

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Predicción metagenómica de rutas metabólicas en
microorganismos electrogénicos de celdas de combustible
microbiano**

Alex Marcelo Lalama Paredes

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Predicción metagenómica de rutas metabólicas en microorganismos
electrogénicos de celdas de combustible microbiano**

Alex Marcelo Lalama Paredes

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata, PhD

Quito, 21 de diciembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Alex Marcelo Lalama Paredes

Código: 00135874

Cédula de identidad: 1726673989

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al., (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al., (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Una celda de combustible microbiano (MFC) es una tecnología que utiliza la electrocatálisis producida por microorganismos en un espacio mono o bicameral. La identificación de rutas metabólicas de los microorganismos electrogénicos presentes en las MFCs es crucial para entender las interacciones dentro de la comunidad microbiana. En este estudio, se utilizó Picrust2 para realizar una predicción metagenómica a partir de secuencias del gen 16s rRNA de tres MFCs. Las MFCs presentaron una producción constante de electricidad (300 mV), y fueron ensambladas a partir de sedimentos de lagunas talásicas del archipiélago de Galápagos. Se estudió la contribución de los taxones microbianos a la abundancia de función de cada MFC y fueron identificados a nivel de familia o género. Los resultados obtenidos en este estudio muestran rutas catabólicas de interés como: nitrato reducción I, degradación de sulfolactato, y metanogénesis. Estas fueron las principales rutas involucradas en el reciclaje de nutrientes dentro de la MFC, en más de una muestra. Por otro lado, se encontró una diversidad de rutas relacionadas con la degradación de tolueno, mediante diferentes vías como catechol, p-cresol, 4-metilcatechol y o-cresol, lo que indica la presencia de consorcios microbianos capaces de degradar contaminantes y con uso potencial en el tratamiento de aguas residuales.

Palabras clave: celdas de combustible microbiano, transferencia extracelular de electrones, predicción metagenómica, picurst2, rutas metabólicas, simbiosis.

ABSTRACT

A microbial fuel cell (MFC) is a technology that uses the electrocatalysis produced by microorganisms in a single or dual chamber space. The identification of metabolic pathways of the electrogenic microorganisms present in the MFCs is crucial for understanding the interactions within the microbial community. In this study, Picrust 2 was used for carrying a metagenomic prediction analysis using sequences of the 16s rRNA gene from three MFCs. The MFCs presented a constant current (300mV) production, and they were assembled using thalassic lagoon sediment from the Galapagos archipelago. We studied the contribution to the abundance of function of the microbial taxa of each MFC and identified them at family or genus level. The results obtained in this study show catabolic pathways of interest, such as nitrate reduction I, sulfolactate degradation and methanogenesis. These were the main pathways involved in the recycling of nutrients inside the MFC, in more than one sample. On the other hand, we found a diversity of pathways for toluene degradation like catechol, p-cresol, 4-methylcatechol and o-cresol, which indicates the presence of microbial consortia with capable of contaminant degradation and with potential use in the treatment of wastewater.

Key words: microbial fuel cells, extracellular electron transfer, metagenomic prediction, picurst2, metabolic pathways, syntrophy.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Celdas de combustible microbiano	10
1.2. Microorganismos con transferencia extracelular de electrones	10
1.3. Predicción metagenómica utilizando 16s rRNA	11
2. MÉTODOS.....	13
2.1. Celdas de combustible microbiano	13
2.2. Predicción metagenómica utilizando Piphilin.....	13
2.3. Predicción metagenómica utilizando Picrust2	14
2.4. Análisis de abundancia de función.....	15
2.5. Análisis de abundancia de función por taxón.....	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Punta Pitt	17
3.2. Cerro Brujo.....	20
3.3. Punta Pitt (PP) cultivada	22
4. DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIONES.....	28
6. TABLAS.....	29
7. FIGURAS	37
8. REFERENCIAS	38
9. ANEXOS.....	41
ANEXO A: Esquema de las partes de una biocelda monocameral.....	41
ANEXO B: Esquema de las partes de una biocelda bicameral.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Detalle de rutas metabólicas para los 7 clústeres del Heatmap de la Figura 1	29
Tabla 2: Detalle de rutas metabólicas predichas con mayor abundancia en Punta Pitt y relacionadas a EET, con los diferentes taxones que presentan mayor abundancia para estas rutas.....	30
Tabla 3: Detalle de rutas metabólicas predichas con mayor abundancia en Cerro Brujo y relacionadas a EET, con los diferentes taxones que presentan mayor abundancia para estas rutas.....	33
Tabla 4: Detalle de rutas metabólicas predichas con mayor abundancia en la muestra cultivada PP y relacionadas a EET, con los diferentes taxones que presentan mayor abundancia para estas rutas	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Heatmap de abundancia de las rutas metabólicas predichas por Picrust2.....37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Celdas de combustible microbiano

Las energías del futuro han tenido diferentes enfoques en su búsqueda en las últimas décadas, si bien la atención de estas se ha centrado en energía solar y eólica, una de estas prometedoras fuentes de energía se encuentra en las celdas de combustible microbianas, que particularmente en los últimos 10 años ha tenido un gran número de avances en su desarrollo, puesto a que es un candidato igual de eficiente que los otros tipos de energía mencionados (Angelaalincy *et al.*, 2018).

Las celdas de combustible microbiano o bioceldas, es una tecnología que se basa en electrocatálisis biótica, donde suceden reacciones electroquímicas en las que los electrones se intercambian entre transportadores de electrones y electrodos extracelulares, ciertos microorganismos oxidan a donadores de electrones y transfieren estos electrones a un ánodo que genera corriente eléctrica en el proceso (Liu *et al.*, 2018).

Existen dos tipos: de una sola cámara y de dos. Las monocamerales, contienen tanto el cátodo como el ánodo en el mismo espacio, con un compartimento aeróbico en la parte superior de la biocelda que funciona como cátodo, y dos capas de sedimento que contienen los consorcios microbianos y están separadas por el ánodo, que suele ser una malla de carbono (Javed *et al.*, 2018). Por otro lado, las bioceldas bicamerales, utilizan una membrana de intercambio iónico, que separa el ánodo del cátodo (Javed *et al.*, 2018).

1.2. Microorganismos con transferencia extracelular de electrones

Los principales actores en esta producción energética, son los llamados microorganismos con transferencia extracelular de electrones, o EET por sus siglas en inglés, estos se encuentran en biofilms y logran esto mediante distintos mecanismos, como uso de proteínas activo-reductoras, pilis conductivos, o mediante metabolitos secundarios (Logan *et al.*, 2019).

