514	0,255	0,2587
5160	0,2534	0,2557	0,2478	0,2615	5160	0,2547	0,2513	0,2547	0,2585
5190	0,2534	0,2556	0,2478	0,2614	5190	0,2547	0,2511	0,2544	0,2583
5220	0,2532	0,2554	0,2478	0,2613	5220	0,2545	0,2508	0,2541	0,2582
5250	0,2531	0,2554	0,2478	0,2612	5250	0,2548	0,2506	0,2541	0,2581
5280	0,2529	0,2553	0,2478	0,2612	5280	0,2549	0,2507	0,2541	0,258
5310	0,2529	0,2552	0,2477	0,2611	5310	0,2545	0,2506	0,2539	0,2578
5340	0,2527	0,2550	0,2474	0,2609	5340	0,2546	0,2508	0,2538	0,2575
5370	0,2525	0,2547	0,2472	0,2607	5370	0,2545	0,2507	0,2538	0,2574
5400	0,2523	0,2546	0,2471	0,2605	5400	0,2546	0,2505	0,2539	0,2573
5430	0,2523	0,2545	0,2470	0,2605	5430	0,2546	0,2503	0,2537	0,2572
5460	0,2522	0,2545	0,2469	0,2604	5460	0,2544	0,2501	0,2537	0,2572
5490	0,2522	0,2544	0,2469	0,2605	5490	0,2543	0,2501	0,2538	0,2569
5520	0,2522	0,2543	0,2469	0,2605	5520	0,2543	0,2501	0,2536	0,257

5550	0,2521	0,2543	0,2469	0,2604	5550	0,2544	0,25	0,2534	0,2568
5580	0,2521	0,2542	0,2469	0,2604	5580	0,2546	0,2501	0,2534	0,2569
5610	0,2521	0,2543	0,2470	0,2605	5610	0,2546	0,25	0,2537	0,2571
5640	0,2523	0,2545	0,2473	0,2606	5640	0,2548	0,2503	0,2536	0,2571
5670	0,2524	0,2546	0,2474	0,2608	5670	0,2549	0,2502	0,2537	0,2574
5700	0,2524	0,2546	0,2476	0,2608	5700	0,2549	0,2503	0,254	0,2572
5730	0,2524	0,2546	0,2475	0,2608	5730	0,2549	0,2507	0,2539	0,2571
5760	0,2525	0,2546	0,2475	0,2609	5760	0,2549	0,2504	0,2538	0,2571
5790	0,2526	0,2547	0,2476	0,2611	5790	0,2547	0,2505	0,2538	0,2571
5820	0,2527	0,2548	0,2477	0,2612	5820	0,2548	0,2506	0,2539	0,257
5850	0,2527	0,2548	0,2478	0,2613	5850	0,2551	0,2505	0,254	0,257
5880	0,2530	0,2550	0,2480	0,2614	5880	0,2551	0,2507	0,2539	0,2569
5910	0,2531	0,2551	0,2481	0,2615	5910	0,2552	0,2508	0,2539	0,257
5940	0,2532	0,2552	0,2483	0,2616	5940	0,2552	0,2506	0,2539	0,257
5970	0,2533	0,2554	0,2483	0,2617	5970	0,255	0,2507	0,2538	0,2571
6000	0,2533	0,2552	0,2483	0,2616	6000	0,2552	0,2506	0,2539	0,2571
6030	0,2532	0,2553	0,2481	0,2616	6030	0,255	0,2507	0,2539	0,2569
6060	0,2531	0,2553	0,2483	0,2617	6060	0,2549	0,2506	0,2537	0,2569
6090	0,2532	0,2553	0,2482	0,2617	6090	0,2549	0,2507	0,2537	0,2567
6120	0,2532	0,2553	0,2483	0,2618	6120	0,2548	0,2505	0,2536	0,2566
6150	0,2532	0,2553	0,2483	0,2617	6150	0,2547	0,2503	0,2536	0,2565
6180	0,2531	0,2552	0,2483	0,2616	6180	0,2548	0,2504	0,2536	0,2566
6210	0,2530	0,2551	0,2481	0,2616	6210	0,2546	0,2503	0,2534	0,2568
6240	0,2530	0,2551	0,2481	0,2616	6240	0,2546	0,2501	0,2535	0,2568
6270	0,2531	0,2550	0,2481	0,2616	6270	0,2544	0,2502	0,2533	0,2568
6300	0,2531	0,2550	0,2481	0,2616	6300	0,2542	0,2497	0,2532	0,2566
6330	0,2530	0,2549	0,2482	0,2616	6330	0,254	0,2494	0,253	0,2563
6360	0,2529	0,2548	0,2481	0,2615	6360	0,2539	0,2495	0,253	0,2563
6390	0,2527	0,2548	0,2478	0,2615	6390	0,2539	0,2497	0,2528	0,2564
6420	0,2526	0,2546	0,2477	0,2614	6420	0,2539	0,2501	0,253	0,2562
6450	0,2526	0,2545	0,2477	0,2614	6450	0,2538	0,25	0,2528	0,2561
6480	0,2525	0,2545	0,2476	0,2614	6480	0,2536	0,2498	0,2527	0,2559
6510	0,2524	0,2544	0,2476	0,2613	6510	0,2534	0,2498	0,2528	0,2557
6540	0,2525	0,2543	0,2474	0,2613	6540	0,2535	0,2499	0,2528	0,256
6570	0,2523	0,2541	0,2474	0,2613	6570	0,2532	0,2499	0,2527	0,2559
6600	0,2522	0,2540	0,2471	0,2611	6600	0,2534	0,2499	0,2527	0,2559
6630	0,2520	0,2537	0,2469	0,2610	6630	0,2529	0,25	0,2526	0,2556
6660	0,2518	0,2535	0,2464	0,2608	6660	0,2529	0,2501	0,2526	0,2556
6690	0,2517	0,2533	0,2464	0,2607	6690	0,2524	0,25	0,2522	0,2553
6720	0,2516	0,2532	0,2463	0,2607	6720	0,2524	0,25	0,2522	0,2553
6750	0,2515	0,2531	0,2463	0,2607	6750	0,2524	0,2502	0,2523	0,2554

6780	0,2513	0,2529	0,2461	0,2606	6780	0,2525	0,2503	0,2522	0,2552
6810	0,2511	0,2527	0,2459	0,2604	6810	0,2523	0,2504	0,2526	0,2553
6840	0,2509	0,2525	0,2456	0,2602	6840	0,2524	0,2505	0,2527	0,2553
6870	0,2508	0,2525	0,2453	0,2602	6870	0,2523	0,2505	0,2531	0,2551
6900	0,2507	0,2524	0,2452	0,2603	6900	0,252	0,2504	0,253	0,2549
6930	0,2507	0,2523	0,2450	0,2602	6930	0,252	0,2503	0,253	0,2548
6960	0,2506	0,2523	0,2449	0,2603	6960	0,2521	0,2505	0,2533	0,2547
6990	0,2507	0,2521	0,2448	0,2603	6990	0,252	0,2507	0,2535	0,2549
7020	0,2508	0,2520	0,2448	0,2603	7020	0,2521	0,2506	0,2533	0,255
7050	0,2508	0,2521	0,2449	0,2604	7050	0,2522	0,2506	0,2536	0,255
7080	0,2510	0,2522	0,2449	0,2606	7080	0,2522	0,2509	0,2538	0,2551
7110	0,2512	0,2523	0,2401	0,2608	7110	0,2522	0,251	0,2537	0,2552
7140	0,2498	0,2516	0,2518	0,2597	7140	0,2523	0,2512	0,2539	0,2553
7170	0,2504	0,2518	0,2515	0,2601	7170	0,2522	0,2512	0,254	0,2554
7200	0,2507	0,2518	0,2515	0,2604	7200	0,2523	0,2512	0,254	0,2555
7230	0,2507	0,2518	0,2515	0,2605	7230	0,2523	0,2513	0,2541	0,2557
7260	0,2507	0,2518	0,2514	0,2605	7260	0,2521	0,2516	0,2542	0,2556
7290	0,2506	0,2517	0,2511	0,2605	7290	0,252	0,2517	0,2541	0,2557
7320	0,2504	0,2516	0,2519	0,2606	7320	0,252	0,2515	0,2544	0,2558
7350	0,2503	0,2516	0,2519	0,2606	7350	0,252	0,2518	0,2542	0,2557
7380	0,2503	0,2515	0,2517	0,2605	7380	0,2518	0,2518	0,2543	0,2561
7410	0,2502	0,2513	0,2515	0,2605	7410	0,2518	0,2517	0,2544	0,2562
7440	0,2500	0,2510	0,2513	0,2604	7440	0,2514	0,2517	0,2543	0,256
7470	0,2498	0,2508	0,2510	0,2603	7470	0,2512	0,2518	0,2542	0,256
7500	0,2497	0,2507	0,2508	0,2602	7500	0,2512	0,2517	0,2542	0,2559
7530	0,2494	0,2504	0,2505	0,2601	7530	0,2509	0,2515	0,2541	0,2559
7560	0,2493	0,2504	0,2504	0,2602	7560	0,2507	0,2518	0,2542	0,2561
7590	0,2492	0,2501	0,2501	0,2600	7590	0,2507	0,2519	0,2541	0,2563
7620	0,2490	0,2500	0,2500	0,2600	7620	0,2506	0,2515	0,254	0,2562
7650	0,2490	0,2497	0,2498	0,2600	7650	0,2504	0,2516	0,254	0,2563
7680	0,2487	0,2494	0,2496	0,2599	7680	0,2501	0,2518	0,254	0,2564
7710	0,2485	0,2492	0,2492	0,2596	7710	0,25	0,2515	0,2538	0,2565
7740	0,2482	0,2487	0,2488	0,2594	7740	0,25	0,2513	0,2536	0,2563
7770	0,2479	0,2485	0,2485	0,2592	7770	0,2496	0,2513	0,2535	0,2562
7800	0,2475	0,2481	0,2483	0,2590	7800	0,2495	0,2513	0,2534	0,2562
7830	0,2473	0,2480	0,2481	0,2590	7830	0,2495	0,2512	0,2535	0,2562
7860	0,2471	0,2477	0,2477	0,2589	7860	0,2493	0,2512	0,2534	0,2561
7890	0,2469	0,2475	0,2476	0,2588	7890	0,2493	0,2514	0,2532	0,256
7920	0,2466	0,2472	0,2473	0,2586	7920	0,2489	0,251	0,253	0,256
7950	0,2463	0,2469	0,2470	0,2584	7950	0,2486	0,2509	0,2528	0,256
7980	0,2460	0,2467	0,2466	0,2583	7980	0,2486	0,2509	0,2529	0,2557