El mecanismo de proteínas activo-reductoras corresponde a transferencia de electrones utilizando citocromos, quinonas y proteínas sulfuro-férricas que se encuentran en las membranas microbianas, por esto el mecanismo se llama transferencia de electrones de corto rango, y la presencia de este se asocia a biofilms (Logan *et al.*, 2019). Por otro lado, el mecanismo que utiliza pilis conductivos se llama transferencia de electrones de largo rango, y representa un mecanismo menos frecuente, pero que mantiene la mayor producción de energía asociada a este organelo (Logan *et al.*, 2019). En cuanto al uso de metabolitos secundarios como mecanismos EET, este se asocia a transportadores que facilitan el transporte de electrones sin necesidad de citocromos o pilis conductivos, estos transportadores promueven reacciones redox y pueden estar conformadas por diferentes proteínas (Logan *et al.*, 2019).

Los nichos de estos microorganismos con capacidad EET son variados, sin embargo, los sedimentos de lagunas volcánicas son ideales, debido a las condiciones de temperatura, salinidad y ambiente anaeróbico (Santoro *et al.*, 2017).

1.3.Predicción metagenómica utilizando 16s rRNA

El estudio de la comunidad microbiana y su actividad metabólica en las bioceldas es de relevancia, y hoy en día, es posible utilizar herramientas de predicción metagenómica para reconstruir mediante referencias de bases de datos de los genomas completos, las rutas metabólicas envueltas y la cantidad de abundancia de estas en la comunidad microbiana a partir de secuencias 16S rRNA (Zhang *et al.*, 2014).

Entre las herramientas de predicción con mayor exactitud para muestras ambientales se encuentran Piphilin y Picrust2, ambas utilizan como entrada las secuencias de los ASVs junto con la abundancia de estas en diferentes muestras, para mediante el uso de bases de datos de

referencias como KEGG y MetaCyc, crear una predicción en base a estados no observados, como es las rutas metabólicas presentes (Douglas *et al.*, 2020).

El objetivo de este estudio fue realizar una predicción metagenómica a partir de secuencias 16S rRNA, de 3 bioceldas con producción constante de electricidad, para conocer las rutas metabólicas con mayor abundancia y los taxones que más contribuyen a estas, y así intentar entender los mecanismos catabólicos de sintrofía que suceden en las bioceldas.

2. MÉTODOS

2.1. Celdas de combustible microbiano

Se trabajó con las secuencias 16s rRNA provenientes de dos celdas monocamerales con sedimentos de lagunas talásicas en el archipiélago de Galápagos (Cerro Brujo y Punta Pitt), y una celda bicameral (Punta Pitt) cultivada en medio BG11. Las tres han producido entre 300 y 600mV durante 1 año. El secuenciamiento fue realizado por Macrogen en Corea del Sur mediante Illumina, y al momento que se recibió para el presente trabajo las muestras, estas ya tenían remoción de primers, reducción de ruido, alineamiento, y control de calidad, de manera que las secuencias estaban listas para usarse en análisis de predicción metagenómica.

2.2. Predicción metagenómica utilizando Piphilin

La primera herramienta en probarse para la predicción metagenómica fue Piphilin de Second Genome, principalmente por su alta precisión hallada en la literatura, además de recomendarse si se utilizó Illumina como método de secuenciamiento.

De esa manera, se subieron tanto las secuencias en formato fasta, como la tabla de abundancia en formato CSV, a la propia página web del servidor de Piphilin “<http://piphillin.secondgenome.com/>”, utilizando el 99% de identidad y buscando referencias de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Al cabo de unas semanas, se tuvo respuesta de no existir genomas de referencia para el porcentaje de identidad utilizado, siendo la posible solución bajar el porcentaje de identidad junto con agregar búsqueda en la base de datos BioCyc, de forma que se realizó nuevamente la carga de los archivos al servidor de Piphilin bajando el porcentaje de identidad a 98%, y añadiendo BioCyc como base de datos de referencia junto con KEGG. Nuevamente, se recibió respuesta de no existir coincidencia con ese porcentaje de identidad, por lo que se optó por no bajar

más el porcentaje de identidad, puesto a que se comprometería la precisión de la predicción, y se procedió a trabajar utilizando otra herramienta de predicción metagenómica.

2.3. Predicción metagenómica utilizando Picrust2

En base a lo experimentado mediante Piphilin, se procedió a utilizar la herramienta Picrust2 (Phylogenetic Investigation of communities by reconstrucing unobserved states), la cual resultaba ser más nueva y mostraba mejor respuesta para muestras ambientales de acuerdo a la literatura consultada.

De esa forma, se procedió a instalar el paquete de esta herramienta, puesto a que no trabaja subiendo la información a un servidor directamente como Piphilin, para hacer uso de esta, que a su vez utiliza distintos paquetes como HMMER, EPA-ng, y GAPPa para antes de realizar la predicción metagenómica, basarse en posicionamiento filogenético de los taxones (Douglas *et al.*, 2020). Desde la terminal se activó Picrust2 y se inició con el pipeline de trabajo de este, usando primeramente el archivo fasta de las secuencias para tener el árbol filogenético de referencia, utilizando la función `place_seqs.py -s`. Seguidamente, se utilizó este árbol de referencia y se realizó la predicción de número EC con la función `hsp.py -i EC -t`, los números EC (Enzyme commission) corresponden a una clasificación enzimática que se emplea en el pipeline para la predicción de rutas usando MetaCyc. Puesto a que puede haber un número variable de copias de genes 16s rRNA por ASV, es importante que estos se contabilicen por cada ASV, además de que es importante saber que tan cerca está el ASV original del de referencia, por lo que NSTI es un índice que existe para esto, de forma que se utilizó la función `hsp.py -i 16s -t` junto con `calculate.NSTI`, para tener esta predicción y el índice mencionado, los cuales fueron los archivos finales para ya realizar la búsqueda de predicción metagenómica.

Con los archivos anteriormente obtenidos y la tabla de abundancia de los ASVs, se realizó la búsqueda de predicción metagenómica, sin embargo, el formato utilizado por Picrust2 para lectura de la tabla de abundancia de cada una de las muestras era formato biom, de manera que se utilizó la función biom convert para que tenga correctamente el formato dicha tabla, y la función pathway_pipeline.py se utilizó finalmente para obtener la predicción metagenómica. Dentro de la predicción metagenómica obtenida, esta se encontraba distribuida por números EC para cada uno de los taxones, sin embargo, en el caso de este proyecto el interés es principalmente en las rutas metabólicas, de manera que se utilizó la función pathway_pipeline.py para tener las rutas para cada taxón de cada muestra.

2.4. Análisis de abundancia de función

La forma de presentación de los datos finales de Picrust2 era en una tabla, en la que se detallaban distintos parámetros de cada una de las rutas metabólicas, incluyendo la categoría de abundancia de función por taxón, la cual fue la categoría más importante para realizar en análisis usando R. El script de R fue proporcionado al igual que las secuencias, por estar involucrado en experimentos de análisis metagenómicos similares, sin embargo, este se modificó para el caso de uso en análisis metagenómico de bioceldas.

Dentro del script, existieron tres librerías fundamentales para el análisis de la abundancia de la función. Primeramente, se utilizaron varias funciones de “pals”, que provee mapas de colores junto con herramientas de evaluación de estos, igualmente “ohchibi” que brinda herramientas filogenómicas y matrices pangenómicas se utilizó, mientras que la última librería usada fue “scales” para aplicar sus funciones de escalar los gráficos al nivel visual deseado.

En cuanto al script utilizado como tal, primero se realizó la lectura del archivo tsv proporcionado por el pipeline de Picrust2, con el objetivo de sumar la abundancia de función

de cada uno de los taxones para cada ruta y de su respectiva muestra. Con los valores obtenidos, se realizó una matriz excluyendo los datos no utilizados, teniendo solamente la muestra, las rutas y los valores de abundancia de la función, para así aplicar una normalización de los datos y sea posible distinguir fácilmente la diferencia entre abundancia de la función para cada ruta. Se ordenaron las muestras, las rutas y se determinó el orden de las rutas, para así crear mediante un dendrograma, la cantidad de clústeres apropiados según cada una de las muestras. Se determinó el rango para los valores normalizados de z , y se reordenó en base a los parámetros mencionados, una matriz de construcción para un gráfico tipo mapa de calor. Con la matriz lista, se estableció parámetros de color y escala del mapa de calor, para así proceder a tener este de manera visualmente distinguible para cada una de las rutas metabólicas por muestra y clúster. Finalmente, se exportó la información de los valores normalizados z , de cada una de las rutas en cada clúster, siendo en total 7 clústeres los resultantes.

2.5. Análisis de abundancia de función por taxón

Con el proceso mencionado de análisis de función utilizando el script de R, también se generó un archivo que clasificaba para cada una de las rutas metabólicas, la contribución de abundancia de cada uno de los ASVs, con el objetivo de saber a qué taxones corresponde dicha ruta metabólica.

De esa forma, las secuencias 16s rRNA entregadas se abrieron en el software MEGA X con su respectivo alineamiento, y se realizó Blastn a cada una de estas para hallar el taxón correspondiente a cada uno de los ASVs, de manera que, junto con el archivo anterior de abundancia de cada ASVs, se clasificó los taxones más abundantes en cada ruta metabólica.

3. RESULTADOS

La Figura 1 muestra un mapa de calor en base a los resultados obtenidos utilizando Picurst2 para predicción metagenómica utilizando los ASVs de cada una de las muestras secuenciadas, es decir, las bioceldas monocamerales de Punta Pitt y Cerro Brujo, en las que solamente existió sedimento, y la biocelda bicameral, correspondiente a la nomenclatura PP, puesto a que esta se cultivó en medio BG11 a partir de una muestra de Punta Pitt. De esa manera, la Figura 1 expresa el valor de la abundancia de la función, ósea cada una de las rutas metabólicas, del total de taxones que contribuyen a cada una de estas de forma normalizada, por lo que se expresa en valores de Z como se presenta en la figura. En cuanto a las divisiones de la Figura 1, existen 7 clústeres que agrupan a las distintas rutas, el proceso para llegar a esto se realizó utilizando R, utilizando funciones de la librería ohchibi, que proporciona herramientas filogenómicas y matrices pangenómicas, siendo primero construido un dendrograma en base a los valores normalizados de abundancia de cada una de las rutas, y luego agrupando estos en los 7 clústeres de la Figura 1, que presentan características particulares para cada una de las muestras.

En cuanto a las 3 muestras de las que se obtuvo resultados, debido a la gran cantidad de rutas y taxones, se focalizan los resultados principalmente en los procesos catabólicos que cumplen cada una de estas rutas, puesto a que las rutas catabólicas son mayormente relacionadas a mecanismos de transferencia extracelulares de electrones o EET, sin embargo, el detalle de todas las rutas predichas para cada una de las muestras se encuentra en la sección de anexos.

3.1.Punta Pitt

Punta Pitt es la primera muestra que encontramos en el mapa de calor de la Figura 1, siendo los clústeres más activos en este caso el 4, 5, 1 y 7, al presentar abundancia de las rutas de estos mayor a la media.

En total se encuentran 127 rutas para clúster 4 de la Figura 1 para esta muestra, con 68 de tipo catabólico, como se muestra en la Tabla 1; es el más grande de los clústeres, y debido a esto existe gran variedad en la cantidad de categorías de metabolismos representados, encontramos generación de metabolitos precursores y energía, degradación de compuestos aromáticos, degradación de aminoácidos, y degradación de aminas y poliaminas, como las categorías catabólicas más presentes. De tal forma, encontramos las siguientes rutas asociadas a EET y con abundancia mayor a la media para este clúster 4: oxidación de metanol a dióxido de carbono, super ruta de degradación de tolueno aeróbica, degradación de 2-aminofenol, degradación de tolueno IV (aeróbica) (vía catechol), degradación de tolueno I (aeróbica) (vía o-cresol), degradación de tolueno II (aeróbica) (vía 4-metilcatechol), degradación de glucosa (oxidativa), ruta Entner-Doudoroff III (semi-fosforilativa), fermentación de piruvato a acetato y lactato II, fermentación homoláctica, ruta etimalonil-CoA, ciclo parcial de TCA (autótrofos obligados), ciclo TCA VII (acetato-productores), super ruta de metanogénesis, reducción de nitrato VI (asimilatoria), super ruta de degradación de taurina, super ruta de metabolismo de corismato y super ruta de aspartato.

Por otro lado, la Tabla 1 muestra que el clúster 5 tiene en total 59 rutas, de las cuales 22 cumplen con funciones catabólicas, y se tiene dos metabolismos principales asociados a estas rutas catabólicas, degradación de nucleósidos y nucleótidos, con 4 rutas, y degradación de compuestos aromáticos, con 8 rutas. De esa manera, las rutas metabólicas con alta abundancia únicamente en Punta Pitt son: super ruta de degradación defeniletilamina, degradación de alantoína a glioxilato III, degradación de L-triptófano XII (Geobacillus), degradación de catechol III (ruta de orto-fijación), degradación de compuestos aromáticos vía

β -ketoacido, degradación de catechol a β -ketoacido, ciclo Calvin-Benson-Bassham, fermentación de piruvato a isobutanol (diseñado), fermentación piruvato a acetona, degradación glicerol a butanol, degradación de inosina 5'-fosfato, degradación de nucleótidos de adenosina II y degradación de nucleótidos de guanosina III.