8010	0,2458	0,2464	0,2465	0,2583	8010	0,2484	0,2509	0,2529	0,2557
8040	0,2457	0,2462	0,2464	0,2582	8040	0,2483	0,2507	0,2528	0,2557
8070	0,2454	0,2460	0,2463	0,2581	8070	0,248	0,2507	0,2526	0,2553
8100	0,2451	0,2457	0,2463	0,2580	8100	0,2476	0,2504	0,2521	0,255
8130	0,2450	0,2455	0,2460	0,2578	8130	0,2473	0,2504	0,252	0,2548
8160	0,2447	0,2452	0,2457	0,2577	8160	0,2471	0,2502	0,2521	0,2546
8190	0,2445	0,2450	0,2456	0,2576	8190	0,2471	0,2503	0,2522	0,2546
8220	0,2443	0,2448	0,2453	0,2576	8220	0,2469	0,2502	0,252	0,2546
8250	0,2442	0,2447	0,2452	0,2575	8250	0,2471	0,2501	0,2518	0,2544
8280	0,2440	0,2445	0,2448	0,2574	8280	0,2471	0,2501	0,2519	0,2546
8310	0,2437	0,2443	0,2448	0,2574	8310	0,2468	0,25	0,2517	0,2544
8340	0,2435	0,2441	0,2446	0,2572	8340	0,2467	0,2498	0,2513	0,2544
8370	0,2433	0,2437	0,2444	0,2570	8370	0,2469	0,25	0,2513	0,2544
8400	0,2430	0,2436	0,2443	0,2569	8400	0,2467	0,25	0,2513	0,2543
8430	0,2428	0,2435	0,2441	0,2568	8430	0,2468	0,2501	0,2512	0,2546
8460	0,2427	0,2434	0,2441	0,2569	8460	0,2468	0,2501	0,2513	0,2548
8490	0,2427	0,2434	0,2442	0,2570	8490	0,2471	0,2503	0,2514	0,2549
8520	0,2427	0,2433	0,2442	0,2571	8520	0,2469	0,2504	0,2516	0,255
8550	0,2425	0,2431	0,2440	0,2570	8550	0,2468	0,2505	0,2517	0,255
8580	0,2422	0,2429	0,2438	0,2568	8580	0,2465	0,2503	0,2518	0,2549
8610	0,2421	0,2427	0,2436	0,2568	8610	0,2467	0,2504	0,2517	0,2551
8640	0,2422	0,2427	0,2429	0,2560	8640	0,2469	0,2505	0,2516	0,255
8670	0,2422	0,2427	0,2430	0,2566	8670	0,2472	0,2503	0,2517	0,255
8700	0,2421	0,2426	0,2430	0,2570	8700	0,2473	0,2504	0,2518	0,2552
8730	0,2418	0,2424	0,2429	0,2570	8730	0,2472	0,2502	0,2516	0,255
8760	0,2417	0,2423	0,2428	0,2569	8760	0,2472	0,2503	0,2515	0,255
8790	0,2416	0,2420	0,2426	0,2569	8790	0,2472	0,2501	0,2514	0,255
8820	0,2413	0,2418	0,2425	0,2568	8820	0,2472	0,2503	0,2512	0,2549
8850	0,2413	0,2420	0,2431	0,2570	8850	0,2474	0,2502	0,2512	0,2553
8880	0,2412	0,2419	0,2432	0,2570	8880	0,2476	0,2503	0,251	0,2552
8910	0,2412	0,2419	0,2433	0,2571	8910	0,2476	0,2503	0,251	0,2551
8940	0,2408	0,2416	0,2431	0,2569	8940	0,2477	0,25	0,2509	0,2551
8970	0,2404	0,2412	0,2428	0,2566	8970	0,2474	0,2502	0,251	0,255
9000	0,2401	0,2407	0,2422	0,2562	9000	0,2473	0,2498	0,2506	0,2546
9030	0,2395	0,2403	0,2419	0,2559	9030	0,2471	0,2497	0,2505	0,2544
9060	0,2391	0,2400	0,2415	0,2555	9060	0,2468	0,2496	0,2501	0,2542
9090	0,2388	0,2399	0,2414	0,2553	9090	0,2469	0,2497	0,2501	0,254
9120	0,2385	0,2396	0,2411	0,2551	9120	0,2469	0,2496	0,25	0,2542
9150	0,2385	0,2394	0,2410	0,2550	9150	0,2471	0,2492	0,2499	0,254
9180	0,2383	0,2391	0,2408	0,2548	9180	0,2472	0,2491	0,2498	0,2539
9210	0,2378	0,2389	0,2404	0,2544	9210	0,2467	0,2489	0,2498	0,2536

9240	0,2375	0,2387	0,2398	0,2542	9240	0,2469	0,2486	0,2499	0,2535
9270	0,2372	0,2384	0,2397	0,2540	9270	0,247	0,2486	0,2498	0,2535
9300	0,2370	0,2382	0,2396	0,2538	9300	0,2469	0,2485	0,2497	0,2535
9330	0,2368	0,2380	0,2397	0,2537	9330	0,2468	0,2483	0,2495	0,2534
9360	0,2367	0,2377	0,2395	0,2534	9360	0,2466	0,2482	0,2493	0,253
9390	0,2364	0,2374	0,2393	0,2532	9390	0,2463	0,2478	0,2492	0,2531
9420	0,2360	0,2373	0,2391	0,2530	9420	0,2464	0,2477	0,2493	0,2528
9450	0,2357	0,2370	0,2388	0,2528	9450	0,2461	0,2477	0,249	0,2529
9480	0,2354	0,2366	0,2385	0,2525	9480	0,246	0,2476	0,2489	0,253
9510	0,2351	0,2363	0,2382	0,2522	9510	0,2463	0,2474	0,249	0,2531
9540	0,2348	0,2360	0,2380	0,2520	9540	0,2463	0,2471	0,2491	0,253
9570	0,2344	0,2357	0,2378	0,2518	9570	0,2463	0,2469	0,2491	0,253
9600	0,2343	0,2356	0,2376	0,2515	9600	0,2461	0,2466	0,2489	0,253
9630	0,2341	0,2354	0,2375	0,2514	9630	0,246	0,2464	0,2486	0,253
9660	0,2338	0,2352	0,2373	0,2512	9660	0,246	0,2461	0,2485	0,2528
9690	0,2336	0,2349	0,2370	0,2509	9690	0,2461	0,2458	0,2485	0,2529
9720	0,2332	0,2346	0,2369	0,2507	9720	0,2462	0,2458	0,2486	0,253
9750	0,2329	0,2343	0,2368	0,2506	9750	0,2464	0,246	0,2483	0,2533
9780	0,2328	0,2342	0,2367	0,2506	9780	0,2465	0,2456	0,2483	0,2522
9810	0,2327	0,2341	0,2368	0,2505					
9840	0,2326	0,2339	0,2366	0,2503					
9870	0,2324	0,2338	0,2364	0,2501					

Cuadro B2. Datos de corriente en el tiempo de la ensayo de CCM con II-C1-A (L.

harbinensis) inoculada.

CCM con agua miel sin diluir					CCM agua miel diluida				
Tiempo (min)	Control (mA)	Réplica 1 (mA)	Réplica 2 (mA)	Réplica 3 (mA)	Tiempo (min)	Control (mA)	Réplica 1 (mA)	Réplica 2 (mA)	Réplica 3 (mA)
0	0,1440	0,1532	0,1592	0,1433	0	0,2288	0,2305	0,2039	0,2165
30	0,1680	0,1795	0,1861	0,1755	30	0,2375	0,2369	0,2171	0,2271
60	0,1776	0,1899	0,1969	0,1877	60	0,2409	0,2392	0,2231	0,2318
90	0,1840	0,1961	0,2033	0,1939	90	0,2430	0,2409	0,2264	0,2341
120	0,1890	0,2002	0,2075	0,1987	120	0,2444	0,2414	0,2286	0,2357
150	0,1925	0,2033	0,2106	0,2019	150	0,2453	0,2424	0,2302	0,2366
180	0,1958	0,2056	0,2131	0,2047	180	0,2462	0,2432	0,2314	0,2374
210	0,1984	0,2077	0,2152	0,2070	210	0,2467	0,2434	0,2324	0,2382
240	0,2002	0,2095	0,2170	0,2085	240	0,2472	0,2437	0,2328	0,2386
270	0,2022	0,2109	0,2185	0,2104	270	0,2476	0,2442	0,2333	0,2390
300	0,2038	0,2121	0,2197	0,2121	300	0,2477	0,2443	0,2332	0,2393
330	0,2054	0,2131	0,2208	0,2135	330	0,2480	0,2444	0,2336	0,2395
360	0,2067	0,2142	0,2219	0,2146	360	0,2482	0,2447	0,2337	0,2396
390	0,2078	0,2152	0,2228	0,2162	390	0,2483	0,2449	0,2336	0,2395
420	0,2089	0,2160	0,2238	0,2177	420	0,2485	0,2450	0,2340	0,2398
450	0,2099	0,2169	0,2247	0,2198	450	0,2487	0,2449	0,2341	0,2397
480	0,2104	0,2179	0,2256	0,2225	480	0,2486	0,2451	0,2340	0,2396
510	0,2112	0,2187	0,2265	0,2268	510	0,2490	0,2452	0,2342	0,2395
540	0,2118	0,2197	0,2275	0,2340	540	0,2489	0,2452	0,2343	0,2397
570	0,2123	0,2207	0,2285	0,2426	570	0,2492	0,2455	0,2346	0,2396
600	0,2129	0,2222	0,2300	0,2497	600	0,2491	0,2456	0,2344	0,2393
630	0,2134	0,2240	0,2320	0,2565	630	0,2492	0,2457	0,2341	0,2389
660	0,2139	0,2270	0,2351	0,2610	660	0,2490	0,2459	0,2341	0,2385
690	0,2144	0,2316	0,2397	0,2620	690	0,2491	0,2461	0,2338	0,2381
720	0,2148	0,2379	0,2461	0,2623	720	0,2491	0,2466	0,2340	0,2381
750	0,2149	0,2437	0,2519	0,2624	750	0,2493	0,2471	0,2339	0,2377
780	0,2154	0,2470	0,2554	0,2626	780	0,2490	0,2482	0,2338	0,2375
810	0,2158	0,2489	0,2574	0,2627	810	0,2493	0,2510	0,2338	0,2372
840	0,2163	0,2509	0,2595	0,2628	840	0,2492	0,2529	0,2337	0,2367
870	0,2169	0,2534	0,2620	0,2629	870	0,2492	0,2546	0,2336	0,2365
900	0,2180	0,2551	0,2636	0,2630	900	0,2491	0,2551	0,2333	0,2363
930	0,2188	0,2555	0,2640	0,2629	930	0,2493	0,2556	0,2333	0,2359

960	0,2201	0,2554	0,2639	0,2628	960	0,2494	0,2550	0,2335	0,2356
990	0,2226	0,2553	0,2639	0,2628	990	0,2498	0,2534	0,2335	0,2354
1020	0,2267	0,2553	0,2639	0,2629	1020	0,2501	0,2519	0,2337	0,2355
1050	0,2339	0,2553	0,2639	0,2630	1050	0,2510	0,2511	0,2340	0,2355
1080	0,2419	0,2554	0,2641	0,2632	1080	0,2517	0,2500	0,2342	0,2356
1110	0,2494	0,2554	0,2642	0,2632	1110	0,2532	0,2495	0,2347	0,2361
1140	0,2529	0,2555	0,2642	0,2633	1140	0,2566	0,2492	0,2357	0,2366
1170	0,2545	0,2556	0,2643	0,2633	1170	0,2573	0,2493	0,2369	0,2376
1200	0,2558	0,2557	0,2643	0,2634	1200	0,2550	0,2497	0,2386	0,2389
1230	0,2569	0,2559	0,2645	0,2635	1230	0,2531	0,2505	0,2394	0,2399
1260	0,2575	0,2561	0,2647	0,2638	1260	0,2536	0,2517	0,2384	0,2388
1290	0,2577	0,2563	0,2650	0,2640	1290	0,2553	0,2532	0,2373	0,2378
1320	0,2581	0,2565	0,2651	0,2641	1320	0,2574	0,2555	0,2369	0,2374
1350	0,2582	0,2565	0,2652	0,2641	1350	0,2582	0,2568	0,2376	0,2379
1380	0,2584	0,2567	0,2653	0,2643	1380	0,2573	0,2566	0,2379	0,2384
1410	0,2586	0,2568	0,2654	0,2644	1410	0,2549	0,2563	0,2378	0,2385
1440	0,2587	0,2568	0,2654	0,2642	1440	0,2536	0,2568	0,2374	0,2383
1470	0,2588	0,2570	0,2655	0,2644	1470	0,2534	0,2580	0,2371	0,2382
1500	0,2587	0,2569	0,2655	0,2643	1500	0,2534	0,2587	0,2369	0,2377
1530	0,2585	0,2569	0,2654	0,2642	1530	0,2536	0,2588	0,2369	0,2380
1560	0,2585	0,2568	0,2654	0,2641	1560	0,2544	0,2592	0,2372	0,2381
1590	0,2583	0,2567	0,2653	0,2641	1590	0,2571	0,2592	0,2379	0,2390
1620	0,2582	0,2567	0,2652	0,2639	1620	0,2595	0,2591	0,2390	0,2398
1650	0,2580	0,2566	0,2652	0,2638	1650	0,2615	0,2589	0,2402	0,2408
1680	0,2577	0,2566	0,2650	0,2636	1680	0,2632	0,2588	0,2411	0,2417
1710	0,2576	0,2565	0,2651	0,2635	1710	0,2639	0,2588	0,2435	0,2436
1740	0,2574	0,2564	0,2649	0,2634	1740	0,2639	0,2587	0,2449	0,2454
1770	0,2570	0,2563	0,2648	0,2633	1770	0,2639	0,2585	0,2452	0,2463
1800	0,2567	0,2562	0,2646	0,2630	1800	0,2641	0,2584	0,2457	0,2476
1830	0,2564	0,2560	0,2645	0,2627	1830	0,2638	0,2583	0,2468	0,2487
1860	0,2560	0,2558	0,2643	0,2625	1860	0,2639	0,2582	0,2494	0,2518
1890	0,2559	0,2557	0,2642	0,2623	1890	0,2636	0,2581	0,2525	0,2555
1920	0,2556	0,2556	0,2641	0,2622	1920	0,2636	0,2579	0,2550	0,2587
1950	0,2554	0,2555	0,2640	0,2619	1950	0,2634	0,2578	0,2552	0,2591
1980	0,2550	0,2553	0,2638	0,2616	1980	0,2632	0,2576	0,2552	0,2592
2010	0,2546	0,2551	0,2636	0,2614	2010	0,2629	0,2574	0,2550	0,2593
2040	0,2543	0,2550	0,2634	0,2611	2040	0,2627	0,2572	0,2550	0,2592
2070	0,2540	0,2549	0,2634	0,2609	2070	0,2623	0,2572	0,2544	0,2591
2100	0,2537	0,2548	0,2632	0,2606	2100	0,2623	0,2569	0,2544	0,2590
2130	0,2533	0,2547	0,2631	0,2603	2130	0,2620	0,2566	0,2542	0,2588
2160	0,2530	0,2545	0,2629	0,2598	2160	0,2617	0,2566	0,2535	0,2586