En el caso del clúster 1, el total de rutas resulta ser de 49, como se muestra en la Tabla 1, existen 9 rutas catabólicas y 40 rutas anabólicas, por lo que mayormente existen metabolismos relacionados a procesos anabólicos en este clúster, y no hay categorías específicas de metabolismos catabólicos mayormente representados. Dentro de la Figura 1, encontramos para el clúster 1, que la muestra de Punta Pitt únicamente mantiene cerca de la mitad de las rutas de este clúster con abundancia mayor a la media, de estas la mayoría de rutas son anabólicas y existen 8 de las 9 catabólicas de este clúster representadas con un valor mayor a la media, siendo estas: ruta de meta fijación de compuestos aromáticos, degradación de 3-fenilpropanoato, ciclo TCA reductivo I, fosfolipasas, glicólisis, reciclaje de anhidromuropéptidos I, degradación mio-inositol I y super ruta de degradación de sulfolactato.

Por otro lado, en la Tabla 1 encontramos que el clúster 7 tiene 21 rutas metabólicas, siendo el más pequeño de los 7 clústeres, está principalmente conformado de rutas catabólicas, al tener 16 de estas, dentro de las cuales los metabolismos más representados corresponden a degradación compuestos aromáticos, y fermentación de piruvato, con 3 rutas en ambos casos. En la Figura 1, el heatmap detalla que existen rutas con la misma abundancia, y a su vez mayor a la media, entre Punta Pitt y Cerro Brujo para el clúster 7, de estas rutas las catabólicas son: degradación de alcohol, oxidación de compuestos C1 a CO₂, y fermentación heteroláctica; mientras que también existen rutas con mayor abundancia en Punta Pitt y atenuadas en Cerro Brujo, de estas las rutas catabólicas son: nitrato reducción I (denitrificación), fermentación de piruvato a butanoato, super ruta de fermentación

acidogénica de *Clostridium acetobutylicum*, asimilación de formaldehído II (ciclo RuMP asimilatorio), oxidación formaldehído I, metanogénesis de H₂ y CO₂, y degradación de metilfosfanoato I.

En base a las rutas catabólicas mencionadas con abundancia mayor a la media en Punta Pitt, dentro de estos clústeres con alta expresión, y con relación a procesos catabólicos EET, encontramos la Tabla 2, que muestra la presencia de los taxones con mayor contribución en abundancia para cada una de las rutas relacionadas a transferencia extracelular de electrones. De tal manera, en Punta Pitt encontramos los siguientes taxones como los más abundantes para las distintas rutas mencionadas: *Lachnospiraceae spp*, *Polymorphum*, *Coriobacteriaceae spp*, *Halopeptonella*, *Haloplanus*, *Wenzhouxiangella*, *Halorubrum* y *Ruminococcaceae spp*.

3.2.Cerro Brujo

Cerro Brujo es la segunda muestra que encontramos en el mapa de calor de la Figura 1, siendo los clústeres más activos en este caso el 2, 7 y 6.

Como se muestra en la tabla 1, existen en total 33 rutas metabólicas en el clúster 2, 21 corresponden a procesos catabólicos, siendo las rutas de degradación de compuestos aromáticos, con 10 rutas, el metabolismo catabólico más representativo. Dentro de este clúster 2, se encuentran las siguientes rutas catabólicas relacionadas a mecanismos EET: fermentación de crotonato (a acetato y carboxilato ciclohexano), desnitrificación nitrificante, degradación de glicógeno II, ruta de reducción de acetyl coenzima A I (bacterias homoacetogénicas), degradación de benzoyl-CoA II (anaeróbica), degradación de compuestos aromáticos anaeróbica (*Thauera aromatica*), y degradación de tolueno VI (anaeróbico).

Se encuentra en la Figura 1 que, para Cerro Brujo, el clúster 7 también tiene alta actividad como sucede con Punta Pitt, anteriormente se describió este clúster como tal, y se estableció las rutas que comparten la misma abundancia entre las dos muestras; de la misma forma, se

describió anteriormente las rutas catabólicas que presentaban mayor abundancia en Punta Pitt y atenuación en Cerro Brujo, ahora lo mismo sucede de forma inversa, siendo las rutas catabólicas más abundantes de Cerro Brujo y atenuadas en Punta Pitt las siguientes: degradación de cinamato y 3-hidroxicinamato a 2-hidroxi-pentadienoato, degradación de 3-fenilpropanoato y 3-(3-hidroxifenil)propanoato, degradación de 3-fenilpropanoato y 3-(3-hidroxifenil)propanoato a 2-hidroxifenilpentadienoato, y ciclo TCA reductivo incompleto.

Para el caso de clúster 6, la Tabla 1 muestra que en total existen 55 rutas metabólicas, con 11 de carácter catabólico y 44 anabólicas, de manera que no existen metabolismos catabólicos representativos en este clúster. La Figura 1, muestra que Cerro Brujo tiene algunas rutas con abundancia mayor a la media, de las cuales las catabólicas son: fermentación de piruvato a propanoato I, asimilación de formaldehído I (ruta serina), degradación de sucrosa II (sucrosa sintasa), degradación de amina aromática biogénica (bacteria), derivación de *Bifidobacterium*, degradación de L-arginina II (ruta AST), y degradación de glucosa y glucosa-1-fosfato.

La tabla 3, nuevamente muestra la presencia de las rutas metabólicas relacionadas a EET y ya mencionadas anteriormente, para los diferentes taxones que tienen alta contribución de abundancia para estas, con los siguientes taxones presentes en la mayoría de rutas en Cerro Brujo: *Gracilimonas*, *Balneolaceae spp*, *Oscillatoria*, *Desulfobulbus*, *Desulfobulbaceae spp*, *Nitrosomonas*, *Phycisphaeraceae spp*, *Candidatus Tenderia electrophaga*, *Chlorobium* y *Salinisphaera*. Mientras que únicamente para el caso de las rutas de degradación de glicógeno II y ruta I reductiva de acetil coenzima A (bacterias homoactogénicas), tenemos los anteriores taxones reflejados en la tabla, además de: *Microcoleus*, *Fulvivirga*, *Hoeflea*, *Wenzhouxiangella*, *Muricauda*, *Chroococcus*, *Marinobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Abidovulvum*, *Rhodothermaceae spp*, *Myxococcus* y *Nannocystaceae spp*, y los taxones de,

Lachnospiraceae spp, *Haloplanus*, *Ruminococcaceae spp*, solamente para esta última ruta mencionada.

3.3.Punta Pitt (PP) cultivada

La biocelda bicameral cultivada, correspondiente a la nomenclatura PP, es la tercera que encontramos en el mapa de calor de la Figura 1, siendo los clústeres más activos en este caso el 5, 1, 3 y 6.