2190	0,2526	0,2544	0,2628	0,2593	2190	0,2616	0,2563	0,2537	0,2585
2220	0,2523	0,2542	0,2627	0,2585	2220	0,2616	0,2563	0,2529	0,2582
2250	0,2520	0,2540	0,2625	0,2570	2250	0,2612	0,2560	0,2530	0,2582
2280	0,2516	0,2538	0,2623	0,2546	2280	0,2610	0,2561	0,2532	0,2586
2310	0,2511	0,2536	0,2620	0,2523	2310	0,2607	0,2561	0,2530	0,2584
2340	0,2507	0,2533	0,2617	0,2502	2340	0,2604	0,2558	0,2528	0,2580
2370	0,2504	0,2531	0,2616	0,2487	2370	0,2603	0,2556	0,2518	0,2575
2400	0,2503	0,2530	0,2615	0,2475	2400	0,2600	0,2555	0,2521	0,2576
2430	0,2501	0,2528	0,2614	0,2467	2430	0,2598	0,2554	0,2517	0,2575
2460	0,2498	0,2527	0,2613	0,2462	2460	0,2596	0,2554	0,2523	0,2579
2490	0,2498	0,2526	0,2612	0,2461	2490	0,2593	0,2552	0,2519	0,2575
2520	0,2497	0,2526	0,2612	0,2459	2520	0,2590	0,2551	0,2518	0,2576
2550	0,2496	0,2524	0,2612	0,2458	2550	0,2591	0,2548	0,2516	0,2572
2580	0,2497	0,2525	0,2613	0,2460	2580	0,2586	0,2547	0,2515	0,2573
2610	0,2498	0,2527	0,2614	0,2462	2610	0,2586	0,2548	0,2517	0,2574
2640	0,2500	0,2555	0,2578	0,2459	2640	0,2586	0,2547	0,2517	0,2575
2670	0,2501	0,2554	0,2580	0,2458	2670	0,2586	0,2548	0,2517	0,2574
2700	0,2503	0,2554	0,2581	0,2462	2700	0,2588	0,2547	0,2517	0,2574
2730	0,2505	0,2554	0,2584	0,2464	2730	0,2575	0,2539	0,2332	0,2397
2760	0,2506	0,2552	0,2585	0,2463	2760	0,2463	0,2525	0,2176	0,2246
2790	0,2507	0,2549	0,2587	0,2463	2790	0,2426	0,2522	0,2178	0,2234
2820	0,2509	0,2549	0,2589	0,2464	2820	0,2424	0,2525	0,2194	0,2255
2850	0,2512	0,2548	0,2589	0,2463	2850	0,2431	0,2531	0,2214	0,2276
2880	0,2513	0,2547	0,2590	0,2459	2880	0,2440	0,2542	0,2232	0,2291
2910	0,2513	0,2545	0,2590	0,2457	2910	0,2449	0,2547	0,2250	0,2305
2940	0,2512	0,2542	0,2589	0,2452	2940	0,2453	0,2548	0,2264	0,2314
2970	0,2513	0,2541	0,2587	0,2455	2970	0,2461	0,2547	0,2273	0,2322
3000	0,2514	0,2540	0,2586	0,2466	3000	0,2468	0,2546	0,2282	0,2329
3030	0,2515	0,2539	0,2585	0,2476	3030	0,2475	0,2549	0,2290	0,2334
3060	0,2515	0,2537	0,2584	0,2485	3060	0,2482	0,2548	0,2297	0,2340
3090	0,2514	0,2535	0,2582	0,2492	3090	0,2490	0,2549	0,2301	0,2345
3120	0,2514	0,2535	0,2580	0,2498	3120	0,2497	0,2551	0,2308	0,2350
3150	0,2513	0,2534	0,2577	0,2504	3150	0,2504	0,2550	0,2315	0,2355
3180	0,2512	0,2533	0,2576	0,2508	3180	0,2507	0,2549	0,2322	0,2364
3210	0,2512	0,2532	0,2575	0,2513	3210	0,2515	0,2549	0,2328	0,2371
3240	0,2512	0,2531	0,2574	0,2515	3240	0,2529	0,2548	0,2340	0,2385
3270	0,2511	0,2529	0,2573	0,2518	3270	0,2532	0,2546	0,2352	0,2403
3300	0,2510	0,2528	0,2570	0,2520	3300	0,2530	0,2548	0,2341	0,2396
3330	0,2510	0,2526	0,2569	0,2523	3330	0,2546	0,2548	0,2355	0,2413
3360	0,2509	0,2526	0,2568	0,2523	3360	0,2559	0,2546	0,2375	0,2429
3390	0,2509	0,2524	0,2567	0,2526	3390	0,2568	0,2547	0,2401	0,2445

3420	0,2508	0,2522	0,2565	0,2527	3420	0,2571	0,2546	0,2410	0,2448
3450	0,2506	0,2520	0,2563	0,2527	3450	0,2571	0,2542	0,2425	0,2459
3480	0,2504	0,2517	0,2561	0,2528	3480	0,2572	0,2542	0,2437	0,2467
3510	0,2502	0,2515	0,2560	0,2527	3510	0,2570	0,2541	0,2444	0,2473
3540	0,2501	0,2514	0,2559	0,2527	3540	0,2569	0,2543	0,2451	0,2479
3570	0,2500	0,2511	0,2557	0,2527	3570	0,2569	0,2541	0,2458	0,2487
3600	0,2499	0,2509	0,2556	0,2526	3600	0,2568	0,2542	0,2457	0,2486
3630	0,2497	0,2506	0,2554	0,2525	3630	0,2567	0,2541	0,2468	0,2500
3660	0,2495	0,2504	0,2551	0,2521	3660	0,2565	0,2540	0,2471	0,2504
3690	0,2492	0,2501	0,2550	0,2521	3690	0,2567	0,2538	0,2483	0,2517
3720	0,2491	0,2499	0,2549	0,2520	3720	0,2564	0,2537	0,2500	0,2535
3750	0,2491	0,2498	0,2547	0,2518	3750	0,2565	0,2538	0,2506	0,2544
3780	0,2490	0,2496	0,2546	0,2520	3780	0,2565	0,2536	0,2511	0,2551
3810	0,2487	0,2492	0,2544	0,2518	3810	0,2564	0,2533	0,2513	0,2555
3840	0,2486	0,2490	0,2541	0,2516	3840	0,2562	0,2533	0,2510	0,2552
3870	0,2483	0,2485	0,2540	0,2515	3870	0,2562	0,2534	0,2507	0,2551
3900	0,2482	0,2484	0,2539	0,2515	3900	0,2560	0,2532	0,2506	0,2551
3930	0,2481	0,2482	0,2538	0,2515	3930	0,2561	0,2531	0,2507	0,2548
3960	0,2480	0,2480	0,2538	0,2515	3960	0,2560	0,2530	0,2506	0,2550
3990	0,2480	0,2480	0,2537	0,2515	3990	0,2563	0,2529	0,2508	0,2549
4020	0,2480	0,2478	0,2537	0,2515	4020	0,2563	0,2530	0,2508	0,2547
4050	0,2479	0,2476	0,2536	0,2515	4050	0,2561	0,2532	0,2507	0,2543
4080	0,2479	0,2474	0,2536	0,2515	4080	0,2563	0,2530	0,2509	0,2547
4110	0,2479	0,2474	0,2536	0,2516	4110	0,2564	0,2532	0,2509	0,2549
4140	0,2480	0,2472	0,2536	0,2516	4140	0,2566	0,2533	0,2513	0,2554
4170	0,2480	0,2472	0,2537	0,2517	4170	0,2569	0,2533	0,2514	0,2556
4200	0,2481	0,2472	0,2539	0,2520	4200	0,2570	0,2535	0,2517	0,2558
4230	0,2480	0,2470	0,2538	0,2518	4230	0,2572	0,2538	0,2518	0,2561
4260	0,2479	0,2467	0,2538	0,2519	4260	0,2574	0,2539	0,2519	0,2559
4290	0,2479	0,2466	0,2538	0,2517	4290	0,2574	0,2540	0,2517	0,2559
4320	0,2480	0,2467	0,2539	0,2517	4320	0,2575	0,2539	0,2517	0,2557
4350	0,2480	0,2466	0,2539	0,2518	4350	0,2576	0,2539	0,2516	0,2559
4380	0,2478	0,2464	0,2538	0,2516	4380	0,2576	0,2539	0,2513	0,2555
4410	0,2477	0,2462	0,2538	0,2516	4410	0,2577	0,2539	0,2512	0,2556
4440	0,2475	0,2460	0,2537	0,2514	4440	0,2575	0,2538	0,2514	0,2555
4470	0,2474	0,2458	0,2536	0,2511	4470	0,2576	0,2537	0,2515	0,2556
4500	0,2472	0,2456	0,2535	0,2510	4500	0,2576	0,2533	0,2512	0,2555
4530	0,2470	0,2454	0,2534	0,2508	4530	0,2574	0,2533	0,2511	0,2553
4560	0,2469	0,2453	0,2533	0,2507	4560	0,2572	0,2533	0,2508	0,2552
4590	0,2467	0,2453	0,2533	0,2505	4590	0,2573	0,2529	0,2508	0,2550
4620	0,2465	0,2450	0,2532	0,2502	4620	0,2571	0,2532	0,2511	0,2551