Dentro de la Figura 1, está presente el clúster 5 como activo, tanto para Punta Pitt como en la muestra cultivada PP, este clúster se describió con anterioridad, de forma que, el caso de las rutas con alta abundancia en PP, resultan ser compartidas con Punta Pitt aunque atenuadas en PP, las rutas catabólicas de estas son entonces: degradación de protocatecolato II (ruta orto-fijación), degradación de fenilacetato I (aeróbico), degradación de tolueno III (aeróbico) (vía p-cresol), fermentación ácida mixta, fermentación de succinato a butanoato, super ruta de glicólisis y ruta Entner-Doudoroff, glicólisis III (desde glucosa), y degradación de mio-, chiro- y scyllo-inositol.

En el caso del clúster 1 de la Figura 1, que igualmente se comparte entre Punta Pitt y PP, ya se mencionó las rutas catabólicas compartidas entre estas dos muestras, con abundancia alta en ambos casos, de manera que en el caso de PP, las rutas particulares y con una abundancia muy alta para esta muestra son: degradación de L-triptófano IX, fosfolipasas, y reciclaje de anhidromuropéptidos I.

El clúster 3, el único clúster de la Figura 1 que solamente tiene rutas con abundancia alta en PP, muestra en la tabla 1 un total de 60 rutas totales, con 29 de tipo catabólico, los metabolismos catabólicos presentes mayormente son la generación de metabolitos precursores y energía, degradación de compuestos aromáticos, con 6 rutas en ambos casos, y degradación de aminoácidos, con 4 rutas. De tal manera las rutas con abundancia mayor a la

media y de carácter catabólico relacionado a mecanismos EET, son las siguientes: respiración aeróbica I (citocromo c), degradación de nicotinato I, metabolismo de ketogluconato, ciclo del glioxilato, glicólisis II (desde fructosa 6-fosfato), ciclo TCA IV (2-oxoglutarato decarboxilasa), ciclo TCA VI (*Helicobacter*), super ruta de derivación de glioxilato y TCA, y ciclo TCA.

Como se observa en la Figura 1, el clúster 6 mantiene rutas con alta abundancia entre Cerro Brujo y PP, estas rutas catabólicas compartidas y las generalidades de este clúster ya se mencionaron anteriormente, siendo las rutas particulares de la muestra cultivada PP las siguientes: degradación de L-leucina I, asimilación del glioxilato, super ruta del ciclo 3-hidroxiopropanoato, y sulfato reducción asimilatoria I.

Finalmente, la Tabla 4 detalla la presencia de los diferentes taxones con alta contribución de abundancia en cada una de las rutas metabólicas relacionadas a EET ya mencionadas, siendo los taxones con mayor contribución de abundancia los siguientes: *Microcoleus*, *Fulvivirga*, *Hoeflea*, *Gracilimonas*, *Wenzhouxiangella*, *Muricauda*, *Chroococcus*, *Phycisphaeraceae spp*, *Marinobacter*, *Methylohalomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Abidovulvum*, *Rhodothermaceae spp*, *Myxococcus*, *Nannocystaceae spp*, y *Phormidesmiaceae spp*.

4. DISCUSIÓN

En este proyecto de investigación, se relaciona la contribución de las diferentes rutas metabólicas con capacidad EET predichas, con sus respectivos taxones con mayor contribución en estas, para entender las diferentes relaciones de simbiosis que existen en las bioceldas monocamerales de las muestras de Punta Pitt, Cerro Brujo y la muestra cultivada PP, que correspondía a una biocelda bicameral. Además, la predicción de rutas metabólicas nos permite encontrar otros aspectos importantes de las bioceldas, como es la degradación de compuestos aromáticos, lo cual permitirá utilizar las bioceldas para depurar aguas residuales y producción de energía.

Los ciclos de reciclaje de nutrientes que son utilizados por los distintos taxones bacterianos se observan en todas las muestras. En el caso de Punta Pitt, dentro del ciclo del nitrógeno, encontramos que todos los taxones con alta abundancia participan en reducción de nitrato VI(asimilatoria), donde se inicia con nitrato, que se reduce a nitrito y seguidamente a amonio, que a su vez es precursor para la formación de L-glutamina y L-glutamato, principalmente los taxones correspondientes a arqueas *Haloplanus* y *Halorubrum*, son los encargados de realizar nitrato reducción I (denitrificación), donde se reduce nitrato a nitrito y finalmente a nitrógeno molecular; siendo ambas especies halófilas halladas en lagunas marinas (Chi *et al.*, 2007). De manera similar, la ruta de nitrato de reducción I (denitrificación), está presente en la biocelda de Cerro Brujo, sin embargo, en este caso los encargados de esta reducción son taxones bacterianos de la familia *Balneolaceae spp* y del género *Nitrosomonas*, que además realizan denitrificación nitrificante, una ruta en la que el amonio se oxida a nitrito y se reduce constantemente a nitrógeno molecular, dicha ruta ha sido bien caracterizada en *Nitrosomonas*, puesto a que este grupo pertenece a oxidadores de amonio autotróficos y que realiza esta ruta en condiciones oxigénicas, como es el caso en esta biocelda monocameral (Ritchie y Nicholas, 1972).

En cuanto a otros ciclos de nutrientes, como es el caso del azufre, encontramos taxones muy abundantes de familias como *Desulfobulbaceae* en el caso de Cerro Brujo, que es una caracterizada familia por reducir sulfatos a sulfuros, además que encontramos específicamente el género *Desulfobulbus*, como de los taxones más presentes en esta muestra y que igualmente realizan la misma reducción de sulfato (Lovley y Phillips, 1994). Resulta relevante la presencia de este género puesto a que ha sido asociado con electrogénesis durante la reducción de sulfato, al generar electrones libres que son justamente los que producen energía dentro de la biocelda, además de participar en rutas como fermentación de crotonato, que produce acetato y se relaciona con el ciclo del hidrógeno (Lovley y Phillips, 1994). Por otro lado, el metabolismo de compuestos del azufre en el caso de Punta Pitt, está principalmente presentado en la super ruta de degradación de sulfolactato, en el cual se encuentran envueltos todos los taxones con alta abundancia, y en este caso se utiliza un compuesto órganosulfonatado que se termina oxidando en acetil coenzima A por diferentes mecanismos, se oxida en 3-sulfolactato para mediante esta ruta convertirse en piruvato, o bien se termina convirtiendo en sulfito (Cook *et al.*, 2006).