4650	0,2462	0,2448	0,2530	0,2500	4650	0,2571	0,2532	0,2509	0,2549
4680	0,2460	0,2447	0,2529	0,2499	4680	0,2572	0,2529	0,2513	0,2551
4710	0,2457	0,2446	0,2527	0,2495	4710	0,2568	0,2529	0,2508	0,2549
4740	0,2454	0,2444	0,2526	0,2493	4740	0,2568	0,2529	0,2506	0,2547
4770	0,2452	0,2442	0,2524	0,2490	4770	0,2567	0,2529	0,2509	0,2547
4800	0,2450	0,2441	0,2523	0,2489	4800	0,2565	0,2527	0,2507	0,2544
4830	0,2449	0,2440	0,2522	0,2487	4830	0,2565	0,2525	0,2506	0,2544
4860	0,2446	0,2438	0,2522	0,2485	4860	0,2565	0,2523	0,2502	0,2542
4890	0,2443	0,2435	0,2519	0,2482	4890	0,2563	0,2521	0,2498	0,2539
4920	0,2440	0,2434	0,2518	0,2479	4920	0,2560	0,2520	0,2500	0,2539
4950	0,2437	0,2432	0,2516	0,2477	4950	0,2559	0,2517	0,2496	0,2538
4980	0,2433	0,2431	0,2516	0,2475	4980	0,2559	0,2517	0,2496	0,2537
5010	0,2430	0,2431	0,2515	0,2473	5010	0,2558	0,2517	0,2497	0,2538
5040	0,2426	0,2430	0,2515	0,2472	5040	0,2557	0,2515	0,2497	0,2537
5070	0,2422	0,2429	0,2513	0,2470	5070	0,2556	0,2514	0,2495	0,2534
5100	0,2419	0,2428	0,2511	0,2467	5100	0,2556	0,2514	0,2492	0,2536
5130	0,2416	0,2427	0,2510	0,2464	5130	0,2553	0,2512	0,2492	0,2534
5160	0,2412	0,2426	0,2509	0,2463	5160	0,2553	0,2510	0,2489	0,2531
5190	0,2410	0,2426	0,2509	0,2462	5190	0,2551	0,2507	0,2489	0,2530
5220	0,2407	0,2425	0,2509	0,2461	5220	0,2549	0,2508	0,2489	0,2531
5250	0,2403	0,2425	0,2508	0,2459	5250	0,2549	0,2508	0,2486	0,2528
5280	0,2400	0,2424	0,2507	0,2457	5280	0,2548	0,2504	0,2488	0,2529
5310	0,2396	0,2424	0,2506	0,2455	5310	0,2546	0,2503	0,2485	0,2527
5340	0,2392	0,2423	0,2504	0,2452	5340	0,2547	0,2503	0,2484	0,2526
5370	0,2389	0,2421	0,2503	0,2450	5370	0,2545	0,2502	0,2482	0,2525
5400	0,2384	0,2422	0,2502	0,2450	5400	0,2546	0,2502	0,2483	0,2526
5430	0,2382	0,2423	0,2503	0,2448	5430	0,2547	0,2501	0,2486	0,2528
5460	0,2380	0,2424	0,2504	0,2448	5460	0,2545	0,2500	0,2485	0,2525
5490	0,2376	0,2424	0,2503	0,2446	5490	0,2545	0,2502	0,2483	0,2525
5520	0,2373	0,2423	0,2504	0,2445	5520	0,2546	0,2502	0,2481	0,2524
5550	0,2371	0,2425	0,2504	0,2444	5550	0,2545	0,2502	0,2484	0,2525
5580	0,2369	0,2427	0,2505	0,2444	5580	0,2547	0,2502	0,2480	0,2525
5610	0,2368	0,2430	0,2507	0,2445	5610	0,2549	0,2504	0,2483	0,2529
5640	0,2366	0,2432	0,2508	0,2444	5640	0,2551	0,2502	0,2486	0,2531
5670	0,2364	0,2433	0,2508	0,2444	5670	0,2552	0,2504	0,2487	0,2530
5700	0,2361	0,2434	0,2508	0,2442	5700	0,2552	0,2503	0,2489	0,2532
5730	0,2359	0,2435	0,2508	0,2440	5730	0,2553	0,2506	0,2488	0,2531
5760	0,2356	0,2436	0,2508	0,2440	5760	0,2554	0,2507	0,2489	0,2531
5790	0,2355	0,2436	0,2509	0,2438	5790	0,2553	0,2506	0,2488	0,2531
5820	0,2352	0,2438	0,2509	0,2438	5820	0,2554	0,2507	0,2488	0,2532
5850	0,2349	0,2438	0,2509	0,2435	5850	0,2552	0,2508	0,2487	0,2532

5880	0,2347	0,2439	0,2510	0,2434	5880	0,2553	0,2508	0,2485	0,2530
5910	0,2345	0,2439	0,2508	0,2431	5910	0,2554	0,2508	0,2484	0,2529
5940	0,2343	0,2439	0,2508	0,2428	5940	0,2553	0,2509	0,2480	0,2528
5970	0,2340	0,2437	0,2507	0,2426	5970	0,2551	0,2507	0,2480	0,2528
6000	0,2338	0,2436	0,2506	0,2424	6000	0,2552	0,2506	0,2479	0,2528
6030	0,2336	0,2437	0,2505	0,2421	6030	0,2552	0,2503	0,2479	0,2528
6060	0,2333	0,2436	0,2506	0,2419	6060	0,2554	0,2505	0,2478	0,2525
6090	0,2331	0,2438	0,2506	0,2418	6090	0,2551	0,2504	0,2477	0,2525
6120	0,2327	0,2437	0,2504	0,2415	6120	0,2552	0,2503	0,2473	0,2522
6150	0,2324	0,2436	0,2504	0,2413	6150	0,2551	0,2501	0,2472	0,2522
6180	0,2321	0,2436	0,2504	0,2411	6180	0,2550	0,2500	0,2472	0,2522
6210	0,2319	0,2436	0,2503	0,2407	6210	0,2550	0,2499	0,2469	0,2521
6240	0,2315	0,2436	0,2503	0,2405	6240	0,2547	0,2498	0,2468	0,2519
6270	0,2313	0,2436	0,2501	0,2401	6270	0,2548	0,2498	0,2466	0,2519
6300	0,2309	0,2435	0,2500	0,2399	6300	0,2547	0,2497	0,2466	0,2516
6330	0,2306	0,2433	0,2497	0,2395	6330	0,2545	0,2497	0,2463	0,2516
6360	0,2302	0,2433	0,2494	0,2393	6360	0,2543	0,2496	0,2461	0,2514
6390	0,2300	0,2432	0,2494	0,2391	6390	0,2541	0,2494	0,2458	0,2513
6420	0,2298	0,2433	0,2493	0,2389	6420	0,2541	0,2495	0,2458	0,2511
6450	0,2294	0,2434	0,2491	0,2387	6450	0,2541	0,2492	0,2455	0,2508
6480	0,2291	0,2432	0,2490	0,2383	6480	0,2541	0,2493	0,2456	0,2506
6510	0,2288	0,2431	0,2487	0,2380	6510	0,2539	0,2491	0,2453	0,2505
6540	0,2284	0,2430	0,2485	0,2377	6540	0,2539	0,2489	0,2447	0,2500
6570	0,2281	0,2418	0,2495	0,2373	6570	0,2539	0,2486	0,2447	0,2500
6600	0,2277	0,2428	0,2482	0,2370	6600	0,2535	0,2488	0,2443	0,2496
6630	0,2274	0,2427	0,2481	0,2368	6630	0,2538	0,2487	0,2441	0,2495
6660	0,2271	0,2427	0,2480	0,2366	6660	0,2536	0,2487	0,2439	0,2492
6690	0,2268	0,2427	0,2479	0,2364	6690	0,2535	0,2486	0,2436	0,2491
6720	0,2265	0,2425	0,2477	0,2359	6720	0,2534	0,2484	0,2432	0,2486
6750	0,2261	0,2424	0,2476	0,2357	6750	0,2533	0,2484	0,2431	0,2484
6780	0,2258	0,2424	0,2475	0,2356	6780	0,2534	0,2481	0,2426	0,2482
6810	0,2256	0,2410	0,2490	0,2354	6810	0,2531	0,2481	0,2427	0,2481
6840	0,2254	0,2424	0,2477	0,2352	6840	0,2532	0,2483	0,2424	0,2482
6870	0,2253	0,2425	0,2478	0,2352	6870	0,2531	0,2482	0,2422	0,2480
6900	0,2250	0,2426	0,2477	0,2350	6900	0,2533	0,2482	0,2422	0,2478
6930	0,2247	0,2426	0,2478	0,2348	6930	0,2530	0,2483	0,2419	0,2476
6960	0,2247	0,2426	0,2481	0,2346	6960	0,2531	0,2482	0,2418	0,2474
6990	0,2247	0,2424	0,2486	0,2348	6990	0,2531	0,2481	0,2414	0,2473
7020	0,2247	0,2429	0,2487	0,2349	7020	0,2533	0,2482	0,2414	0,2471
7050	0,2247	0,2434	0,2487	0,2350	7050	0,2532	0,2482	0,2412	0,2473
7080	0,2246	0,2436	0,2489	0,2349	7080	0,2533	0,2483	0,2412	0,2474

7110	0,2244	0,2438	0,2491	0,2349	7110	0,2533	0,2484	0,2412	0,2473
7140	0,2243	0,2438	0,2494	0,2349	7140	0,2533	0,2482	0,2412	0,2474
7170	0,2239	0,2438	0,2493	0,2348	7170	0,2534	0,2482	0,2417	0,2477
7200	0,2236	0,2438	0,2494	0,2344	7200	0,2535	0,2480	0,2418	0,2479
7230	0,2234	0,2440	0,2495	0,2343	7230	0,2534	0,2482	0,2419	0,2482
7260	0,2231	0,2439	0,2497	0,2343	7260	0,2535	0,2483	0,2422	0,2487
7290	0,2227	0,2440	0,2498	0,2341	7290	0,2534	0,2482	0,2423	0,2490
7320	0,2222	0,2438	0,2497	0,2336	7320	0,2534	0,2481	0,2426	0,2490
7350	0,2212	0,2424	0,2505	0,2328	7350	0,2535	0,2483	0,2425	0,2492
7380	0,2215	0,2422	0,2503	0,2325	7380	0,2536	0,2482	0,2428	0,2494
7410	0,2214	0,2420	0,2501	0,2321	7410	0,2535	0,2481	0,2429	0,2495
7440	0,2213	0,2419	0,2500	0,2319	7440	0,2533	0,2481	0,2432	0,2496
7470	0,2212	0,2419	0,2499	0,2317	7470	0,2534	0,2480	0,2432	0,2498
7500	0,2210	0,2417	0,2499	0,2315	7500	0,2534	0,2482	0,2434	0,2498
7530	0,2207	0,2417	0,2498	0,2312	7530	0,2532	0,2481	0,2436	0,2499
7560	0,2203	0,2416	0,2498	0,2309	7560	0,2532	0,2480	0,2438	0,2501
7590	0,2201	0,2415	0,2496	0,2307	7590	0,2528	0,2476	0,2438	0,2500
7620	0,2196	0,2413	0,2494	0,2304	7620	0,2525	0,2476	0,2441	0,2502
7650	0,2194	0,2412	0,2493	0,2301	7650	0,2519	0,2474	0,2442	0,2506
7680	0,2189	0,2410	0,2492	0,2298	7680	0,2518	0,2471	0,2443	0,2506
7710	0,2183	0,2407	0,2489	0,2294	7710	0,2519	0,2473	0,2450	0,2510
7740	0,2177	0,2406	0,2488	0,2293	7740	0,2518	0,2470	0,2456	0,2512
7770	0,2172	0,2404	0,2487	0,2290	7770	0,2518	0,2470	0,2461	0,2513
7800	0,2164	0,2404	0,2486	0,2288	7800	0,2517	0,2469	0,2462	0,2513
7830	0,2159	0,2403	0,2485	0,2286	7830	0,2516	0,2470	0,2464	0,2516
7860	0,2156	0,2401	0,2483	0,2281	7860	0,2514	0,2468	0,2464	0,2513
7890	0,2149	0,2399	0,2481	0,2279	7890	0,2512	0,2468	0,2465	0,2513
7920	0,2145	0,2398	0,2480	0,2278	7920	0,2510	0,2465	0,2465	0,2512
7950	0,2144	0,2397	0,2479	0,2277	7950	0,2509	0,2465	0,2467	0,2511
7980	0,2142	0,2397	0,2478	0,2273	7980	0,2509	0,2463	0,2466	0,2514
8010	0,2141	0,2395	0,2477	0,2270	8010	0,2507	0,2461	0,2468	0,2514
8040	0,2136	0,2395	0,2476	0,2269	8040	0,2507	0,2460	0,2469	0,2517
8070	0,2132	0,2393	0,2475	0,2267	8070	0,2504	0,2460	0,2468	0,2517
8100	0,2129	0,2393	0,2474	0,2264	8100	0,2500	0,2458	0,2469	0,2518
8130	0,2126	0,2391	0,2473	0,2259	8130	0,2498	0,2458	0,2470	0,2519
8160	0,2124	0,2388	0,2471	0,2258	8160	0,2496	0,2459	0,2472	0,2522
8190	0,2123	0,2387	0,2468	0,2255	8190	0,2495	0,2456	0,2472	0,2523
8220	0,2121	0,2385	0,2466	0,2252	8220	0,2492	0,2455	0,2474	0,2524
8250	0,2119	0,2383	0,2465	0,2250	8250	0,2488	0,2454	0,2474	0,2524
8280	0,2117	0,2383	0,2465	0,2249	8280	0,2486	0,2454	0,2476	0,2527
8310	0,2117	0,2382	0,2464	0,2246	8310	0,2485	0,2454	0,2475	0,2529

8340	0,2117	0,2382	0,2464	0,2243	8340	0,2486	0,2455	0,2478	0,2529
8370	0,2116	0,2383	0,2465	0,2244	8370	0,2484	0,2453	0,2478	0,2530
8400	0,2115	0,2384	0,2466	0,2241	8400	0,2483	0,2454	0,2478	0,2529
8430	0,2115	0,2384	0,2466	0,2240	8430	0,2483	0,2453	0,2480	0,2530
8460	0,2115	0,2384	0,2465	0,2240	8460	0,2480	0,2455	0,2481	0,2529
8490	0,2113	0,2385	0,2467	0,2239	8490	0,2478	0,2456	0,2480	0,2529
8520	0,2111	0,2385	0,2466	0,2234	8520	0,2475	0,2455	0,2482	0,2530
8550	0,2111	0,2385	0,2468	0,2234	8550	0,2472	0,2458	0,2482	0,2531
8580	0,2108	0,2385	0,2467	0,2231	8580	0,2471	0,2459	0,2482	0,2530
8610	0,2106	0,2384	0,2466	0,2228	8610	0,2472	0,2459	0,2484	0,2532
8640	0,2105	0,2382	0,2464	0,2225	8640	0,2470	0,2460	0,2483	0,2532
8670	0,2103	0,2381	0,2463	0,2222	8670	0,2469	0,2459	0,2484	0,2533
8700	0,2101	0,2379	0,2461	0,2220	8700	0,2467	0,2462	0,2485	0,2533
8730	0,2099	0,2378	0,2459	0,2216	8730	0,2463	0,2460	0,2486	0,2534
8760	0,2098	0,2376	0,2457	0,2213	8760	0,2461	0,2459	0,2486	0,2532
8790	0,2094	0,2374	0,2455	0,2210	8790	0,2459	0,2458	0,2485	0,2533
8820	0,2091	0,2372	0,2454	0,2206	8820	0,2458	0,2460	0,2487	0,2534
8850	0,2089	0,2370	0,2451	0,2203	8850	0,2455	0,2458	0,2486	0,2535
8880	0,2089	0,2367	0,2448	0,2200	8880	0,2454	0,2460	0,2489	0,2535
8910	0,2087	0,2364	0,2445	0,2200	8910	0,2453	0,2459	0,2489	0,2537
8940	0,2086	0,2362	0,2443	0,2196	8940	0,2451	0,2461	0,2489	0,2536
8970	0,2085	0,2359	0,2441	0,2193	8970	0,2451	0,2461	0,2488	0,2535
9000	0,2084	0,2358	0,2439	0,2193	9000	0,2449	0,2461	0,2486	0,2533
9030	0,2083	0,2356	0,2437	0,2191	9030	0,2446	0,2459	0,2485	0,2533
9060	0,2081	0,2353	0,2434	0,2190	9060	0,2443	0,2457	0,2486	0,2532
9090	0,2081	0,2350	0,2431	0,2186	9090	0,2439	0,2459	0,2486	0,2534
9120	0,2080	0,2348	0,2429	0,2185	9120	0,2441	0,2456	0,2486	0,2531
9150	0,2078	0,2346	0,2426	0,2184	9150	0,2441	0,2457	0,2486	0,2531
9180	0,2076	0,2344	0,2424	0,2183	9180	0,2440	0,2456	0,2485	0,2532
9210	0,2076	0,2341	0,2421	0,2182	9210	0,2440	0,2458	0,2485	0,2532
9240	0,2076	0,2339	0,2420	0,2183	9240	0,2439	0,2457	0,2484	0,2533
9270	0,2072	0,2337	0,2417	0,2180	9270	0,2435	0,2458	0,2483	0,2531
9300	0,2073	0,2334	0,2415	0,2178	9300	0,2431	0,2458	0,2482	0,2529
9330	0,2072	0,2331	0,2412	0,2177	9330	0,2429	0,2455	0,2480	0,2529
9360	0,2069	0,2328	0,2408	0,2176	9360	0,2428	0,2455	0,2478	0,2529
9390	0,2066	0,2324	0,2405	0,2175	9390	0,2429	0,2454	0,2480	0,2526
9420	0,2067	0,2322	0,2403	0,2174	9420	0,2428	0,2453	0,2479	0,2526
9450	0,2066	0,2320	0,2401	0,2175	9450	0,2430	0,2452	0,2479	0,2526
9480	0,2066	0,2318	0,2398	0,2176	9480	0,2433	0,2451	0,2478	0,2527
9510	0,2064	0,2315	0,2396	0,2175	9510	0,2433	0,2452	0,2477	0,2528
9540	0,2063	0,2313	0,2392	0,2173	9540	0,2433	0,2451	0,2476	0,2527

9570	0,2062	0,2309	0,2390	0,2173	9570	0,2433	0,2449	0,2477	0,2523
9600	0,2061	0,2307	0,2388	0,2174	9600	0,2435	0,2448	0,2474	0,2524
9630	0,2059	0,2305	0,2386	0,2171	9630	0,2432	0,2445	0,2474	0,2524
9660	0,2060	0,2304	0,2385	0,2172	9660	0,2434	0,2446	0,2473	0,2526
9690	0,2060	0,2303	0,2384	0,2171	9690	0,2436	0,2443	0,2474	0,2523
9720	0,2059	0,2301	0,2382	0,2171	9720	0,2439	0,2444	0,2472	0,2521
9750	0,2059	0,2299	0,2381	0,2170	9750	0,2438	0,2441	0,2475	0,2524
					9780	0,2438	0,2442	0,2473	0,2523

Cuadro B3. Datos de corriente en el tiempo del ensayo de CCM con agua miel de café con *Shewanella oneidensis* inoculada.

Tiempo (min)	Control (mA)	Réplica 1 (mA)	Réplica 2 (mA)	Réplica 3 (mA)
0	0,0072	0,0048	0,0075	0,0060
30	0,1475	0,1286	0,1598	0,1597
60	0,1662	0,1453	0,1745	0,1759
90	0,1772	0,1566	0,1841	0,1856
120	0,1810	0,1645	0,1895	0,1908
150	0,1877	0,1708	0,1953	0,1963
180	0,1920	0,1759	0,1997	0,2000
210	0,1958	0,1802	0,2035	0,2026
240	0,1987	0,1840	0,2066	0,2049
270	0,2010	0,1868	0,2092	0,2065
300	0,2013	0,1870	0,2094	0,2066
330	0,2037	0,1897	0,2119	0,2081
360	0,2059	0,1919	0,2139	0,2093
390	0,2078	0,1942	0,2157	0,2106
420	0,2092	0,1961	0,2172	0,2118
450	0,2108	0,1979	0,2187	0,2131
480	0,2120	0,1996	0,2198	0,2141
510	0,2133	0,2010	0,2210	0,2154
540	0,2145	0,2027	0,2219	0,2164
570	0,2156	0,2043	0,2228	0,2174
600	0,2164	0,2055	0,2238	0,2183
630	0,2174	0,2066	0,2248	0,2194
660	0,2181	0,2076	0,2254	0,2205
690	0,2189	0,2085	0,2258	0,2217
720	0,2196	0,2088	0,2261	0,2229
750	0,2201	0,2087	0,2267	0,2236
780	0,2206	0,2088	0,2271	0,2245
810	0,2211	0,2093	0,2276	0,2251
840	0,2216	0,2097	0,2282	0,2257
870	0,2220	0,2103	0,2289	0,2263
900	0,2225	0,2113	0,2296	0,2272
902	0,2225	0,2113	0,2297	0,2271
930	0,2228	0,2121	0,2299	0,2279

960	0,2235	0,2131	0,2302	0,2288
990	0,2241	0,2140	0,2305	0,2296
1020	0,2249	0,2150	0,2308	0,2302
1050	0,2260	0,2160	0,2310	0,2308
1080	0,2273	0,2167	0,2314	0,2313
1110	0,2289	0,2176	0,2319	0,2319
1140	0,2312	0,2186	0,2324	0,2324
1170	0,2345	0,2202	0,2331	0,2331
1200	0,2377	0,2222	0,2339	0,2338
1230	0,2413	0,2248	0,2347	0,2347
1260	0,2447	0,2291	0,2359	0,2358
1290	0,2478	0,2346	0,2370	0,2368
1320	0,2510	0,2426	0,2385	0,2386
1350	0,2543	0,2501	0,2400	0,2405
1380	0,2575	0,2593	0,2419	0,2428
1410	0,2608	0,2681	0,2445	0,2459
1440	0,2643	0,2774	0,2478	0,2493
1470	0,2683	0,2825	0,2521	0,2537
1500	0,2723	0,2837	0,2573	0,2590
1530	0,2763	0,2842	0,2627	0,2644
1560	0,2799	0,2846	0,2682	0,2701
1590	0,2809	0,2849	0,2726	0,2747
1620	0,2813	0,2853	0,2754	0,2777
1650	0,2817	0,2855	0,2776	0,2801
1680	0,2815	0,2855	0,2793	0,2818
1710	0,2814	0,2856	0,2809	0,2836
1740	0,2813	0,2854	0,2818	0,2847
1770	0,2813	0,2855	0,2820	0,2849
1800	0,2812	0,2854	0,2821	0,2850
1830	0,2813	0,2855	0,2821	0,2851
1860	0,2812	0,2854	0,2822	0,2850
1890	0,2812	0,2854	0,2821	0,2851
1920	0,2811	0,2854	0,2821	0,2851
1950	0,2810	0,2854	0,2822	0,2851
1980	0,2809	0,2853	0,2822	0,2851
2010	0,2808	0,2852	0,2822	0,2851
2040	0,2806	0,2851	0,2822	0,2851
2070	0,2805	0,2851	0,2822	0,2851
2100	0,2803	0,2851	0,2822	0,2850
2130	0,2802	0,2849	0,2821	0,2849
2160	0,2799	0,2849	0,2820	0,2849

2190	0,2796	0,2848	0,2820	0,2848
2220	0,2795	0,2849	0,2819	0,2848
2250	0,2790	0,2848	0,2819	0,2848
2280	0,2782	0,2848	0,2819	0,2848
2310	0,2781	0,2847	0,2818	0,2846
2340	0,2780	0,2847	0,2818	0,2846
2370	0,2778	0,2846	0,2818	0,2846
2400	0,2778	0,2846	0,2817	0,2845
2430	0,2779	0,2845	0,2817	0,2845
2460	0,2779	0,2845	0,2816	0,2845
2490	0,2778	0,2846	0,2817	0,2844
2520	0,2772	0,2844	0,2817	0,2844
2550	0,2768	0,2845	0,2817	0,2844
2580	0,2765	0,2844	0,2817	0,2845
2610	0,2768	0,2845	0,2816	0,2845
2640	0,2764	0,2844	0,2817	0,2845
2670	0,2765	0,2846	0,2818	0,2846
2700	0,2760	0,2847	0,2819	0,2847
2730	0,2764	0,2849	0,2821	0,2848
2760	0,2760	0,2849	0,2822	0,2848
2790	0,2762	0,2850	0,2821	0,2846
2820	0,2763	0,2850	0,2821	0,2845
2850	0,2760	0,2850	0,2822	0,2846
2880	0,2755	0,2853	0,2825	0,2847
2910	0,2749	0,2855	0,2829	0,2852
2940	0,2729	0,2854	0,2829	0,2854
2970	0,2722	0,2855	0,2830	0,2853
3000	0,2716	0,2856	0,2830	0,2854
3030	0,2720	0,2855	0,2829	0,2853
3060	0,2710	0,2853	0,2827	0,2851
3090	0,2716	0,2852	0,2827	0,2850
3120	0,2714	0,2852	0,2828	0,2850
3150	0,2713	0,2851	0,2825	0,2847
3180	0,2710	0,2850	0,2824	0,2846
3210	0,2708	0,2847	0,2822	0,2844
3240	0,2713	0,2845	0,2820	0,2842
3270	0,2700	0,2844	0,2819	0,2841
3300	0,2707	0,2844	0,2819	0,2839
3330	0,2707	0,2842	0,2817	0,2838
3360	0,2707	0,2842	0,2817	0,2838
3390	0,2701	0,2841	0,2816	0,2837