Para el caso del ciclo del hidrógeno, tenemos en la muestra de Cerro Brujo, principalmente a los taxones del género *Oscillatoria* y *Desulfobulbus*, como los únicos en realizar la ruta de metanogénesis de H₂ y CO₂, principalmente asociado con *Desulfobulbus*, al ser un proceso de producción de metano mediante respiración anaeróbica, mientras que la contribución de los otros dos grupos de bacterias se centra en partes específicas de esta ruta fuera de la producción de metano (Pritchett y Metcalf, 2005). Por su parte, la muestra de Punta Pitt, mantiene la misma ruta de metanogénesis descrita anteriormente, y realizada por los grupos de arqueas *Haloplanus* y *Halorubrum*, mientras que igualmente el resto de taxones de este grupo se encuentran envueltos en esta super ruta de metanogénesis, exceptuando *Wenzhouxiangella*, también encontramos rutas que producen acetato como fermentación de

piruvato a acetato y lactato II, de relevancia en este ciclo puesto a que el acetato se usa como sustrato en la metanogénesis (Pritchett y Metcalf, 2005). La importancia de caracterizar las rutas de metanogénesis junto con las de bacterias sulfato reductoras y nitrato reductoras, se centra en que la simbiosis que existe entre los taxones que realizan estas rutas metabólicas está envuelta en la remoción de metano de sedimento del océano, debido a que las muestras utilizadas provienen de lagunas marinas, ya existen presentes estos procesos de transferencia de electrones directamente entre estos grupos de taxones, y evidencia genómica reciente muestra que pueden existir genes relacionados entre estos grupos, que permitan mantener mecanismos de transferencia extracelular de electrones en microorganismos que presentan simbiosis (Skenneron *et al.*, 2017).

La muestra Punta Pitt, PP, a diferencia de las otras dos muestras, no presenta rutas altamente abundantes que nos permitan conocer los procesos de simbiosis de diferentes compuestos que se utilizan por los diferentes taxones dentro de esta, la razón de esto se debe a que el cultivo de esta biocelda se lo realizó en medio BG11, el cual es utilizado para el cultivo de cianobacterias y contiene ácido cítrico, citrato de amonio férrico, entre otros compuestos, que hacen carecer a este de fuente de nitrógeno (IBVF, s.f.). De tal manera, es la muestra que tiene mayor cantidad de rutas relacionadas a fotosíntesis oxigénica, característica de las cianobacterias, incluyendo diferentes ciclos del TCA o similares como TCA VI, TCA IV (2-oxaglutarato descarboxilasa), TCA reductivo I, y ciclo del glioxilato, que están involucradas en respiración aeróbica y están presentes en la mayoría de organismos aeróbicos, mientras que rutas como la respiración aeróbica I (citocromo C), están envueltas en respiración y en cadena de transporte de electrones, donde las flavoproteínas juegan un rol esencial de transferencia, como sucede con los mecanismos EET (Galushko y Schink, 2000). De importante en las rutas anteriormente mencionadas, está que se encuentra la presencia de todos los taxones con alta abundancia en esta muestra, debido a las condiciones aeróbicas de

esta biocelda, la mayoría de estos taxones son aerobias, siendo *Gracilimonas*, *Fulvivirga*, *Wenzhouxiangella* y *Muricauda*, las únicas anaeróbicas reconocidas dentro de la biocelda con alta abundancia, aunque mantienen características de ser halofílicas, como presenta este medio (Lu *et al.*, 2017).

Solamente en la muestra de Punta Pitt de la biocelda monocameral, encontramos diferentes rutas de degradación de tolueno, un contaminante importante en aguas residuales, como es la degradación de tolueno IV (aeróbica vía catechol), III (aeróbica vía p-cresol), II (aeróbica vía 4-metilcatechol), y I (aeróbica vía o-cresol), mientras que está presente la ruta IV mencionada en Cerro Brujo igualmente, y la III se encuentra presente en la muestra cultivada PP; siendo en todos los casos el tolueno degradado para tener acetil coenzima A y entrar al ciclo de TCA, y dentro de estas rutas se encuentran envueltas diferentes quinonas solubles, que se relacionan como aceptores terminales de electrones dentro de procesos de transferencia extracelular de electrones, y son aceptores de electrones en oxidación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos, como es el benceno y el tolueno (Stams *et al.*, 2006). Otros compuestos como fenoles, y bencenos, también se encuentran presentes en rutas de degradación de compuestos aromáticos, como es la ruta de degradación de compuestos aromáticos anaeróbicos, presente abundantemente en las tres muestras, parte de la respiración anaeróbica de taxones pertenecientes a *Desulfobulbaceae*, *Nitrosomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Coriobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Haloplanus*, *Halorubrum* y *Ruminococcaceae*, estos pueden tener mecanismos EET posibles con quinonas de transferencia, o bien mecanismos parecidos a otros taxones ya conocidos que degradan compuestos aromáticos por rutas desimilatorias, como es con taxones pertenecientes a los géneros *Shewanella* y *Geobacter* spp (Jiang *et al.*, 2020).

5. CONCLUSIONES

1. Picrust2, a diferencia de otras herramientas como Piphilin, resultó bastante útil en la predicción genómica de las rutas metabólicas en microorganismos electrogénicos presentes en 3 celdas de combustible microbiano.
2. La predicción de funciones a partir de secuencias de 16s rRNA, puede ser una alternativa viable cuando no es posible realizar transcriptómica, puesto a que no requiere costos adicionales y nos permite tener un análisis preliminar metagenómico.
3. El proceso de sintrofia entre los consorcios microbianos presentes en las bioceldas, es crucial para la producción de electricidad, donde el reciclaje de compuestos de azufre y nitrógeno fue común para las 3 muestras.
4. Se identificó rutas para degradación de compuestos aromáticos como el tolueno, lo cual convierte a la microbiota presente, en candidata a ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales y electrogénesis.

6. TABLAS

Tabla 1: Detalle de rutas metabólicas para los 7 clústeres del Heatmap de la Figura 1.

Clúster	Rutas catabólicas	Rutas anabólicas	Rutas Totales	Metabolismos catabólicos más representados	Metabolismos anabólicos más representados
1	9	40	49	Ninguno	Biosíntesis nucleósidos y nucleótidos (10), biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (4), biosíntesis de pared celular (4), biosíntesis de aminoácidos (6).
2	21	12	33	Degradación de compuestos aromáticos (10).	Biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (4).
3	29	31	60	Generación de metabolitos precursores y energía (6), degradación de compuestos aromáticos (6), degradación de aminoácidos (4).	Biosíntesis de lípidos y ácidos grasos (5), biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (15), degradación de carboxilato (4),
4	68	59	127	Generación de metabolitos precursores y energía (4), degradación de compuestos aromáticos (8), degradación aminoácidos (6), degradación de aminas y poliaminas (5).	Biosíntesis metabolitos secundarios (11), biosíntesis nucleósidos y nucleótidos (12), biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (18), biosíntesis de carbohidratos (20), biosíntesis de aminoácidos (9),
5	22	37	59	Degradación de nucleósidos y nucleótidos (4), degradación de compuestos aromáticos (8).	Biosíntesis nucleósidos y nucleótidos (8), biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (4), biosíntesis de aminoácidos (15).
6	11	44	55	Ninguno	Biosíntesis de tetrapirrol (4), biosíntesis de lípidos y ácidos grasos (6).
7	15	6	21	Degradación compuestos aromáticos (3), fermentación de piruvato (3).	Biosíntesis cofactores, transportadores y vitaminas (14), biosíntesis de carbohidratos (7).

Detalle del total de rutas catabólicas y anabólicas, además de la clasificación de metabolismos más representados por estas rutas predichas mediante Picurst2.

Fermentación de piruvato a isobutanol (diseñada)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fermentación de piruvato a acetona	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degradación de glicerol a butanol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Super ruta de glicólisis y de ruta Entner-Doudoroff	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ruta pentose fosfato (rama no oxidativa) I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glicólisis III (desde glucosa)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ruta de meta fijación de compuestos aromáticos	✓	X	✓	X	✓	X	✓	✓
Ciclo TCA reductivo I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glicólisis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degradación mio-inositol I	X	✓	X	X	X	X	X	X
Super ruta de degradación de sulfolactato	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Degradación de compuestos aromáticos anaeróbico (<i>Thauera aromatica</i>)	X	X	X	✓	✓	✓	X	X	X	X
Degradación de tolueno VI (anaeróbico)	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓
Fermentación de piruvato a propanoato I	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓
Asimilación de formaldehído I (ruta serina)	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓
Fermentación heteroláctica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Nitrato reducción I (denitrificación)	X	✓	X	X	X	✓	X	X	X	X
Fermentación de piruvato a butanoato	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Metanogénesis de H ₂ y CO ₂	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X

Se muestra para cada una de las rutas metabólicas si existe presencia del determinado taxón con una X, al ser taxones con alta contribución en casi todas las rutas descritas de la tabla.

Tabla 4: Detalle de rutas metabólicas inferidas con mayor abundancia en la muestra cultivada PP y relacionadas a EET, con los diferentes taxones que presentan mayor abundancia para estas rutas

Cultivada (PP)	Clasificación del taxón															
	<i>Microcoleus</i>	<i>Fulvigrana</i>	<i>Hydrogenobacter</i>	<i>Glycolimonia</i>	<i>Wentlandiella</i>	<i>Methanohalobium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Phaeoarchaeum</i>	<i>Methanohalobium</i>	<i>Methanohalobium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acetivulvum</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Phormidium</i>
Degradación de tolueno III (aeróbico) (vía p-cresol)	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	✓	X
Glicólisis III (desde glucosa)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ruta de meta fijación de compuestos	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	✓

aromáticos																	
Ciclo TCA reductivo I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glicólisis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degradación de mio-inositol I	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X
Respiración aeróbica I (citocromoc)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degradación nicotinato I	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ciclo del glioxilato	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glicólisis II (desde glucosa 6-fosfato)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ciclo TCA IV (2-oxoglutaratodecarb oxilasa)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TCiclo TCA IV (<i>Helicobacter</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ciclo TCA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fermentación de piruvato a propanoato I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Asimilación de formaldehído I (ruta serina)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Metabolismo de	✓	X	X	✓	X	✓	✓	X	X	X	✓	✓	X	✓	✓	✓	X

ketogluco nato																	
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Se muestra para cada una de las rutas metabólicas si existe presencia del determinado taxón con una X, al ser taxones con alta contribución en casi todas las rutas descritas de la tabla.

7. FIGURAS

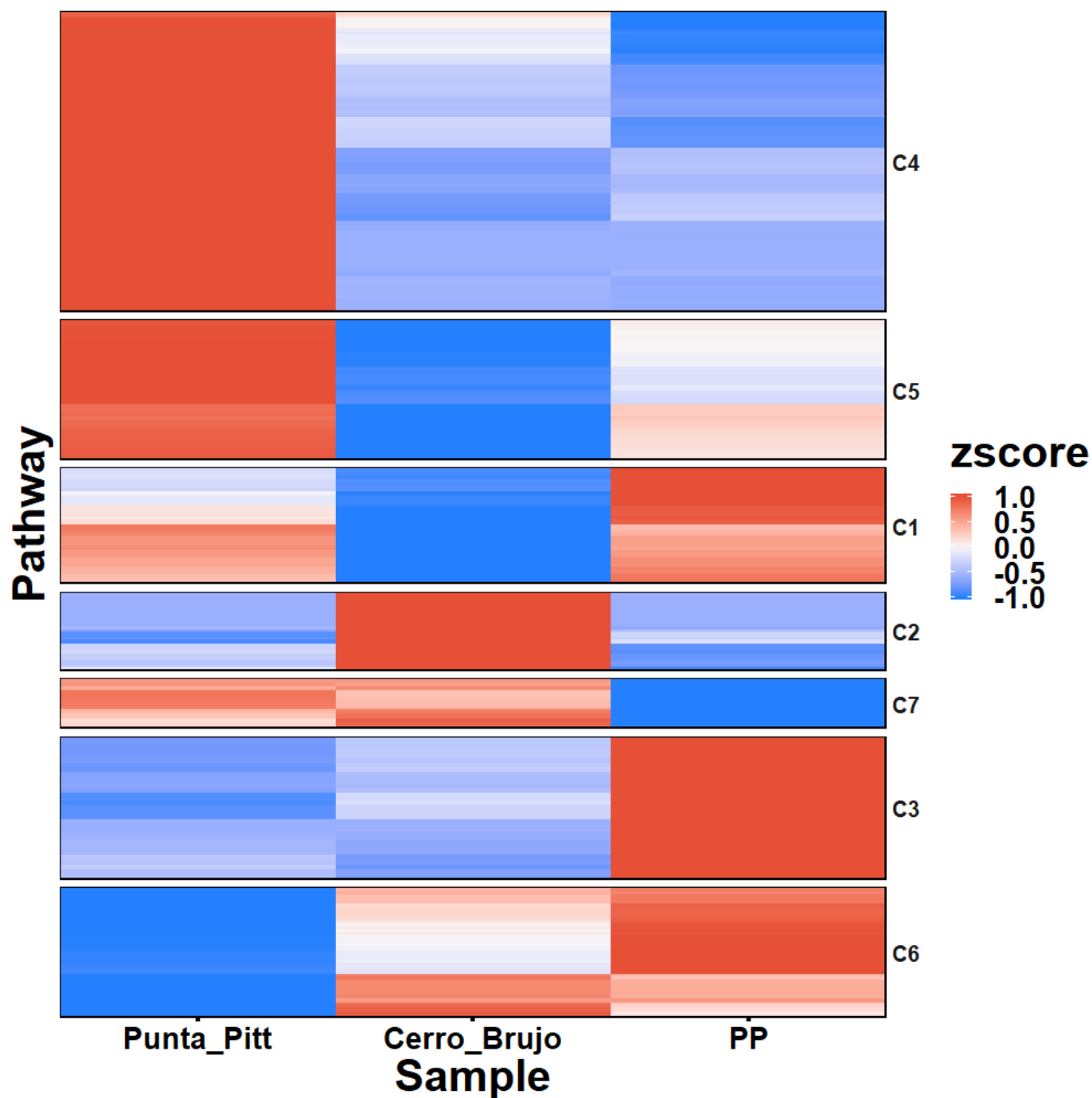


Figura 1: Heatmap de abundancia de las rutas metabólicas predichas por Picrust2

Detalle de abundancia de las rutas metabólicas para cada una de las muestras tomadas de Galápagos, Punta Pitt, Cerro Brujo y la muestra de la biocelda cultiva con su nomenclatura PP, al provenir de Punta Pitt. Se utiliza un zscore para visualizar la abundancia de las rutas por encima de la media, con valores mayores a la media de color rojo y azules cuando son menores.

8. REFERENCIAS

- Liu, X., Shi, L., & Gu, J. D. (2018). Microbial electrocatalysis: redox mediators responsible for extracellular electron transfer. *Biotechnology advances*, 36(7), 1815-1827.
- Angelaalincy, M. J., Navanietha Krishnaraj, R., Shakambari, G., Ashokkumar, B., Kathiresan, S., & Varalakshmi, P. (2018). Biofilm engineering approaches for improving the performance of microbial fuel cells and bioelectrochemical systems. *Frontiers in Energy Research*, 6, 63.
- Javed, M. M., Nisar, M. A., Ahmad, M. U., Yasmeen, N., & Zahoor, S. (2018). Microbial fuel cells as an alternative energy source: current status. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 34(2), 216-242.
- Logan, B. E., Rossi, R., & Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 307-319.
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review. *Journal of power sources*, 356, 225-244.
- Zhang, H., Chen, X., Braithwaite, D., & He, Z. (2014). Phylogenetic and metagenomic analyses of substrate-dependent bacterial temporal dynamics in microbial fuel cells. *PloS one*, 9(9), e107460.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., & Langille, M. G. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 1-5.
- Cui, H. L., Lin, Z. Y., Dong, Y., Zhou, P. J., & Liu, S. J. (2007). *Halorubrum litoreum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2204-2206.

- Ritchie, G. A. F., & Nicholas, D. J. D. (1972). Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal*, 126(5), 1181-1191.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1994). Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2394-2399.
- Cook, A. M., Denger, K., & Smits, T. H. (2006). Dissimilation of C 3-sulfonates. *Archives of microbiology*, 185(2), 83-90.
- Pritchett, M. A., & Metcalf, W. W. (2005). Genetic, physiological and biochemical characterization of multiple methanol methyltransferase isozymes in *Methanosarcina acetivorans* C2A. *Molecular microbiology*, 56(5), 1183-1194.
- Skennerton, C. T., Chourey, K., Iyer, R., Hettich, R. L., Tyson, G. W., & Orphan, V. J. (2017). Methane-fueled syntrophy through extracellular electron transfer: uncovering the genomic traits conserved within diverse bacterial partners of anaerobic methanotrophic archaea. *MBio*, 8(4).
- IBVF. (s.f.). *Servicios de cultivos biológicos, Cianobacterias*. Recuperado el 10 de diciembre 2020, desde https://www.ibvf.us-csic.es/colecciones_cultivo
- Galushko, A. S., & Schink, B. (2000). Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Archives of microbiology*, 174(5), 314-321.
- Lu, D. C., Xia, J., Dunlap, C. A., Rooney, A. P., & Du, Z. J. (2017). *Gracilimonas halophila* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(9), 3251-3255.

Stams, A. J., De Bok, F. A., Plugge, C. M., Van Eekert, M. H., Dolfing, J., & Schraa, G.

(2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities.

Environmental microbiology, 8(3), 371-382.

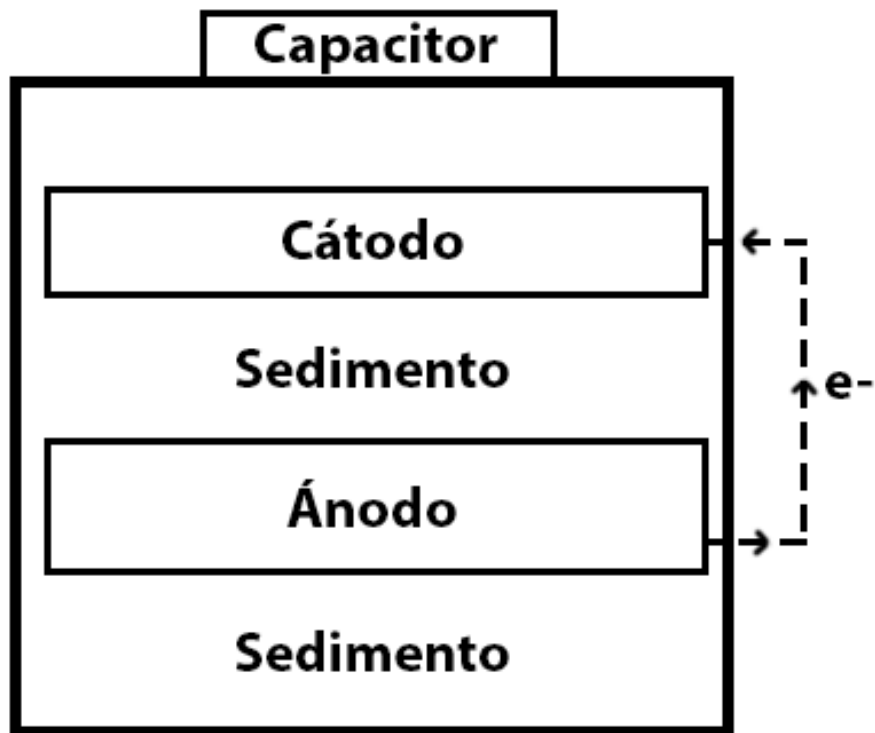
Jiang, Z., Shi, M., & Shi, L. (2020). Degradation of organic contaminants and steel corrosion

by the dissimilatory metal-reducing microorganisms *Shewanella* and *Geobacter* spp.

International Biodeterioration & Biodegradation, 147, 104842.

9. ANEXOS

ANEXO A: Esquema de las partes de una biocelda monocameral



ANEXO B: Esquema de las partes de una biocelda bicameral