3420	0,2705	0,2840	0,2815	0,2836
3450	0,2708	0,2840	0,2814	0,2836
3480	0,2701	0,2840	0,2814	0,2835
3510	0,2707	0,2839	0,2813	0,2834
3540	0,2706	0,2838	0,2813	0,2835
3570	0,2707	0,2839	0,2812	0,2834
3600	0,2704	0,2837	0,2811	0,2833
3630	0,2704	0,2837	0,2810	0,2833
3660	0,2706	0,2837	0,2810	0,2833
3690	0,2701	0,2837	0,2810	0,2832
3720	0,2705	0,2836	0,2811	0,2830
3750	0,2710	0,2836	0,2812	0,2827
3780	0,2704	0,2834	0,2812	0,2825
3810	0,2706	0,2833	0,2812	0,2824
3840	0,2703	0,2832	0,2813	0,2823
3870	0,2706	0,2832	0,2814	0,2822
3900	0,2704	0,2832	0,2814	0,2822
3930	0,2707	0,2831	0,2814	0,2822
3960	0,2700	0,2830	0,2813	0,2823
3990	0,2703	0,2829	0,2812	0,2823
4020	0,2700	0,2829	0,2813	0,2823
4050	0,2703	0,2829	0,2814	0,2825
4080	0,2702	0,2829	0,2814	0,2824
4110	0,2702	0,2829	0,2814	0,2824
4140	0,2704	0,2827	0,2814	0,2824
4170	0,2718	0,2830	0,2815	0,2828
4200	0,2717	0,2833	0,2819	0,2829
4230	0,2717	0,2834	0,2818	0,2829
4260	0,2721	0,2832	0,2816	0,2827
4290	0,2718	0,2831	0,2814	0,2826
4320	0,2723	0,2829	0,2812	0,2825
4350	0,2724	0,2829	0,2812	0,2823
4380	0,2721	0,2828	0,2812	0,2822
4410	0,2720	0,2826	0,2811	0,2821
4440	0,2727	0,2825	0,2809	0,2819
4470	0,2720	0,2824	0,2809	0,2819
4500	0,2723	0,2821	0,2806	0,2814
4530	0,2716	0,2820	0,2804	0,2812
4560	0,2712	0,2818	0,2802	0,2811
4590	0,2711	0,2817	0,2800	0,2807
4620	0,2718	0,2816	0,2796	0,2805

4650	0,2712	0,2813	0,2795	0,2802
4680	0,2710	0,2812	0,2793	0,2803
4710	0,2709	0,2812	0,2791	0,2802
4740	0,2703	0,2810	0,2790	0,2802
4770	0,2710	0,2809	0,2788	0,2801
4800	0,2708	0,2809	0,2787	0,2800
4830	0,2710	0,2808	0,2786	0,2800
4860	0,2709	0,2807	0,2785	0,2799
4890	0,2708	0,2806	0,2784	0,2800
4920	0,2706	0,2805	0,2783	0,2799
4950	0,2710	0,2804	0,2783	0,2800
4980	0,2710	0,2805	0,2782	0,2800
5010	0,2710	0,2804	0,2782	0,2800
5040	0,2706	0,2803	0,2781	0,2801
5070	0,2706	0,2803	0,2780	0,2800
5100	0,2708	0,2802	0,2779	0,2800
5140	0,2708	0,2802	0,2778	0,2801
5170	0,2706	0,2801	0,2777	0,2800
5200	0,2704	0,2800	0,2778	0,2801
5230	0,2706	0,2800	0,2779	0,2798
5260	0,2709	0,2799	0,2779	0,2799
5290	0,2701	0,2799	0,2778	0,2799
5320	0,2700	0,2798	0,2777	0,2798
5350	0,2702	0,2799	0,2777	0,2798
5380	0,2701	0,2798	0,2776	0,2798
5410	0,2699	0,2797	0,2776	0,2799
5440	0,2704	0,2799	0,2777	0,2799
5470	0,2704	0,2799	0,2776	0,2799
5500	0,2705	0,2799	0,2776	0,2799
5530	0,2705	0,2798	0,2776	0,2799
5560	0,2707	0,2800	0,2776	0,2800
5590	0,2699	0,2800	0,2777	0,2800
5620	0,2711	0,2800	0,2779	0,2804
5650	0,2708	0,2802	0,2780	0,2805
5680	0,2714	0,2804	0,2782	0,2806
5710	0,2719	0,2805	0,2783	0,2806
5740	0,2718	0,2806	0,2785	0,2808
5770	0,2721	0,2807	0,2785	0,2809
5800	0,2723	0,2808	0,2785	0,2810
5830	0,2728	0,2808	0,2786	0,2811
5860	0,2729	0,2809	0,2786	0,2811

5890	0,2730	0,2808	0,2787	0,2811
5920	0,2729	0,2809	0,2787	0,2812
5950	0,2732	0,2810	0,2787	0,2812
5980	0,2733	0,2809	0,2787	0,2812
6010	0,2734	0,2810	0,2788	0,2811
6040	0,2733	0,2810	0,2788	0,2811
6070	0,2734	0,2810	0,2786	0,2810
6100	0,2733	0,2809	0,2785	0,2810
6130	0,2732	0,2808	0,2784	0,2809
6160	0,2730	0,2808	0,2783	0,2809
6190	0,2732	0,2808	0,2783	0,2809
6220	0,2733	0,2807	0,2781	0,2808
6250	0,2735	0,2807	0,2780	0,2807
6280	0,2732	0,2807	0,2779	0,2807
6310	0,2732	0,2807	0,2777	0,2807
6340	0,2733	0,2806	0,2776	0,2805
6370	0,2734	0,2806	0,2775	0,2804
6400	0,2730	0,2805	0,2774	0,2804
6430	0,2732	0,2804	0,2773	0,2802
6460	0,2732	0,2804	0,2771	0,2800
6490	0,2732	0,2802	0,2770	0,2799
6520	0,2729	0,2802	0,2768	0,2799
6550	0,2729	0,2800	0,2767	0,2798
6580	0,2726	0,2801	0,2766	0,2796
6610	0,2725	0,2801	0,2764	0,2795
6640	0,2728	0,2800	0,2763	0,2794
6670	0,2727	0,2800	0,2761	0,2794
6700	0,2728	0,2799	0,2761	0,2792
6730	0,2727	0,2799	0,2760	0,2792
6760	0,2729	0,2799	0,2758	0,2790
6790	0,2721	0,2798	0,2758	0,2789
6820	0,2724	0,2798	0,2757	0,2789
6850	0,2726	0,2796	0,2756	0,2788
6880	0,2723	0,2797	0,2756	0,2788
6910	0,2724	0,2798	0,2756	0,2787
6940	0,2726	0,2798	0,2757	0,2786
6970	0,2725	0,2799	0,2756	0,2786
7000	0,2724	0,2799	0,2757	0,2788
7030	0,2726	0,2801	0,2758	0,2788
7060	0,2727	0,2802	0,2758	0,2789
7090	0,2729	0,2803	0,2759	0,2789

7120	0,2730	0,2804	0,2759	0,2790
7150	0,2733	0,2805	0,2762	0,2791
7180	0,2735	0,2807	0,2763	0,2792
7210	0,2737	0,2808	0,2763	0,2794
7240	0,2736	0,2808	0,2764	0,2793
7270	0,2737	0,2808	0,2764	0,2794
7300	0,2736	0,2809	0,2765	0,2794
7330	0,2738	0,2810	0,2765	0,2794
7360	0,2738	0,2810	0,2765	0,2794
7390	0,2737	0,2811	0,2765	0,2795
7420	0,2739	0,2811	0,2766	0,2794
7450	0,2740	0,2810	0,2765	0,2794
7480	0,2739	0,2811	0,2765	0,2795
7510	0,2740	0,2812	0,2766	0,2794
7540	0,2737	0,2811	0,2766	0,2793
7570	0,2737	0,2810	0,2764	0,2794
7600	0,2738	0,2810	0,2763	0,2793
7630	0,2737	0,2810	0,2763	0,2792
7660	0,2736	0,2810	0,2764	0,2791
7690	0,2736	0,2809	0,2763	0,2791
7720	0,2734	0,2809	0,2762	0,2790
7750	0,2734	0,2808	0,2762	0,2789
7780	0,2733	0,2808	0,2761	0,2789
7810	0,2734	0,2809	0,2762	0,2788
7840	0,2734	0,2808	0,2762	0,2788
7870	0,2733	0,2808	0,2762	0,2788
7900	0,2731	0,2807	0,2761	0,2787
7930	0,2729	0,2807	0,2762	0,2788
7960	0,2729	0,2807	0,2760	0,2787
7990	0,2730	0,2806	0,2760	0,2786
8020	0,2730	0,2806	0,2760	0,2786
8050	0,2729	0,2806	0,2760	0,2785
8080	0,2728	0,2806	0,2759	0,2785
8110	0,2726	0,2806	0,2760	0,2784
8140	0,2727	0,2806	0,2759	0,2784
8170	0,2726	0,2805	0,2759	0,2783
8200	0,2726	0,2806	0,2760	0,2784
8230	0,2725	0,2806	0,2759	0,2783
8260	0,2725	0,2805	0,2758	0,2781
8290	0,2725	0,2804	0,2759	0,2781
8320	0,2726	0,2805	0,2758	0,2781

8350	0,2725	0,2806	0,2759	0,2781
8380	0,2726	0,2807	0,2759	0,2781
8410	0,2728	0,2807	0,2761	0,2783
8840	0,2727	0,2808	0,2762	0,2784
8870	0,2731	0,2809	0,2763	0,2785
8900	0,2732	0,2811	0,2764	0,2785
8930	0,2733	0,2811	0,2764	0,2787
8360	0,2734	0,2814	0,2767	0,2788
8390	0,2737	0,2815	0,2768	0,2789
8420	0,2737	0,2817	0,2770	0,2791
8450	0,2740	0,2818	0,2772	0,2793
8480	0,2741	0,2819	0,2773	0,2794
8510	0,2740	0,2819	0,2773	0,2792
8540	0,2740	0,2820	0,2773	0,2794
8570	0,2741	0,2820	0,2773	0,2793
8600	0,2739	0,2820	0,2773	0,2793
8630	0,2738	0,2818	0,2771	0,2792
8660	0,2735	0,2816	0,2769	0,2788
8690	0,2732	0,2814	0,2765	0,2784
8720	0,2731	0,2813	0,2766	0,2785
8750	0,2731	0,2812	0,2766	0,2786
8780	0,2729	0,2810	0,2764	0,2785
8810	0,2729	0,2810	0,2765	0,2785
8840	0,2727	0,2809	0,2763	0,2784
8870	0,2726	0,2808	0,2763	0,2783
8900	0,2727	0,2807	0,2763	0,2784
8930	0,2725	0,2807	0,2764	0,2784
8960	0,2726	0,2807	0,2762	0,2783
8990	0,2725	0,2806	0,2762	0,2782
9020	0,2724	0,2806	0,2763	0,2782
9050	0,2726	0,2806	0,2762	0,2782
9080	0,2725	0,2806	0,2762	0,2783
9110	0,2724	0,2806	0,2761	0,2783
9140	0,2724	0,2805	0,2761	0,2782
9170	0,2724	0,2805	0,2761	0,2781
9200	0,2722	0,2804	0,2760	0,2781
9230	0,2722	0,2802	0,2760	0,2781
9260	0,2721	0,2802	0,2760	0,2780
9290	0,2721	0,2802	0,2759	0,2779
9320	0,2721	0,2800	0,2759	0,2780
9350	0,2721	0,2801	0,2759	0,2780

9380	0,2720	0,2800	0,2758	0,2779
9410	0,2719	0,2798	0,2758	0,2779
9440	0,2718	0,2798	0,2757	0,2778
9470	0,2717	0,2797	0,2756	0,2777
9500	0,2717	0,2796	0,2755	0,2777
9530	0,2718	0,2795	0,2756	0,2778
9560	0,2718	0,2795	0,2756	0,2777
9590	0,2717	0,2794	0,2757	0,2778
9620	0,2719	0,2794	0,2757	0,2778
9622	0,2720	0,2794	0,2758	0,2779
9624	0,2719	0,2795	0,2757	0,2779
9626	0,2719	0,2794	0,2757	0,2779

Apéndice A2. Resultados de Análisis de Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Análisis realizado según metodología descrita en la sección... del documento. Para el agua miel sin diluir el factor de dilución es 50/0,5; ya que se tomó una alícuota de 0,500 mL del agua miel de café y se diluyó a 50,00 mL con agua destilada. En el caso de las muestras de las corridas diluidas, para la muestra antes del tratamiento se usó 500 µL y se llevó a 2000 µL (factor de dilución de 20/5); en el caso del agua miel luego del ensayo se usó 1000 µL de estas y se llevó a volumen de 2000 µL (factor de dilución 2).

Cuadro B4. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-1-b (*E. asburiae*).

Muestra	Lectura DQO equipo (mg/L)			DQO (Factor dilución) (mg/L)			Promedio (mg/L)
	L1	L2	L3	DQO 1	DQO 2	DQO 3	
Antes Corrida	504	500	496	50400	50000	49600	51250
Antes Corrida	527	523	525	52700	52300	52500	
I celda Réplica 1 I E y II E	317	315	314	31700	31500	31400	32733
I celda Réplica 1 I E y II E	339	340	339	33900	34000	33900	
II celda Réplica 2 III E	324	323	323	32367	32333	32333	31272
II celda Réplica 2 III E	318	294	294	31800	29400	29400	
III celda Control	320	325	322	32000	32500	32200	37583
III celda Control	430	429	429	43000	42900	42900	

Cuadro B5. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-C1-A (*L. harbinensis*).

Muestra	Lectura DQO equipo (mg/L)			DQO (factor dilución) (mg/L)			Promedio (mg/L)
	L1	L2	L3	DQO 1	DQO 2	DQO 3	
Antes Corrida	658	657	655	65800	65700	65500	72883
Antes Corrida	804	799	800	80400	79900	80000	
I celda Réplica 1 I E y II E	333	333	333	33300	33300	33300	32467
I celda Réplica 1 I E y II E	319	314	316	31900	31400	31600	
II celda Réplica 2 III E	480	480	480	48000	48000	48000	50883
II celda Réplica 2 III E	537	538	538	53700	53800	53800	
II celda Control	329	327	330	32900	32700	33000	33083
II celda Control	333	333	333	33300	33300	33300	

Cuadro B6. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Shewanella oneidensis*.

Muestra	Lectura DQO equipo (mg/L)			DQO (factor dilución) (mg/L)			Promedio (mg/L)
	L1	L2	L3	DQO 1	DQO 2	DQO 3	
Antes Corrida	463	458	453	46300	45800	45300	46517
Antes Corrida	476	473	468	47600	47300	46800	
I celda Réplica 1 I E y II E	343	341	335	34300	34100	33500	38095
I celda Réplica 1 I E y II E	331	327	323	33100	32700	32300	
II celda Réplica 2 III E	375	373	371	37500	37300	37100	42857
II celda Réplica 2 III E	379	375	377	37900	37500	37700	
I celda Control	367	367	364	36700	36700	36400	41181
I celda Control	355	356	353	35500	35600	35300	

Cuadro B7. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (*E. asburiae*)

Muestra	Lectura DQO equipo (mg/L)			DQO (factor dilución) (mg/L)			Promedio (mg/L)
	L1	L2	L3	DQO 1	DQO 2	DQO 3	
Antes Corrida	1124	1126	1124	4496	4504	4496	4440
Antes Corrida	1094	1096	1096	4376	4384	4384	
I celda Réplica 1 I E y II E	1373	1373	1374	2746	2746	2748	2634
I celda Réplica 1 I E y II E	1261	1262	1260	2522	2524	2520	
III celda Réplica 2 III E	1329	1332	1336	2658	2664	2672	2719
III celda Réplica 2 III E	1387	1382	1390	2774	2764	2780	
II celda Control	1494	1503	1500	2988	3006	3000	2979
II celda Control	1479	1479	1483	2958	2958	2966	

Cuadro B8. Resultados de DQO obtenidos para ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con I-C1-A (*L. harbinensis*).

Muestra	Lectura DQO equipo (mg/L)			DQO (factor dilución) (mg/L)			Promedio (mg/L)
	L1	L2	L3	DQO 1	DQO 2	DQO 3	
Antes Corrida	942	941	942	3768	3764	3768	3694
Antes Corrida	905	905	906	3620	3620	3624	
III celda Réplica 1 I E y II E	1329	1332	1336	2658	2664	2672	2719
III celda Réplica 1 I E y II E	1387	1382	1390	2774	2764	2780	
I celda Réplica 2 III E	1373	1373	1374	2746	2746	2748	2634
I celda Réplica 2 III E	1261	1262	1260	2522	2524	2520	
II celda Control	1379	1381	1380	2758	2762	2760	2678
II celda Control	1279	1306	1309	2558	2612	2618	

Apéndice A3. Cálculo de eficiencia culombica y biológica de las CCM con agua miel de café.

Determinación de área debajo de la curva de los ensayos de las CCM con el agua miel de café.

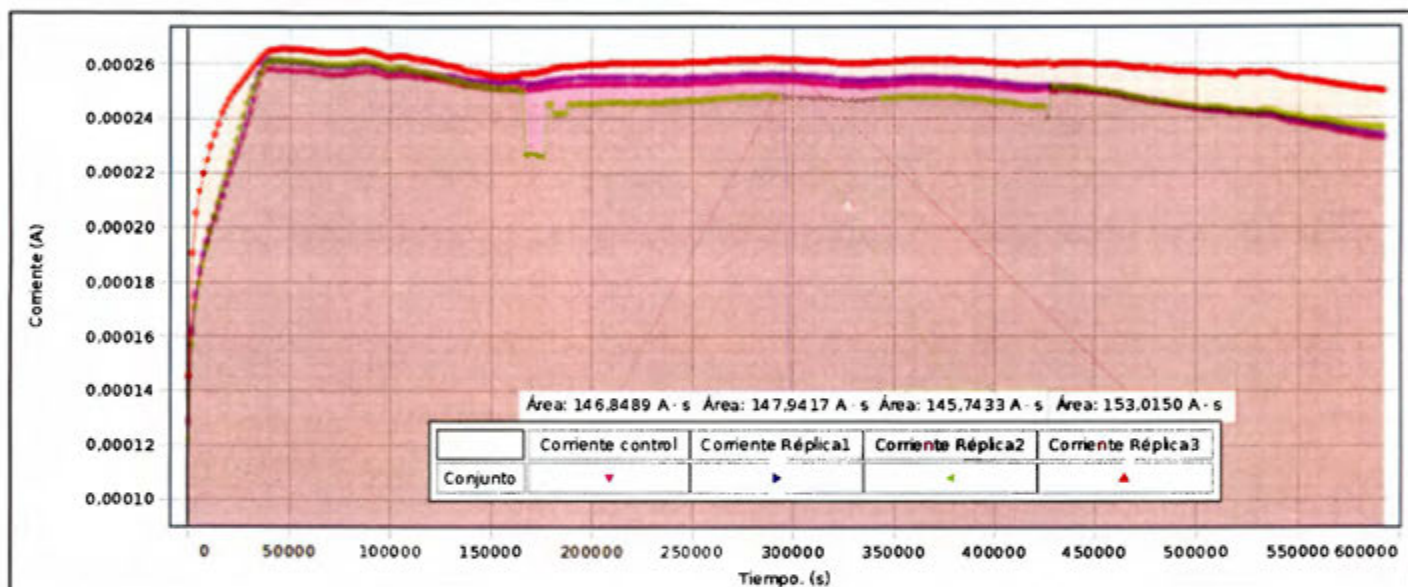


Figura A1. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con II-1-b (*E. asburiae*).

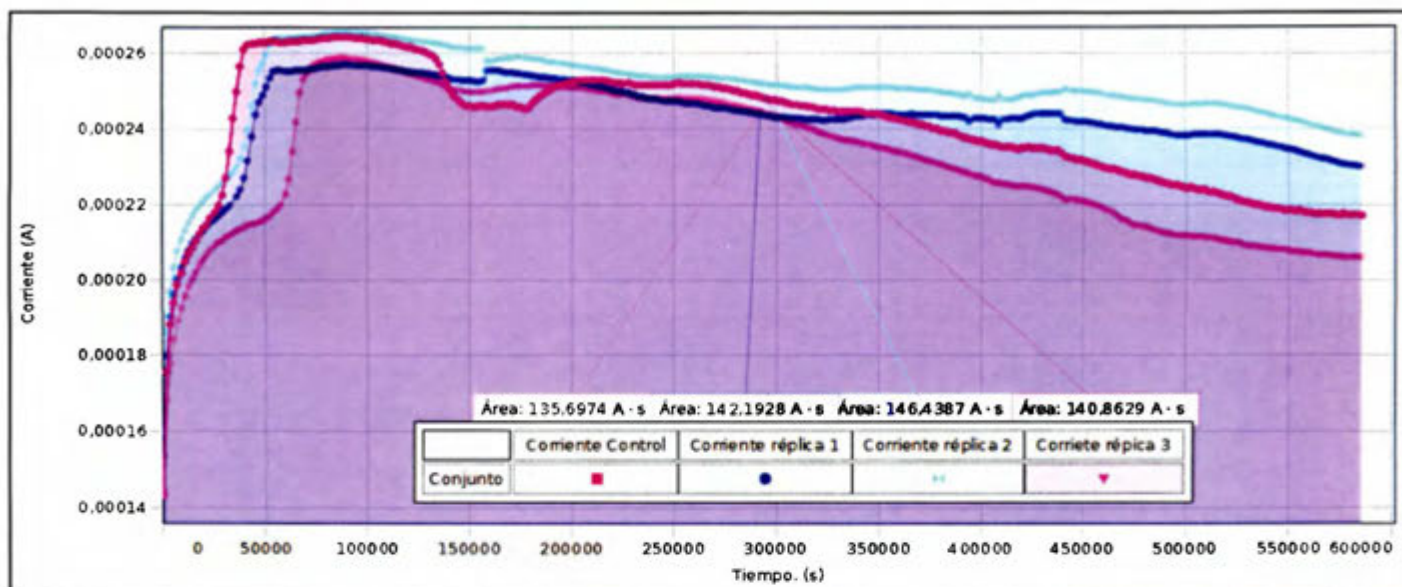


Figura A2. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con *Il-C₁-A (L. harbinensis)*.

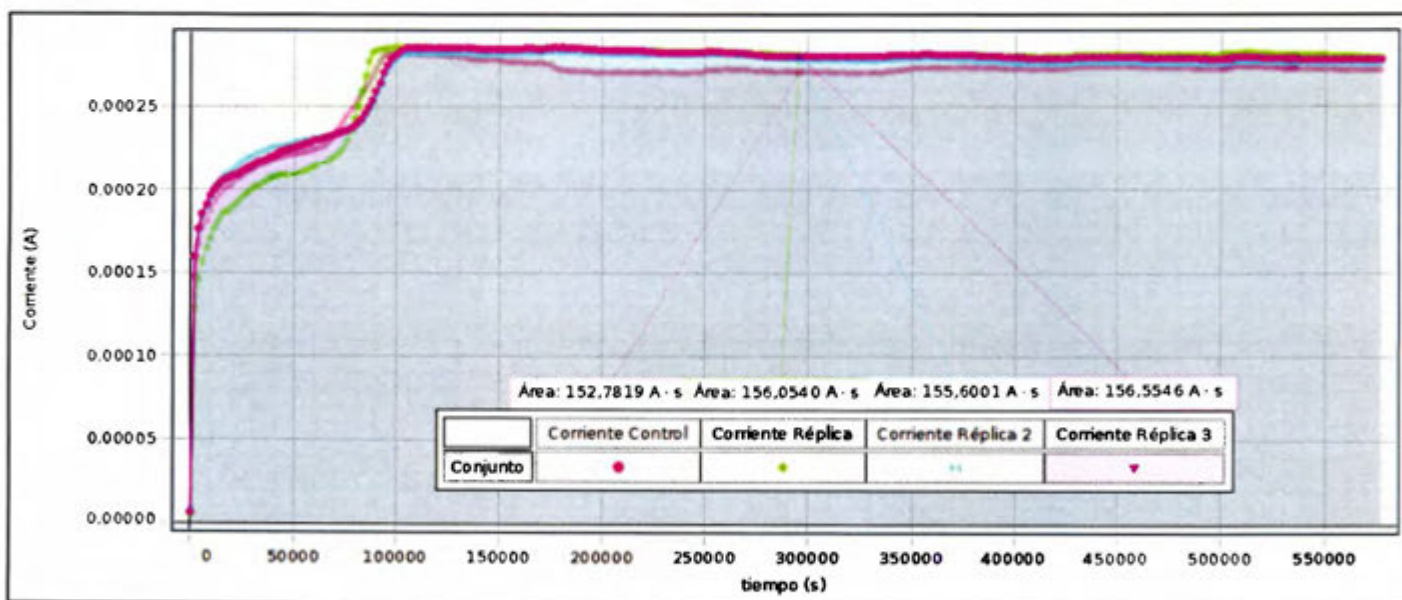


Figura A3. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel sin diluir inoculada con *Shewanella oneidensis*.

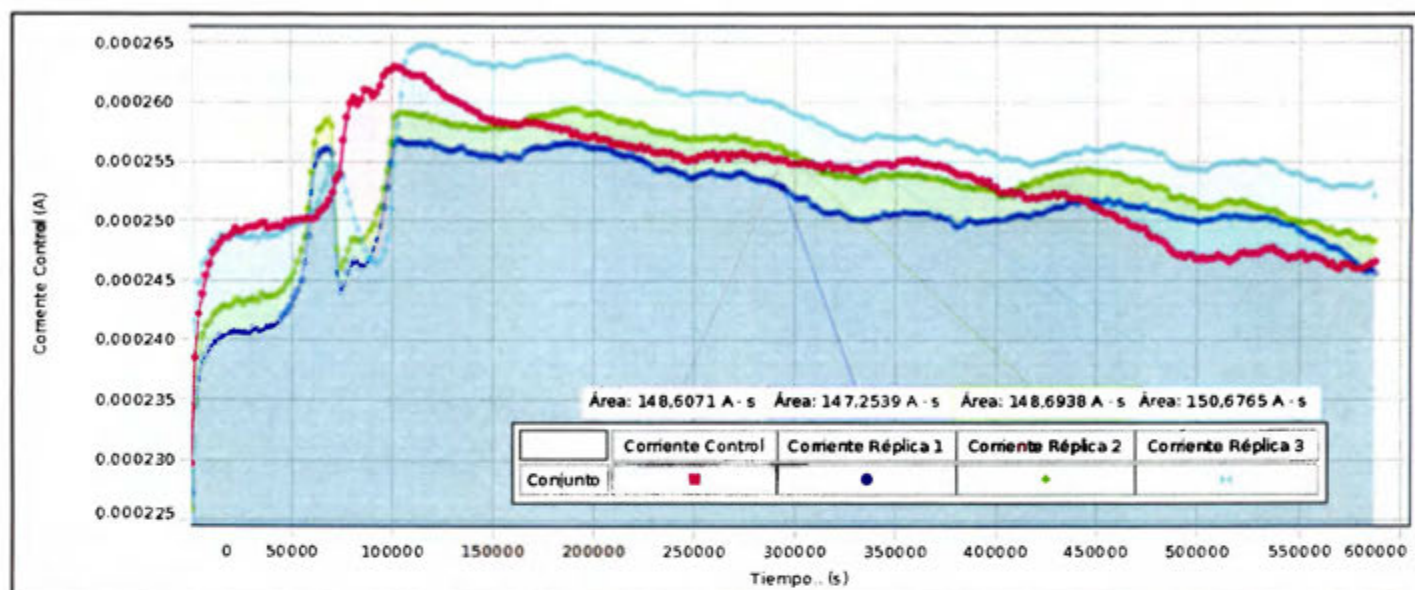


Figura A4. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel diluida inoculada con II-1-b (*E. asburiae*).

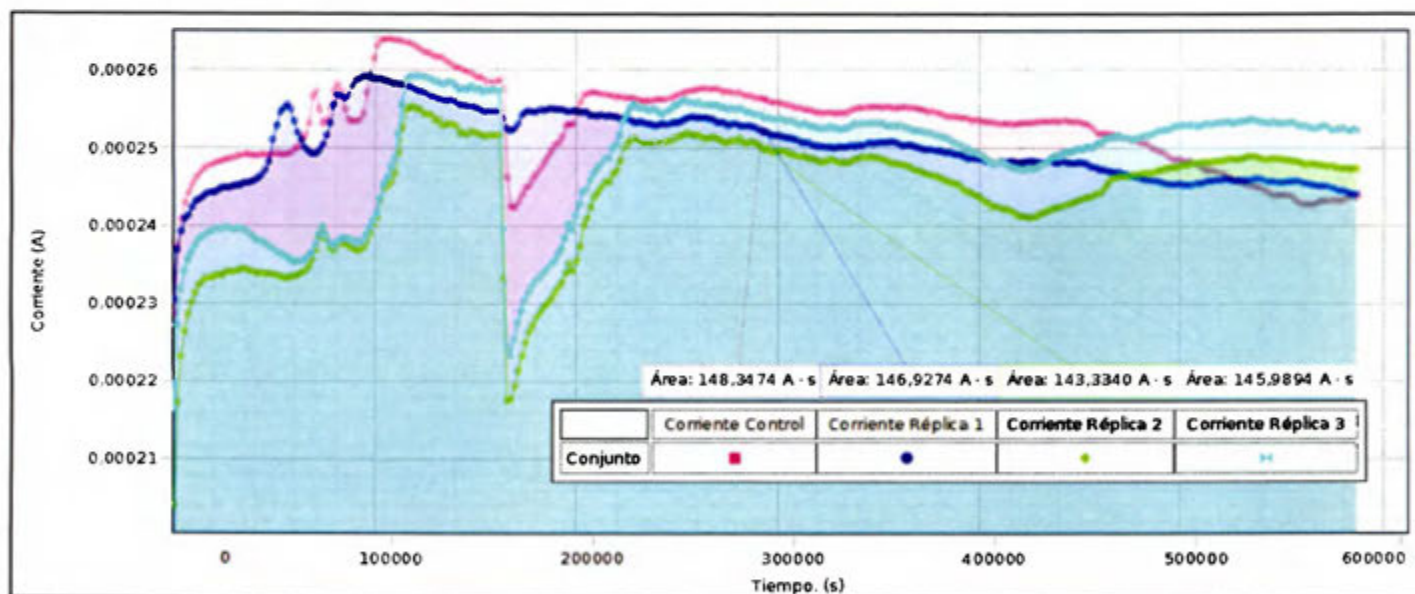


Figura A5. Cálculo de área debajo de la curva para los electrodos de la CCM con agua miel diluida inoculada con II-C₁-A (*L. harbinensis*)

Cálculo de la eficiencia culombica y biológica de las CCM con agua miel de café.

$$\% \epsilon_{cb} = \frac{C_p}{C_{th}} * 100$$

$$\epsilon_{cb} = \frac{M * \int_0^{t_b} I dt}{F * b * V_{An} * \Delta DQO}$$

$$\epsilon_{cb} = \frac{\left(32 \frac{g}{mol C}\right) * 146,849 (A * s)}{\left(96485 A * \frac{s}{mole^-}\right) * \left(4 \frac{mole^-}{mol C}\right) * (0,400L) * (19,667 \frac{g}{L})} * 100 = 0,155 \%$$

Figura A6. Muestra de calculo realizado para la determinar la eficiencia culombica, utilizando el control de la CCM con agua miel de café inoculada con II-1-b (*E. asburiae*).

Cuadro B9. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-1-b (*E. asburiae*), el DQO antes del tratamiento fue 52,25 g/L.

Muestra	DQO (g/L)	Δ DQO (g/L)	%remoción	Área curva (A*s)	% eficiencia culombica
Control	32,583	19,667	38	146.849	0.155
Réplica 1	32,733	19,517	37	146.843	0.156
Réplica 2	31,272	20,978	40	153.015	0.151

Cuadro B10. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con II-C1-A (*L.harbinensis*), el DQO antes del tratamiento fue 72,88 g/L.

Muestra	DQO (g/L)	Δ DQO (g/L)	%remoción	Área curva (A*s)	% eficiencia culombica
Control	34,833	38,500	53	135,697	0,073
Réplica 1	32,467	40,416	55	144,316	0,074
Réplica 2	50,883	22,000	30	140,863	0,133

Cuadro B11. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café sin diluir inoculada con *Shewanella oneidensis*, el DQO antes del tratamiento fue 46,517 g/L.

Muestra	DQO (g/L)	Δ DQO (g/L)	%remoción	Área curva (A*s)	% eficiencia culombica
Control	41,181	5,336	11	152,782	0,594
Réplica 1	42,857	3,660	8	156,054	0,884
Réplica 2	38,095	8,422	18	156,077	0,384

Cuadro B12. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (*E. asburiae*), el DQO antes del tratamiento fue 4,44 g/L.

Muestra	DQO (g/L)	Δ DQO (g/L)	%remoción	Área curva (A*s)	% eficiencia culombica
Control	2,929	1,511	34	148,607	2,039
Réplica 1	2,588	1,852	42	147,974	1,656
Réplica 2	3,214	1,226	28	150,677	2,548

Cuadro B13. Determinación de eficiencia culombica en ensayo de CCM con agua miel de café diluida inoculada con II-1-b (*E. asburiae*), el DQO antes del tratamiento fue 3,69 g/L.

Muestra	DQO (g/L)	Δ DQO (g/L)	%Remoción	Área curva (A*s)	% eficiencia culombica
Control	2,678	1,016	28	148,347	3,027
Réplica 1	2,634	1,060	29	146,927	2,873
Réplica 2	2,719	0,975	26	144,662	3,076

Apéndice B. Resultados de Secuenciación de bacterias.

Cuadro B14. Secuencias consenso de las bacterias extraídas de los electrodos del ánodo de las CCM en agua miel de café como sustrato.

Nombre aislamiento	Secuencia consenso
1A ₂ -P	<p>TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGG CTGAAAGTTGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC GGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGC GTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGG AAATTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAA ACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATT AAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATCTTTTATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAA TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCG AGGTCAAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCT ACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA</p>
2A ₂ -B	<p>ATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGG GCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT GGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCG GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC CGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGG CGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT TTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGG GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTG AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT</p>

	<p>TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAA ATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAA GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGC GAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCC TACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA</p>
I-C ₁	<p>ATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTG GCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCG GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTT CGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGCCGG CGTGACGGTATCCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGG AAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAA ACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAAGTCCGCGAGCTAACGCATT AAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAA TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAA ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCG AGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCT ACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT</p>
II-C ₁ - A	<p>GGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACCACGGAGACCGCATGGT CTCCGGGTAAAAGATGGCGCAAGCTATCACTGAAGGATGGACCCGCGGCGTATTAG CCAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAAGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGG TAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTA GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA GGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTATTGAAGAAGAACGTGTGTGACAGTAACTGGT CATGCAGTGACGGTATTCAATCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGG CGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGGGCATCGGAAA CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGA CGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAATACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAAGTGTGACGCTAA</p>

	<p>CGCATTAAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAG AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAGGCTGAGAGATCAGCTGTTCCCTTCGGG GACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT CTGGTCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAACGAGCAGCGA GACCGGAGGTCAAGCGAATCTCTAAAACCATCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA ACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC</p>
II-C ₁ - B	<p>GGAAGTGACCCGATAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATA GATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGAT GGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATAC GTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAA CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTTATTTTTCTGTTTTTGGAGAAGAA TGGTGCGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACAGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCTGTTTTTCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTA ACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAA CTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGGTAGCGAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATG</p>
II-C ₁ - C	<p>TAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGG CTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC GGGTGCTAAAACCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGC GTGACGGTATCCAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGG AGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA GGCTCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAA ACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT AAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAGGCTGAGAGATCAGCTGTTCCCTTCGGGGACAGA ATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCCTTATGATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTCA GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAACGAGCAGCGAGACCGC</p>

	GAGGTCAAGCGAATCTCTAAAAACCATCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC CTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
I-C ₂	CGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG GCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGTGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTG ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTgG AGAAGaaTGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAaCCagAATGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC GGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA GTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGC GAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAG GGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG ACCGCAAGGTTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCAC CTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATGACT AGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA TTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA TCG
II-C ₂ -C	GAGCGTCTATCAGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGA TTCAAAGGAGCGGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGAAGTGACCCTTAAGTG GGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTT CTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCT AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTG ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG CTTTCGGGTCGTAAAATTCTTTTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTG TCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG CGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAA CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGAC GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG
II-1-b	GAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGC CTCTTGCCACCCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTATGTAGGTGGGGTAACGGCTC ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTT TCAGCGGGGAGGAAGGCGTTTTAGGTTTATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAG AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG

TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCCGGTCTGTCAAGTCGGATGT
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTG
TAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
ATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCTCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGAC
TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAGTCGACCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA
TCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGA
TAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG
ACCTCATAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGTGGACCCCTCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG