

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**

**“ALBERTO CAZORLA Y TALLERI”**



**"CAMBIOS QUÍMICOS EN UNA CELDA MICROBIANA  
GENERADORA DE ELECTRICIDAD A PARTIR DE  
TIOSULFATO"**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN QUÍMICA**

**AUTOR**

**Bach. Vanessa Sofía Oyola Cueva**

**LIMA, PERÚ**

**2018**

**ASESORA**

MSc. Graciela Silvia Untiveros Bermúdez

Sección Química – Departamento de Ciencias Exactas

**CO – ASESORA**

Dra. Jasmin Elena Hurtado Custodio de Berastain

Jefa del Laboratorio de Biotecnología

*A mis padres, Abelardo y Gloria  
por su apoyo incondicional  
y a mis hermanos  
Milagros y Jesús por su  
Compresión.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a Dios por las bendiciones en mi vida, guiarme en cada momento de circunstancias difíciles e iluminarme para culminar este proyecto.

A mis padres por su apoyo durante toda la etapa académica hasta finalizar la tesis. Por su amor infinito hacia mi persona y sus oraciones para ser mejor persona y profesional. A mi padre, por sus consejos y por demostrarme que con trabajo arduo puedes lograr tus objetivos. A mi madre, por transmitir mucho amor, confianza y por enseñarme ser fuerte ante cualquier adversidad.

A mi hermana por brindarme su apoyo durante el último año de mi etapa universitaria, comprender mis anhelos e incentivar me con palabras de motivación.

A mi hermano por su confianza, amor y preocupación por mi bienestar.

A Maria y a Gino por su amor infinito, sus oraciones por mi familia y por mí. Por ser parte de mi vida y comprender cada meta y sueño trazado.

A la Dra. Jasmin Hurtado por permitirme formar parte de este grupo de trabajo; sus enseñanzas y mucha paciencia contribuyó en mejorar profesionalmente.

A la MSc. Graciela Untiveros por ser mi asesora de tesis, por confiar en mí durante todos estos años y apoyarme cuando la necesitaba.

A Dra. Yolanda Reyes por sus consejos durante la etapa de redacción de este trabajo.

Amistades quienes compartí los años de universidad y estuvieron pendientes de mi avance académico con cada consejo y apoyo moral.

A Oksana y Dan estudiantes de Biología y Química respectivamente por su disponibilidad y apoyo en los primeros análisis de la parte experimental.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Ambiental en especial a Pamela por gestionar todos los trámites de compra para el proyecto, a Jacqueline y Sandro por su paciencia durante estos años del proyecto.

A las personas y amistades quienes conocí los últimos años y formaron parte de la culminación de este trabajo aprendiendo y recibiendo críticas constructivas para mi formación personal y académica.

## **JURADO CALIFICADOR**

PRESIDENTA: MSc. Dora Jesús Maurtua Torres

SECRETARIA: Ing. Gilma Benita Fernandez Zúñiga

VOCAL: MSc. Holger Jelimer Maldonado García

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

El desarrollo de esta tesis ha sido posible por el financiamiento del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y la Productividad (Innovate Perú) al proyecto “Celdas Microbianas productoras de bioelectricidad aplicadas al tratamiento de aguas ácidas: Evaluación de electrodos y cultivos microbianos” bajo el contrato convenio nro. 113-2015-FONDECYT – DE.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	8
1.3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	9
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
2.1. CELDAS ELECTROQUÍMICAS.....	10
2.1.1. Celdas electrolíticas.....	10
2.1.1.1. Técnica electroquímica: cronoamperometría.....	12
2.1.2. Celdas voltaicas o galvánicas.....	12
2.2. SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS (SBE).....	13
2.2.1. Tipos de sistemas bioelectroquímicos (SBE).....	17
2.3. ANTECEDENTES SOBRE CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM).....	18
2.3.1. Definición.....	20
2.3.2. Funcionamiento de la Celda de Combustible Microbiana.....	20
2.3.3. Diseño de la Celda de Combustible Microbiana.....	21

2.3.3.1. Configuración de dos cámaras de una Celda de Combustible Microbiana.....	21
2.4. GENERACIÓN DE VOLTAJE.....	22
2.4.1. Potenciales estándar de electrodo.....	24
2.4.2. Factores que disminuyen el voltaje.....	26
➤ Pérdidas óhmicas.....	26
➤ Pérdidas de activación.....	26
➤ Pérdidas metabólicas bacterianas.....	27
➤ Pérdidas de concentración.....	27
2.5. DESEMPEÑO EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM)	
2.5.1. Densidad de Potencia (DP).....	28
2.5.2. Eficiencia Coulómbica (EC).....	29
2.6. MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD ENERGÉTICA.....	30
2.7. BACTERIAS ACIDÓFILAS: <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i> .....	30
➤ Bacterias oxidantes de azufre y hierro.....	31
➤ Hábitat.....	31
➤ Metabolismo.....	33
➤ Sustrato: tiosulfato.....	35
<b>III.HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>IV.OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>

5.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	37
5.1.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
5.1.1.1. Determinación permanganométrica de hierro (II) por el método Zimmermann – Reinhard.....	39
5.1.1.2. Determinación de hierro total: Titulación con dicromato de potasio .....	39
5.1.1.3. Determinación de hierro (III).....	40
5.1.1.4.    Determinación Iodométrica de cobre (II).....	40
5.1.1.5.    Determinación de azufre elemental.....	41
5.1.1.6. Determinación de sulfatos en minerales.....	42
5.1.1.6.    Determinación de sulfitos.....	42
5.1.1.7.    Determinación de tiosulfatos.....	43
5.1.2. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN MEDIO TIOSULFATO.....	44
5.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS ESTANDARIZACIONES.....	44
5.1.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN CELDAS DE COMBUSTIBLE (CCM), CELDAS DE COMBUSTIBLE CONTROL (CCC) y CELDA ELECTROLÍTICA (CE).....	45
5.1.4.1. Experimentación en Celdas de Combustible Microbiana (CCM) de dos cámaras.....	45
5.1.4.2. Condiciones de trabajo y composición química en los compartimentos de las CCM y las CCC.....	46

5.1.4.3. Experimentación en la Celda Electrolítica (CE) para análisis electroquímico.....	47
5.1.4.4. Condiciones de trabajo, composición y características en la Celda Electrolítica (CE) para análisis electroquímico.....	47
5.1.4.5. Material de trabajo.....	48
5.1.4.6. Análisis cualitativo.....	52
5.1.4.6.1. Identificación de sulfuros.....	52
5.1.4.6.2. Identificación de tiosulfatos.....	53
5.1.4.6.3. Identificación de sulfitos y sulfatos.....	53
5.1.4.6.4. Identificación de hierro (II).....	53
5.1.4.6.5. Identificación de hierro (III).....	53
5.1.4.6.6. Identificación de cobre (II).....	54
5.1.4.7. Análisis cuantitativo.....	54
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EN SOLUCIONES ACUOSAS.....	55
6.1.1. Hierro (II).....	55
6.1.2. Hierro total.....	55
6.1.3. Cobre (II).....	56
6.1.4. Tiosulfatos.....	56
6.1.5. Sulfatos.....	56
6.1.6. Sulfitos.....	56
6.1.7. Azufre elemental.....	57

6.2. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN MEDIO	
TIOSULFATO.....	57
6.2.1. Tiosulfatos.....	57
6.3. TÉCNICAS CUALITATIVAS, CUANTITATIVAS Y ANÁLISIS DE VOLTAJE	
A LA CELDA DE COMBUSTIBLE DE DOS CÁMARAS.....	59
6.3.1. CCM 1: Medio tiosulfato (cámara anódica) y solución férrica (cámara	
catódica).....	59
6.3.2. CCM 2: Medio tiosulfato (cámara anódica) y solución cúprica (cámara	
catódica).....	64
6.3.3. CCM 3: Medio tiosulfato - ferroso (cámara anódica) y solución férrica	
(cámara catódica).....	68
6.4. ENERGÍAS GENERADAS EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA	
DE DOS CÁMARAS.....	72
6.5. EFICIENCIA COULÓMBICA EN CELDAS DE COMBUSTIBLE	
MICROBIANAS DE DOS CÁMARAS.....	72
6.6. TÉCNICAS CUALITATIVAS, CUANTITATIVAS Y ANÁLISIS DE VOLTAJE	
A LA CELDA ELECTROLÍTICA PARA ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO.....	73
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
ANEXOS.....	95

ANEXO 1. METODOLOGÍA EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM) Y CELDA DE COMBUSTIBLE CONTROL (CCC).....	96
ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN SOLUCIONES ACUOSAS.....	97
ANEXO 3. PROCEDIMIENTOS DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM) Y CELDA DE COMBUSTIBLE CONTROL (CCC).....	101
ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTANDARIZACIÓN DE TIOSULFATO EN NUTRIENTES PARA BACTERIAS ÁCIDAS.....	108
ANEXO 5. MEDICIONES DE VOLTAJE EN LA CCM Y CCC DE DOS CÁMARAS.....	113
ANEXO 6 CÁLCULOS DE DENSIDAD DE POTENCIA Y EFICIENCIA COULÓMBICA.....	117
ANEXO 7. DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA GENERADA EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA.....	121
ANEXO 8. FOTOS.....	130

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Vías de oxidación del anión tiosulfato. Fuente: modificado de Arias <i>et al.</i> , 2015.....	4
<b>Figura 2.</b> Drenaje ácido de mina. Mina Santa Cecilia, Puno - Perú. Fuente: Guerrero, 2012.....	6
<b>Figura 3.</b> Drenajes ácidos expuestos con aguas superficiales. Fuente: Guerrero, 2012...6	
<b>Figura 4.</b> Los drenajes ácidos de mina de la Faja Pirítica Ibérica presentan una elevada acidez y altas concentraciones metálicas. Fuente: Horizonte Minero.....	7
<b>Figura 5.</b> Esquema de conversión de energía eléctrica en energía química y viceversa.....	10
<b>Figura 6.</b> Esquema de una celda electrolítica. Fuente: Cedrón <i>et al.</i> , 2011.....	11
<b>Figura 7.</b> Componentes de una celda electrolítica para análisis electroquímico. Fuente: Camargo <i>et al.</i> , 2009.....	11
<b>Figura 8.</b> Componentes de una celda galvánica. Fuente: Cedrón <i>et al.</i> , 2011.....	13
<b>Figura 9.</b> Celda de Combustible Microbiana (CCM) con dos cámaras separadas por MIP. Fuente: Modificada de Chaudhuri and Lovley, 2003.....	21
<b>Figura 10.</b> Funcionamiento de una CCM usando como sustrato: compuestos inorgánicos de azufre (ISCs – siglas en inglés) y cámara doble. Modificada a partir de Ni. G. <i>et al.</i> , 2016.....	22
<b>Figura 11.</b> Transformaciones de compuestos inorgánicos de azufre en ambientes extremadamente ácidos. aSOP: procariotas ácidas que oxidan azufre; aSRP: procariotas ácidas que reducen azufre y aSRB: procariotas ácidas que reducen sulfato. Modificado de Vairavamurthy <i>et al.</i> , 1993. Fuente: Dopson y Johnson, 2012.....	34
<b>Figura 12.</b> Celda de microbiana conectada a un multímetro.....	130

<b>Figura 13.</b> Muestra de la CE: medio tiosulfato y solución férrica.....	130
<b>Figura 14.</b> Ánodo (izquierda) y cátodo (derecha) de la CCM 2.....	131
<b>Figura 15.</b> Ánodo (izquierda) y cátodo (derecha) de la CCC 2.....	131
<b>Figura 16.</b> Muestras de la CCM 1 y CCC 1. Derecha: ánodo y cátodo de la CCM 1. Izquierda: ánodo y cátodo control.....	131
<b>Figura 17.</b> Muestras de la CCM 2 y CCC 2. De izquierda a derecha: cátodo, cátodo control, ánodo y ánodo control.....	132
<b>Figura 18.</b> Muestras de la CCM 3 y CCC 3. De izquierda a derecha: cátodo control, cátodo, ánodo control y ánodo.....	132
<b>Figura 19.</b> Residuos de azufre.....	132

## LISTA DE GRÁFICOS

---

- Gráfico 1.** (a) Esquema del pulso en potencial aplicado a la interfase de la solución durante un tiempo  $t$ . (b) Respuesta obtenida en el cambio de corriente en función al tiempo ( $t$ ) Fuente: Martínez, 2006.....12
- Gráfico 2.** Número de artículos publicados sobre sistemas bioelectroquímicos que contienen las frases “microbial fuel cell” (MFC), “microbial electrolysis cell” (MEC), “microbial electrosynthesis” (MES) or “microbial desalination cell” (MDC). Fuente: Wang, 2013.....17
- Gráfico 3.** Voltaje & Tiempo (209 – 475 horas) – Etapa A y B de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.....62
- Gráfico 4.** Densidad de Potencia & Tiempo (209 – 475 horas) de una celda control y con bacterias en la Etapa A. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.....63
- Gráfico 5.** Densidad de Potencia & Tiempo (213.49 – 216.49 horas) – Etapa A y B de una celda control y con bacterias. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.....63
- Gráfico 6.** Densidad de Potencia & Tiempo (333 – 337 horas) de una celda control y con bacterias en la Etapa B. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.....64
- Gráfico 7.** Voltaje & Tiempo (0 – 183.44 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.....66
- Gráfico 8.** Densidad de Potencia & Tiempo (0 – 183.44 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.....67
- Gráfico 9.** Densidad de Potencia & Tiempo (92.74 – 97.74 H) de una celda control y con bacterias. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.....67

<b>Gráfico 10.</b> Voltaje & Tiempo (0 – 145.81 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato – solución ferrosa y cátodo: solución férrica.....	70
<b>Gráfico 11.</b> Densidad de potencia & Tiempo (0 – 145.81 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato – ferroso y cátodo: solución férrica.....	71
<b>Gráfico 12.</b> Densidad de potencia & Tiempo (44.82 – 51.82 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato – ferroso y cátodo: solución férrica.....	71
<b>Gráfica 13.</b> Cronoamperometría al medio tiosulfato y solución férrica en ausencia y presencia de bacterias (línea celeste: medio sin bacterias y línea roja: medio con bacterias).....	75
<b>Gráfico 14.</b> Voltaje medido (mV) de la CCM 1 (bacterias) y CCC 1(control) en función al tiempo (H) – Etapa A.....	121
<b>Gráfico 15.</b> Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa A.....	122
<b>Gráfico 16.</b> Densidad de potencia ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) de la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa A.....	122
<b>Gráfico 17.</b> Voltaje medido (mV) de la CCM 1 (bacterias) y CCC 1(control) en función al tiempo (H) – Etapa B.....	123
<b>Gráfico 18.</b> Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 1 en función al tiempo (H).....	124
<b>Gráfico 19.</b> Densidad de potencia ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) de la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa B.....	124

<b>Gráfico 20.</b> Voltaje medido (mV) de la CCM 2 (bacterias) y CCC 2 (control) en función al tiempo (H).....	125
<b>Gráfico 21.</b> Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 2 en función al tiempo (H).....	126
<b>Gráfico 22.</b> Densidad de potencia ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) de la CCM 2 en función al tiempo (H).....	126
<b>Gráfico 23.</b> Voltaje medido (mV) de la CCM 3 (bacterias) y CCC 3 (control) en función al tiempo (H).....	127
<b>Gráfico 24.</b> Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 2 en función al tiempo (H).....	128
<b>Gráfico 25.</b> Densidad de potencia ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) de la CCM 3 en función al tiempo (H).....	128

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Potenciales redox estándar de compuestos inorgánicos reducidos de azufre en solución acuosa. Fuente: Zhdanov, 1975.....	25
<b>Tabla 2.</b> Potencial redox estándar y teórico para reacciones y condiciones para CCM a 25°C. Fuente: Modificado de Logan, 2008.....	25
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos Acidófilos oxidantes de azufre y hierro. Fuente: Watling, 2006.....	32
<b>Tabla 4.</b> Composición química inicial en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa A.....	49
<b>Tabla 5.</b> Composición química inicial en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa B.....	49
<b>Tabla 6.</b> Composición química inicial en la CCM 2 y CCC 2.....	50
<b>Tabla 7.</b> Composición química inicial en la CCM 3 y CCC 3.....	51
<b>Tabla 8.</b> Composición química inicial de la CE.....	52
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la titulación de hierro (II) de concentraciones conocidas g/l..	55
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la titulación de hierro total de concentraciones conocidas g/l .....	55
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la titulación de cobre (II) a concentraciones conocidas g/l..	56
<b>Tabla 12.</b> Resultados de la estandarización de tiosulfato a concentraciones conocidas g/l.....	56
<b>Tabla 13.</b> Resultados de la estandarización de sulfatos a concentraciones conocidas g/l.....	56
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la estandarización de sulfitos a concentraciones conocidas g/l.....	57
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la la estandarización de azufre elemental (S).....	57

<b>Tabla 16.</b> Determinación de tiosulfato con medio tiosulfato no estéril.....	58
<b>Tabla 17.</b> Determinación de tiosulfato con medio tiosulfato estéril.....	58
<b>Tabla 18.</b> Determinación de tiosulfato 5g/l con medio tiosulfato estéril.....	58
<b>Tabla 19.</b> Pruebas cualitativas en cada una de las cámaras de la CCM 1 y CCC 1 – Etapa A.....	59
<b>Tabla 20.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 1 – Etapa A. .....	60
<b>Tabla 21.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 1 – Etapa A. .....	60
<b>Tabla 22.</b> Pruebas cualitativas en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa B.....	61
<b>Tabla 23.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 1 – Etapa B. .....	61
<b>Tabla 24.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 1– Etapa B. .....	62
<b>Tabla 25.</b> Pruebas cualitativas en la CCM 2 y CCC 2.....	65
<b>Tabla 26.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 2.....	65
<b>Tabla 27.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 2.....	66
<b>Tabla 28.</b> Pruebas cualitativas en CCM 3y CCC 3.....	68
<b>Tabla 29.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 3.....	69
<b>Tabla 30.</b> Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 3.....	69

<b>Tabla 31.</b> Resumen de la energía generada por las bacterias en CCM.....	72
<b>Tabla 32.</b> Eficiencia Coulómbica de una CCM de dos cámaras en los medios analizados.....	73
<b>Tabla 33.</b> Resultados cualitativos antes y después de la cronoamperometría del medio tiosulfato y solución férrica de la CE con bacterias.....	74
<b>Tabla 34.</b> Resultados cuantitativos antes y después de la cronoamperometría del medio tiosulfato y solución ferrosa de la CE con bacterias.....	74
<b>Tabla 34.</b> Eficiencia Coulómbica de una CCM de dos cámaras en los medios analizados.....	74
<b>Tabla 35.</b> Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 1 y CCC 1: medio tiosulfato y solución ferrosa (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica).....	113
<b>Tabla 36.</b> Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 2 y CCC 2: medio tiosulfato (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica).....	116
<b>Tabla 37.</b> Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 3 y CCC 3: medio tiosulfato (cámara anódica) y solución cúprica (cámara catódica).....	118

## **ABREVIATURAS**

---

**CCM:** Celda de Combustible Microbiana

**CCC:** Celda de Combustible Control

**CE:** Celda Electrolítica

**DP:** Densidad de Potencia

**EC:** Eficiencia Coulómbica

**TSB:** Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

**ET:** Elementos Traza

}

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación está orientado al uso de celdas de combustible microbianas con sustrato inorgánico, medio tiosulfato de sodio a pH 3.5 y condiciones anaeróbicas usando cepas acidófilas de la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el ánodo como catalizador para la producción de energía eléctrica. En el cátodo se empleó dos soluciones: sulfato férrico o sulfato de cobre pentahidratado, independiente en celdas separadas. El objetivo fue evaluar los cambios químicos en una celda microbiana generadora de electricidad a partir de tiosulfato. Para esto se estandarizaron técnicas analíticas cuantitativas para tiosulfatos, sulfatos, sulfitos, azufre elemental, cobre (II), hierro (II) y hierro total. Adicional a esto se estandarizaron las técnicas en medio tiosulfato con bacterias y control. Los resultados cualitativos y cuantitativos en la cámara anódica revelaron que tanto en la CCM 1, CCM 2, CCM 3 y sus respectivos controles hubo presencia de iones sulfatos, azufre elemental; sin embargo, en la CCM 2 se generó 10.37 g/l de azufre elemental a diferencia de la CCC 2 (3.45 g/l). En la cámara catódica cuando se empleó solución férrica (CCM 1 y CCM 3) se determinó iones ferroso y férrico sin mostrarse diferencia alguna con respecto a sus controles. En cuanto a sulfatos se determinó que en la CCM 1 (4.28 g/l – etapa A y 2.69 g/l – etapa B) y CCM 2 (1.51 g/l) hubo una mínima variación de concentraciones con respecto a la CCC 1 (4.90 g/l – etapa A y 3.28 g/l – etapa B) y CCC 2 (1.74 g/l) lo cual nos podría indicar que el tiosulfato sigue una ruta oxidativa biológica, mientras que en el control se daría mediante reacciones espontáneas de oxidación. La adición de iones ferroso en la cámara anódica de la CCM 3 generó 96.48 mJ de energía y mostró una alta eficiencia coulombica 66.87% a comparación de la CCM 1 y CCM 2. La cronoamperometría realizada al medio tiosulfato y solución férrica en la CE con bacterias permitió inferir la presencia de microorganismos con capacidad de generar electricidad evidenciándose en las gráficas amperaje & tiempo con respecto a un control.

**Palabras claves:** Celdas de combustible microbianas, Bacterias acidófilas, Bioelectricidad, Tiosulfato.

## ABSTRACT

The present research work is oriented to the use of microbial fuel cells with inorganic substrate, sodium thiosulfate medium, at pH 3.5 and anaerobic conditions using acidophilic strains of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans* at the anode as a catalyst for the production of electrical energy. In the cathode, two solutions were used: ferric sulfate or copper (II) sulfate pentahydrate, independent in separate cells. The objective was to evaluate the chemical changes in a microbial cell generating electricity from thiosulfate. For this, quantitative analytical techniques were standardized for thiosulfates, sulfates, sulphites, elemental sulfur, copper (II), iron (II) and total iron. In addition, techniques in thiosulfate medium with bacteria and control were standardized. The qualitative and quantitative results in the anodic chamber revealed that both in the CCM 1, CCM 2, CCM 3 and their respective controls there was presence of sulfate ions, elemental sulfur; however, in CCM 2, 10.37 g/l of elemental sulfur was generated, unlike CCC 2 (3.45 g/l). In the cathode chamber when ferric solution was used (CCM 1 and CCM 3) ferrous and ferric ions were determined without showing any difference with respect to their controls. Regarding sulfates, it was determined that in the CCM 1 (4.28 g/l - stage A and 2.69 g/l - stage B) and CCM 2 (1.51 g/l) there was a minimum variation of concentrations with respect to the CCC 1 (4.90 g/l - stage A and 3.28 g/l - stage B) and CCC 2 (1.74 g/l) which could indicate that the thiosulfate follows a biological oxidative route, while in the control it would occur through spontaneous reactions of oxidation. The addition of ferrous ions in the anodic chamber of the CCM 3 generated 96.48 mJ of energy per bacteria and showed a high coulombic efficiency 66.87% compared to the CCM 1 and CCM 2. The chronoamperometry performed on the thiosulfate medium and ferric solution in the EC with bacteria allowed inferring the presence of microorganisms capable of generating electricity evidencing in the amperage and time graphs with respect to a control.

**Keywords:** microbial fuel cells, acidophilic bacteria, bioelectricity, thiosulfate.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, nuestro ecosistema se ha visto afectado por las serias consecuencias causadas por la contaminación ambiental. Se ha detectado una problemática de gran impacto mundial como el consumo de energía a partir de recursos fósiles generando altas concentraciones de dióxido de carbono en la Tierra, y una problemática en nuestro país por la explotación de minerales sulfurados originando los drenajes ácidos de mina. Éstos drenajes son el resultado de la oxidación química y biológica de microorganismos adaptados en condiciones ácidas y temperaturas moderadas que en contacto con el oxígeno del aire generan ácido sulfúrico, además de presentar un pH muy bajo, lo que permite la presencia de metales disueltos como selenio (Se), molibdeno (Mo), aluminio (Al), magnesio (Mn), zinc (Zn), arsénico (As), cromo (Cr), vanadio (V), cobre (Cu) y hierro (Fe), así como otras especies solubles entre estas sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Montero y Martínez, 2014). La reacción es llevada a cabo por microorganismos que oxidan a los compuestos inorgánicos reducidos de azufre y sobre todo acondicionadas a pH ácidos conocidos como bacterias acidófilas. Éstas se caracterizan por ser quimiolitótrofas de azufre debido a que generan energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre tales como tiosulfato (Espinosa *et al.*, 2010). Habitan en ambientes extremadamente ácidos y son los causantes del problema medioambiental del drenaje ácido de minas.

Bajo este contexto es importante investigar y plantear alternativas innovadoras para resolver los problemas de contaminación por drenajes ácidos de mina, aprovechando la biomasa existente en esas condiciones y los diversos sustratos presentes haciendo énfasis en el tiosulfato como contribuyente de los efluentes ácidos de mina y así producir energía limpia.

Una solución a esta problemática son los sistemas bioelectroquímicos (SBE) que desde los últimos 10 años han llamado la atención de los investigadores puesto que son tecnologías modernas con múltiples aplicaciones, principalmente de convertir la energía química de residuos orgánicos e inorgánicos en electricidad o producir hidrógeno u otros productos químicos empleando microorganismos como catalizadores con esto nos referimos a las

celdas de combustible microbiana (CCM) o celda de electrólisis microbiana (CEM) respectivamente (Logan, 2006; Pant, 2012; Wang, 2013).

Es necesario hacer una comparación de estos dos tipos más estudiados de SBE clasificados por el modo de operación y aplicación.

Las CCM son dispositivos que producen energía eléctrica resultado de la óxido – reducción originado por la catálisis oxidativa microbiana de un sustrato (combustible) en el ánodo y la reducción de protones hidrógeno, electrones y oxígeno hasta la formación de agua u otro aceptor de electrones en el cátodo (Aguilar – González *et al.*, 2016).

Consiste, al igual que todos los SBE, de un ánodo y un cátodo que están unidos a través de un cable externo que cierra el circuito eléctrico. Los electrodos pueden estar en una o dos cámaras separadas por una membrana de intercambio de protones (Aguilar – González *et al.*, 2016; Bond y Lovley, 2003).

En la cámara anódica los microorganismos crecen y oxidan la materia orgánica o inorgánica en condiciones anaeróbicas y producto de su catálisis transfieren los electrones hacia el ánodo ya sea de manera directa o indirecta (Romero *et al.*, 2012) así también liberan protones y CO<sub>2</sub> al medio. Los electrones viajan a través del circuito externo y son captados por un aceptor de electrones en el cátodo lo que crea un flujo de corriente eléctrica. Simultáneamente los protones producidos en la cámara anódica atraviesan la membrana de intercambio de protones llegando a la cámara catódica lo cual reducen el oxígeno para generar agua. Cabe recalcar que la generación de corriente eléctrica es producida cuando el oxígeno u otras especies aceptoras como nitratos o sulfatos, están presentes, caso contrario, la generación de corriente no es espontánea (Pant *et al.*, 2012). Aquel microorganismo con la capacidad de producir energía eléctrica y transferir los electrones fuera de célula se denomina exoelectrógeno (Logan y Regan, 2006b).

En contraste con la CCM, la CEM requiere suministro de energía eléctrica para generar productos químicos principalmente inorgánicos como el hidrógeno, peróxido de hidrógeno, hidróxido de sodio, entre otros (Logan, 2008).

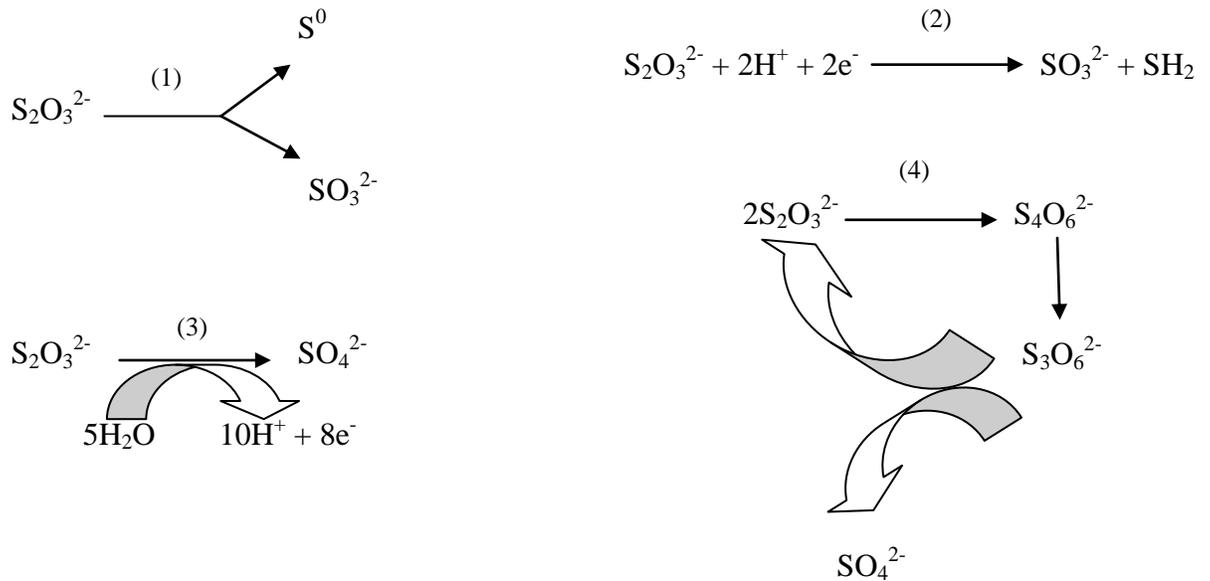
De manera similar a cualquier SBE consiste en dos electrodos: un ánodo y un cátodo, un circuito externo donde fluyen los electrones hasta el cátodo. En la cámara anódica, los electrones generados por la oxidación del sustrato presente son producto del suministro de una cantidad de energía externa y la generada por las bacterias ya que el proceso no es espontáneo.

Una característica común de ambos tipos de SBE es la ausencia del microorganismo en el cátodo (Aguilar – González, 2016).

Una de las ventajas más sobresaliente de las CCM a comparación con la CEM es la producción de energía eléctrica empleando sustratos que pueden ser tóxicos para el medio ambiente y aprovechar los microorganismos existentes, de las cuales sólo se tiene investigado no más del 10%.

En trabajos de investigación de Saavedra (2012) y Koivuniemi (2016) han empleado azufre y tetrionato respectivamente como sustratos en una CCM; sin embargo, poca información se conoce al uso del tiosulfato como combustible haciendo uso de esta tecnología. En este trabajo emplearemos al ion tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) como sustrato en una Celda de Combustible Microbiana.

De acuerdo a la información bioquímica, fisiológica y los recientes datos genómicos disponibles se han postulado al menos cuatro posibles vías para la oxidación del tiosulfato. En la primera vía (1) el tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) sería oxidado hasta azufre elemental ( $S^0$ ) y anión sulfito ( $SO_3^{2-}$ ); en la segunda (2), hasta anión sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) y ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) pasando por tetrionato o disulfano ( $S_4O_6^{2-}$ ) como componente intermediario, en la tercera vía (3) el tiosulfato será hidrolizado hasta dos moléculas de sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), y finalmente en la cuarta vía (4) el tiosulfato será oxidado hasta sulfato que previamente pasará por tetrionato como componente intermediario (Arias *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Cuatro posibles vías de oxidación del anión tiosulfato. Fuente: modificado de Arias *et al.*, 2015.

Entre los microorganismos más estudiados e incorporados en una CCM se tiene a los siguientes géneros de bacterias: *Geobacter* (Huitzil, 2010; Malvankar & Lovley 2012), *Shewanella* (Rahimnejad *et al.*, 2012), *Pseudomonas* (Cornejo, 2017), así también el empleo de arqueas y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Rahimnejad *et al.*, 2012), pero hay un género mejor acondicionado a medios extremadamente ácidos como los acidófilos. De acuerdo a Dopson *et al.* (2016) se caracterizan como acidófilos porque tienen un crecimiento óptimo por debajo y/o igual a pH 5. Algunos acidófilos captan ion ferroso, azufre, compuestos inorgánicos reducidos de azufre y carbono orgánico como parte de su metabolismo celular, así como para realizar las funciones principales, y además toleran altas concentraciones de metales (Koivuniemi, 2016).

La bacteria extremófila más estudiada para la oxidación biológica de minerales de azufre metálico, *Acidithiobacillus ferroxidans*. Es un quimiolitotrofo obligado, aerobio y Gram negativo en forma de bastón. Emplea ion ferroso y una diversidad de compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (Pronk *et al.*, 1990).

En este trabajo se enfatizará en el uso del sustrato, representado por un compuesto inorgánico reducido de azufre, a través del microorganismo acidófilo específico para degradar el combustible y producir electricidad ya que se busca evaluar los cambios químicos del tiosulfato incorporado a una CCM.

## **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad se ha elevado el índice de contaminación por sustancias de desechos vertidos a los estanques de agua, ríos, lagos, arroyos y mantos acuíferos; así también el uso excesivo de petróleo y sus derivados como fuentes de generación de energía eléctrica ya que causan el deterioro medioambiental.

En particular, los drenajes ácidos de antiguos yacimientos de carbón y minería metálica son una de las principales fuentes de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas en el mundo. Éstos drenajes de mina son tóxicos en diversos aspectos para la vida del hombre, la fauna y la flora, puesto que, contienen metales disueltos y constituyentes orgánicos solubles e insolubles, que generalmente proceden de labores mineras, procesos de concentración de minerales, presas de residuos y escombreras de mina (Aduvire, 2006). Los drenajes ácidos son generados por la explotación de minerales sulfurados o el mismo azufre (S) en contacto con el oxígeno atmosférico, agua y bacterias producen ácido sulfúrico siendo propicio la solubilidad a metales pesados como el cobre, plomo, arsénico, hierro, entre otros a pH bajos (Chaparro, 2015).

Como en la mayoría de países, no todas las minas en el Perú producen ácido. Existen tres factores principales que tienden a contribuir a la generación de aguas ácidas y a la calidad del drenaje de las minas en el Perú:

- La compleja configuración geológica, principalmente un material o roca de explotación minera;
- La variada mineralogía con potencial para contribuir con diferentes contaminantes en el tiempo, y en diferentes lugares;

- La asociación del mineral con la pirita como el principal mineral sulfurado.

Los componentes principales para la generación del drenaje ácido de mina son:

- Minerales sulfurosos reactivos;
- Agua o atmósfera húmeda; y
- Un oxidante, especialmente oxígeno o fuentes químicas.

La velocidad y la magnitud con que se generan estos drenajes ácidos de mina son afectadas por factores secundarios:

- Bacterias (*Thiobacillus ferroxidans*)
- pH óptimo: 2.5
- Temperatura óptima de crecimiento: 30 – 35 °C



**Figura 2.** Drenaje ácido de mina. Mina Santa Cecilia, Puno - Perú. Color rojizo por la formación de hierro y ácido sulfúrico. Fuente: Guerrero, 2012.



**Figura 3.** Drenajes ácidos expuestos con aguas superficiales. Fuente: Guerreo, 2012.



**Figura 4.** Los drenajes ácidos de mina de la Faja Pirítica Ibérica presentan una elevada acidez y altas concentraciones metálicas. Fuente: Horizonte Minero.

El Perú cuenta con aproximadamente 180 minas operativas de las cuales se clasifican en grande, mediana y pequeña minería. El MINEM informa que un total de 25 a 30 minas presentan esta problemática del drenaje ácido; y es probable que existan otras concesiones que actualmente generen ácido, pero no estén registradas por lo que no se posee información al respecto.

Según información del MINEM en la Guía Ambiental para el Manejo de Drenaje de Ácidos de Minas en el Perú no existía hasta el 2006 el tratamiento del drenaje ácido, a excepción de una compañía de mediana minería. Estos drenajes ácido de mina (DAM) o roca (DAR) terminan en aguas naturales, lagos o ríos perjudicando el ecosistema (Aduvire, 2006).

Usualmente el tratamiento de estos drenajes ácidos de mina se divide en dos grupos: activos y pasivos. El tratamiento activo requiere supervisión constante del sistema, uso de electricidad, insumos químicos, remoción de subproductos, entre otros. Mientras que el tratamiento pasivo es una de las herramientas más atractivas por la industria minera, sobre

todo en la fase de abandono y desmonte ya que hay mínima intervención humana, rara vez se requiere manejo de subproductos. No es necesario el uso de reactivos químicos ni de electricidad. Estos tratamientos implican altos costos y poco viables para países en vías de desarrollo (Chaparro, 2015).

Otra de la problemática es el uso de combustible fósil – carbón, gas y petróleo – como materia prima indispensable para la producción de energía eléctrica.

Según el MINEM, en la información publicada dentro del Plan Energético Nacional 2014 – 2025 estima que el uso de los combustibles fósiles será indispensable como consumo final de energía durante ese periodo.

Por otro lado, los investigadores Chu & Majumdar (2012) publicaron un artículo titulado Opportunities and challenges for a sustainable energy future donde analiza la problemática energética mundial y plantea soluciones ante esta problemática mundial.

Bajo este contexto, es necesario hacer uso de biotecnologías que permitan la incorporación de los drenajes ácidos de mina como fuente de energía.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Ante la Problemática planteada en 1.1, este proyecto trata de desarrollar la producción de energía eléctrica haciendo uso de tiosulfato catalizado por bacterias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El diseño y empleo de una celda de combustible microbiana a nivel de laboratorio generadora de electricidad a partir del ion tiosulfato ya que es uno de los contribuyentes del drenaje ácido de mina. Esta producción de energía contribuiría de una forma sostenible y amigable con el medio ambiente.

La celda de combustible microbiana (CCM) forma parte de los sistemas bioelectroquímicos (SBE), que puede convertir la energía química de un sustrato orgánico o inorgánico en energía eléctrica a través de reacciones óxido reducción. Esta biotecnología puede emplear diversos sustratos solubles e insolubles presentes en aguas residuales, drenajes ácidos de

mina, aguas domésticas, aguas residuales industriales, pero todavía está en etapa de investigación (Logan, 2006; Farias *et al.*, 2015-2016).

A manera de comparación existen otras tecnologías como fuentes de energía eléctrica entre ellas las convencionales y no convencionales. Mencionando a las fuentes de energía convencionales tenemos a la energía hidráulica, nuclear y térmica no renovable. Como fuente de energía no convencional a la Energía eólica, energía solar fotovoltaica y energía geotérmica. Las fuentes convencionales de energía son las más usadas a nivel mundial por tener buena eficiencia, pero recientemente han dejado de ser viables por el agotamiento de materia prima, costos, espacio para infraestructura y la alteración en el medio ambiente. En contraste, las fuentes no convencionales de energía tienen menor participación en la generación de energía eléctrica a nivel mundial, debido a que es poco eficiente al transformar la fuente primaria de energía eléctrica, costos elevados de extracción y producción, no tiene mucho avance tecnológico por la falta de investigación y la energía útil que se puede aprovechar es limitada (Pronk *et al.*, 1990).

Entre las ventajas de la energía por bacterias encontramos que operan eficientemente a temperatura ambiente o temperaturas bajas, siendo la fuente principal de energía los desechos orgánicos o inorgánicos que probablemente alteren el medio ambiente. Otro de los beneficios de esta energía es que no necesitan mantenimiento por lo que pueden funcionar por varios años (Romero *et al.*, 2012).

### **1.3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

La importancia del estudio radica fundamentalmente en el impacto social y ambiental en la producción de energía empleando la energía a través de bacterias, ya que podemos aprovechar como materia prima aguas ácidas de mina y la biomasa presente en esas condiciones teniendo en cuenta que el trabajo presentado es una prueba a nivel de laboratorio.

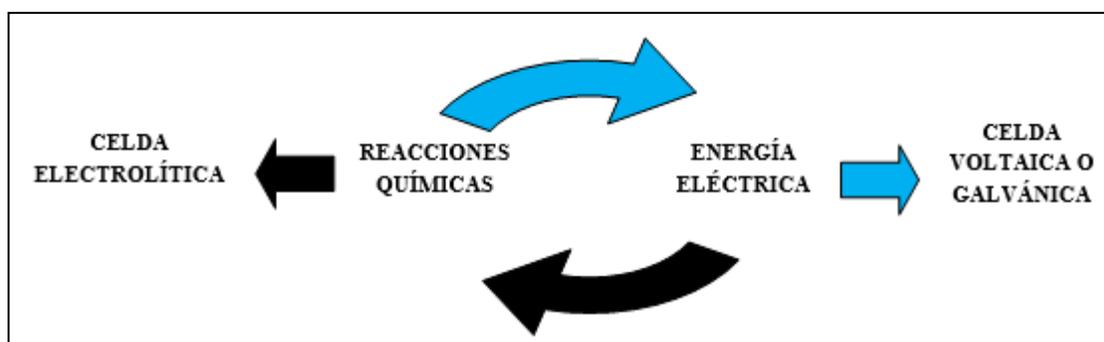
En lo que respecta al impacto ambiental, la fuente primaria de materia es inagotable ya que podemos hacer uso no sólo de combustibles orgánicos sino también de materia inorgánica

además que contribuyen a la biorremediación de ríos y otras fuentes de agua. Contribuye a la fijación de dióxido de carbono lo que permite disminuir el efecto invernadero (Pronk *et al.*, 1990).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. CELDAS ELECTROQUÍMICAS

Se define celdas electroquímicas de corriente continua a los dispositivos donde se generan reacciones químicas a partir del suministro de energía eléctrica o bien se produce corriente eléctrica a partir de reacciones óxido – reducción (Figura 5). Estos dispositivos se clasifican en dos tipos de celdas: electrolíticas y voltaicas o galvánicas.

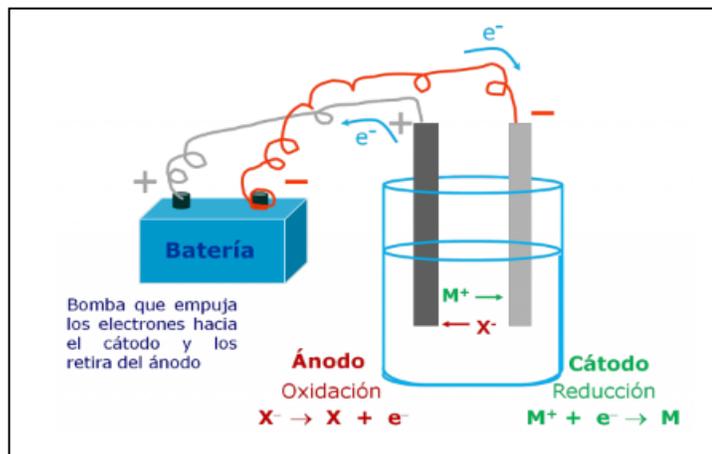


**Figura 5.** Esquema de conversión de energía eléctrica en energía química y viceversa.

#### 2.1.1. Celdas electrolíticas

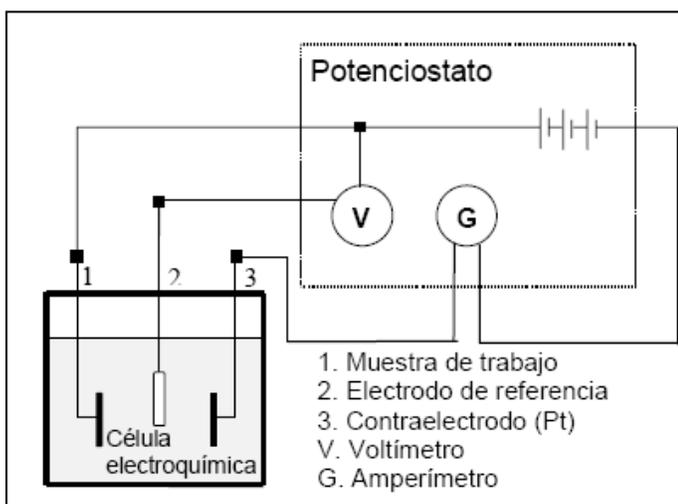
En una celda electrolítica se suministra energía eléctrica para dar origen a las reacciones químicas no espontáneas (favorecen la formación de reactivos). Se compone de una sola cámara o recipiente donde se introduce el material químico con dos electrodos conectados a una fuente de corriente continua. En general, se emplean electrodos inertes que no participan en el proceso químico. El cátodo es el electrodo negativo donde viajan los iones con carga positiva y ocurre la reducción. Los iones de carga negativa se dirigen al ánodo que es el electrodo positivo y ocurre la oxidación. Los electrones generados en el ánodo viajan a través del conducto externo hacia el cátodo. La

electrólisis es el proceso químico que acontecen en las celdas electrolíticas (Figura 6) (Whitten *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Esquema de una celda electrolítica. Fuente: Cedrón *et al.*, 2011.

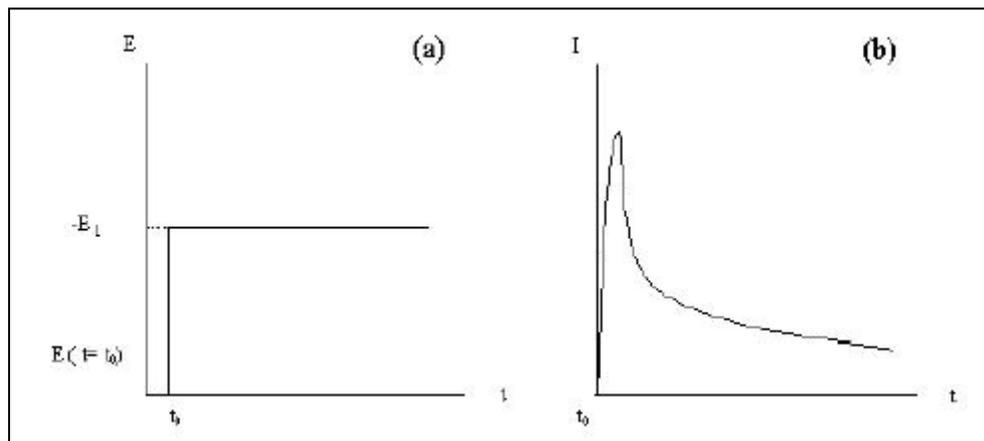
Una variante a esta celda electrolítica es la llamada celda para análisis electroquímico la cual se emplea para estudiar las propiedades eléctricas de una solución empleando técnicas electroquímicas como la voltamperometría, cronoamperometría, entre otras. Esta celda presenta 3 electrodos: trabajo o indicador, referencia y contraelectrodo o auxiliar las cuales están conectados a un potencióstato (Gómez *et al.*, 2002).



**Figura 7.** Componentes de una celda electrolítica para análisis electroquímico (Camargo *et al.*, 2009).

### 2.1.1.1. Técnica electroquímica: Cronoamperometría

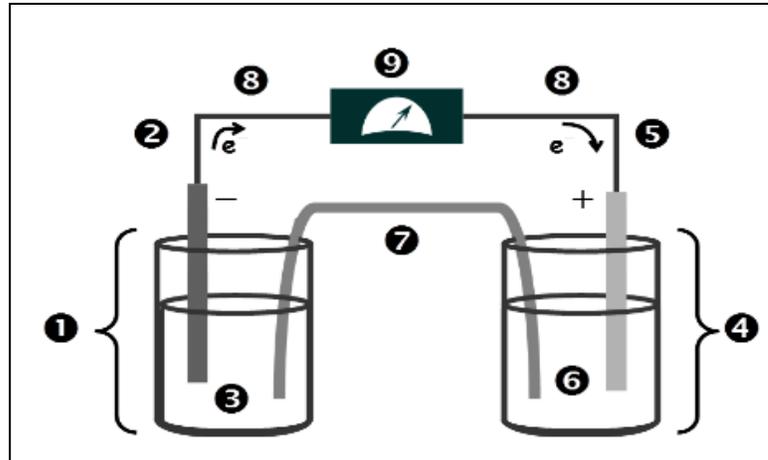
La cronoamperometría se agrupa dentro de las técnicas potencioestáticas la cual aplica un pulso de potencial constante en un intervalo de tiempo. La señal emitida registra el cambio de la corriente en función al tiempo (Martínez, 2006).



**Gráfico 1.** (a) Esquema del pulso en potencial aplicado a la interfase de la solución durante un tiempo  $t$ . (b) Respuesta obtenida en el cambio de corriente en función al tiempo ( $t$ ) Fuente: Martínez, 2006.

### 2.1.2. Celdas voltaicas o galvánicas

A diferencia de las celdas electrolíticas, las celdas galvánicas producen energía eléctrica a partir de las reacciones de oxidación – reducción espontánea (favorecen la formación de productos). Consta de dos cámaras o recipientes donde el ánodo y el cátodo se encuentran separados y la transferencia de electrones se da a través de un circuito externo que unen ambos electrodos-. Las soluciones anódicas y catódicas se unen mediante un puente salino el cual tiene tres funciones principales: permitir el contacto entre las soluciones del ánodo y cátodo, evitar la mezcla de ambas cámaras, y mantener la neutralidad de las cargas de cada cámara (Whitten *et al.*, 2008).



**Leyenda:**

- |                      |                       |                     |
|----------------------|-----------------------|---------------------|
| 1: Cámara anódica    | 4: Cámara catódica    | 7: Puente salino    |
| 2: Electrodo anódico | 5: Electrodo catódico | 8: Conducto externo |
| 3: Solución anódica  | 6: Solución catódica  | 9: Voltímetro       |

**Figura 8.** Componentes de una celda galvánica. Fuente: Cedrón *et al.*, 2011.

## 2.2. SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS (SBE)

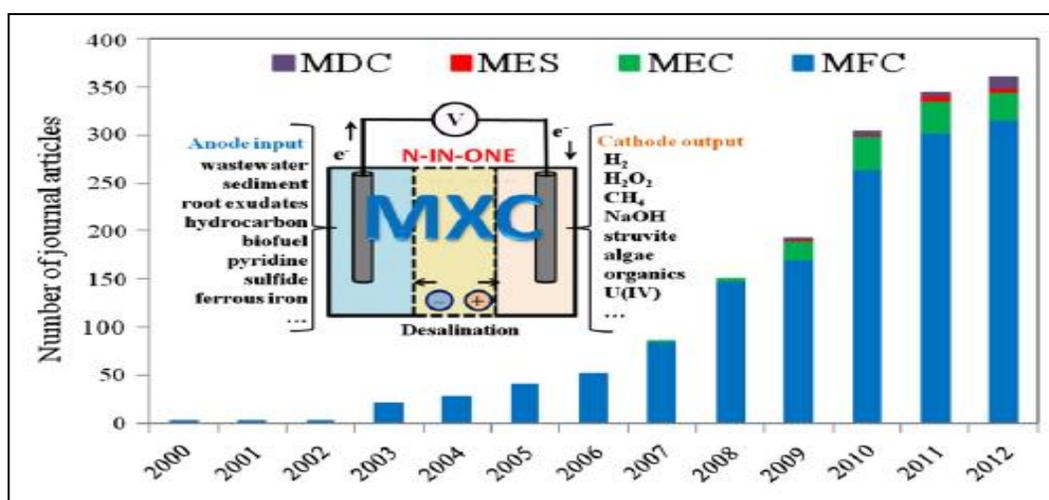
Desde los primeros experimentos realizados con microorganismos capaces de producir electricidad e incorporados en una celda de combustible microbiana (Berck y Canfield, 1964) surgió el interés por investigar la diversidad de sustratos simples (Cheng y Logan, 2007) o complejos como combustibles (Pant *et al.*, 2010) y microorganismos que se encuentran en forma natural y abundante, tales como lodos anaeróbicos provenientes de aguas residuales de curtiduría (Katuri *et al.*, 2012), aguas residuales municipales (Zhang *et al.*, 2013b), aguas residuales mineras (Angelov *et al.*, 2013), material de desecho de rellenos sanitarios, sedimentos de ríos o sedimentos marinos, entre otras fuentes (Fuentes – Albarrán *et al.*, 2012), lo que permitió el desarrollo de los sistemas bioelectroquímicos (SBE) (Tremblay y Zhang, 2015).

Los SBE se pueden definir como una tecnología moderna con diversas aplicaciones en el campo de la bioelectroquímica, como la producción energía eléctrica, el tratamiento

de aguas residuales y la síntesis de productos químicos de alto valor (Farias *et al*, 2016) todo ello gracias a la catálisis de sistemas biológicos (microorganismos o enzimas) con capacidad oxidativa de un sustrato en el ánodo y una reducción en el cátodo (El Mekawy *et al*, 2015; Farias, 2016).

### 2.2.1. Tipos de sistemas bioelectroquímicos (SBE)

De acuerdo al empleo del biocatalizador, los SBE se pueden clasificar en dos grandes grupos: celdas de combustible microbiana (CCM) y celda de combustible enzimática (CCE) (Pant, 2012). De acuerdo al modo de aplicación, esto es, el uso de esta corriente eléctrica producida los SBE se pueden subdividir en: CCM (generación directa de energía), celda de electrólisis microbiana (CEM) o electrosíntesis microbiana (ESM) (producción química), celda de desanilización microbiana (CDM) (desalinización del agua) y celdas solares microbianas (CSM) (producción de electricidad o productos químicos) (Pant *et al*, 2012, Wang y Ren, 2013).



**Gráfico 2.** Número de artículos publicados sobre sistemas bioelectroquímicos que contienen las frases “microbial fuel cell” (MFC), “microbial electrolysis cell” (MEC), “microbial electrosynthesis” (MES) or “microbial desalination cell” (MDC). Fuente: Wang, 2013.

Según los reportes investigados en el Gráfico 2, de los 4 tipos de SBE se tienen mayor conocimiento sobre las CCM; sin embargo, en países latinoamericanos el desarrollo de

ésta prometedora tecnología está en proceso de investigación y potenciar al máximo su aplicación.

### **2.3. ANTECEDENTES SOBRE CELDAS DE COMBUSTIBLE**

#### **MICROBIANA (CCM)**

A finales del siglo XVIII, el médico Luigi Galvani realizó los primeros experimentos sobre bioelectricidad. Él observó accidentalmente que al aplicar una corriente eléctrica sobre una rana disecada las patas se contraían, a este fenómeno eléctrico lo llamó “electricidad animal” (Galicia, 2016; Villar *et al.*, 2014).

Otro experimento importante la denominada pila de Volta, precursor de la batería fue realizado por Alessandro Volta. Este hallazgo fue importante para la historia de la ciencia puesto que se produjo flujo estable de electricidad. La pila estuvo compuesta con discos de plata y zinc, colocados de forma alterna y separados por discos de cartón embebidos en salmuera (Saavedra, 2012).

En 1911, Michael Cresse Potter profesor de botánica de la Universidad de Durham publicó en la revista Proceedings de la Royal Society un artículo denominado: “Efectos eléctricos que acompañan a la descomposición de compuestos orgánicos” (Galicia, 2016; Potter, 1911). Fue uno de los primeros experimentos sobre producir electricidad a partir de *Escherichia coli* usando electrodos de platino (Del Campo, 2015; Potter, 1911). Sin embargo, hasta ese momento la capacidad microbiana no se incorporó en un diseño de celda de combustible microbiana (Farias, 2016) y tampoco tomó mucho interés porque la diferencia de potencial generado era de magnitud pequeña (Del Campo, 2015).

En 1931, Barnet Cohen, a partir de los experimentos realizados por Potter, desarrollo una serie de celdas medias microbianas (sólo cámara anódica), que conectadas en serie eran capaces de producir más de 35 V de potencial, pero una corriente de 2 mA (Cohen, 1931; Galicia, 2016).

Entre los años 1950 y 1960, tiempos en la que se desarrollaba el primer proyecto de una celda de combustible de hidrógeno, la NASA presentó un proyecto patrocinado por Los Estados Unidos. Este trabajo consistió en transformar los desechos orgánicos en electricidad para su utilización en viajes de larga duración (Galicía, 2016; Suzuki, 1976).

Posteriormente, en 1962 los investigadores Davis y Yarborough adicionaron *Escherichia coli* en una celda de combustible microbiana usando glucosa como sustrato, esto generó pequeñas cantidades de corriente. Sin embargo, con la adición de azul de metileno a dicho sistema se obtuvieron elevadas corrientes. Esto se explica por la ineficiencia de la transferencia directa de electrones desde los microorganismos al electrodo, mientras que la presencia de un mediador, como el azul de metileno, contribuye a la generación de una eficiencia mucho mayor en la celda (Allen y Bennetto, 1993; Del Campo, 2015).

Recién en la década de 1970, S. Suzuki dio a conocer el primer prototipo de una celda de combustible microbiana semejante al de la actualidad; sin embargo, poco se conoce del trabajo que realizó. Aunque a finales de la década de 1970 se realizó el primer modelo computacional de la celda de combustible biológico (Di Salvo *et al.*, 1979a; Di Salvo *et al.*, 1979a).

Durante los años de 1980, la idea planteada por S. Suzuki fue retomada y estudiada al detalle por MJ Allen, y más tarde por H. Peter Bennetto ambos pertenecientes del King's College London, hubo un interés significativo en el uso de las celdas de combustible como un posible recurso para la producción de electricidad en países de desarrollo (Allen y Bennetto, 1993; Galicía, 2016).

Otro hecho importante en esa década fue que se comenzó a conceptualizar el término microorganismos como catalizadores en celdas de combustible microbiológicas (Roller *et al.*, 1938).

Con las posteriores investigaciones de Habermann y Pommer, se dio a conocer que la celda de combustible microbiana (CCM) podría utilizarse para tratar agua residual

doméstica (Habermann, 1991). Hace algunos años, se llevó a cabo estudios que han demostrado la posibilidad de producir electricidad en paralelo que se logra el tratamiento de aguas residuales (Rodrigo et al, 2007). Así también, se han realizado estudios del diseño de una celda de combustible microbiana y las variables que afectan la eficiencia de estos actualmente conocidos como sistemas bioelectroquímicos (Farias, 2016).

Por otro lado, el interés por el uso de microorganismos con capacidad de producir electricidad y remoción de desechos o compuestos es cada vez más estudiada en la actualidad (Tremblay y Zhang, 2015).

### **2.3.1. Definición**

Las Celdas de Combustible Microbianas (CCM) conocida también por sus siglas en inglés MFC (Microbial Fuel Cell) son consideradas un tipo de sistema bioelectroquímico capaz de transformar la energía química de un sustrato orgánico o inorgánico (Ni *et al.*, 2016), catalizado por ciertos microorganismos, en energía eléctrica (Logan, 2006).

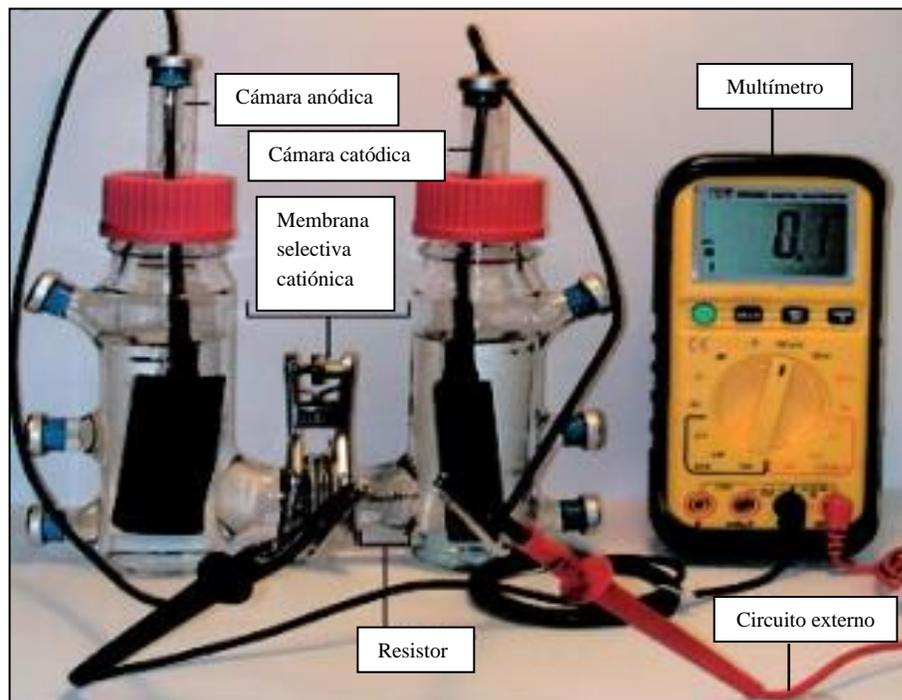
### **2.3.2. Funcionamiento de la Celda de Combustible Microbiana**

Los electrones liberados del metabolismo bacteriano son transportados hacia el ánodo a través de biofilm o nanocables “pili” (Romero *et al*, 2012), mediante microorganismos electrógenos (Bond y Lovely, 2003) o por ayuda mediadores químicos (Delaney *et al*, 1984). Estos electrones viajan a través de un circuito externo que conecta el ánodo con el cátodo, pasando por una resistencia que convierte a energía eléctrica (Romero *et al*, 2012). Los electrones que migran al cátodo son captados por un aceptor de electrones (normalmente oxígeno ya que es usual trabajar en condiciones aeróbicas) (Logan 2006).

### 2.3.3. Diseño de la Celda de Combustible Microbiana

#### 2.3.3.1. Configuración de dos cámaras de una CCM

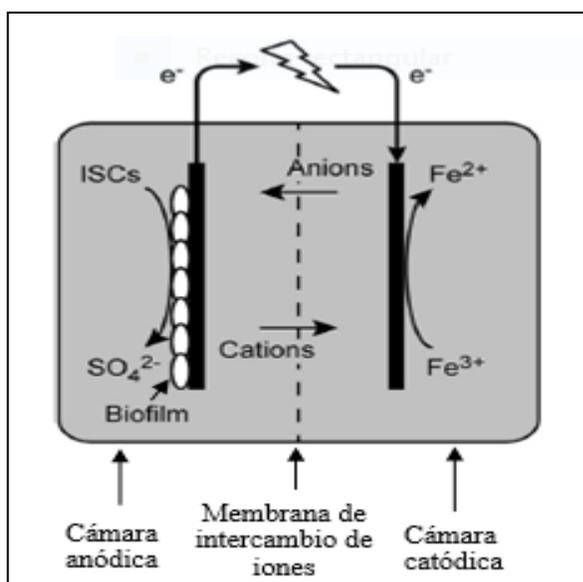
Generalmente, una CCM (Figura 9) está conformada por dos cámaras, una anódica y otra catódica separada por una membrana de intercambio de protones (MIP). Esta membrana es una película polimérica selectiva de Nafion<sup>®</sup> N° 117 (membrana perfluorada nafion) que permite el paso solo de iones hidrógeno del ánodo al cátodo y viceversa (Del Campo, 2015). En la cámara anódica los microorganismos en condiciones aerobias o anaerobias oxidan el sustrato y la cámara catódica puede contener agua o cualquier otro agente oxidante (García – Muñoz *et al*, 2011; Logan, 2006).



**Figura 9.** CCM con dos cámaras separadas por Membrana de Intercambio de Protones (MIP). Fuente: Modificada de Chaudhuri and Lovley, 2003.

A modo de ejemplo, en la Figura 10 se muestra el funcionamiento de una CCM empleando compuestos inorgánicos de azufre como combustible bacteriano, el cual a través de su metabolismo celular produce iones sulfato y libera electrones, los cuales

viajan a través del biofilm, generados por estos microorganismos, hasta el electrodo negativo. El ánodo está conectado con el cátodo mediante un circuito externo que contiene una resistencia y un multímetro en donde se lee el potencial de celda. Los electrones que llegan al cátodo reducen el ion férrico a ferroso. Simultáneamente los cationes en la cámara anódica y aniones en la cámara catódica atraviesan la membrana de intercambio de iones con el fin de neutralizar cargas (Li *et al.*, 2013b).



**Figura 10.** Funcionamiento de una CCM usando como sustrato: compuestos inorgánicos de azufre (ISCs – siglas en inglés) y cámara doble. Modificada a partir de Ni. G. *et al.*, 2016.

## 2.4. GENERACIÓN DE VOLTAJE

La conversión de energía química en energía eléctrica se da por un proceso termodinámico espontáneo, es decir, la energía libre de Gibbs es menor a cero ( $\Delta G$ ) expresada en Joules (J), como medida del trabajo máximo de la reacción en una CCM (Bard y Faulkner, 2001). Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln (Q) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$\Delta G_r$  (J): es la energía libre de Gibbs para las condiciones específicas

$\Delta G_r^0$  (J): es la energía libre de Gibbs en condiciones estándar: 298.15 K, 1 bar de presión y una concentración de 1 M para todas las especies

R (8.31447 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>): es la constante universal de los gases

T (K): es la temperatura absoluta

Q (sin unidades): es el cociente de la reacción calculada como las actividades de los productos divididas por las de los reactivos.

En casos de CCM es más conveniente evaluar la reacción en términos de la fuerza electromotriz total de la celda ( $E_{fem}$ ),  $E_{fem}$  (V), es el resultado de la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo.

Puesto que la energía libre de Gibbs está relacionada con el trabajo producido por la celda, tenemos:

$$W = E_{fem} \cdot q = - \Delta G_r \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $q = nF$  es la carga transferida en la reacción, expresada en Coulomb (C), que es determinado por el número de electrones transferidos en la reacción ( $n$ ) por cada mol de sustrato y  $F$  es la constante de Faraday (9.64853x10<sup>4</sup> C/mol). Entonces, se tiene la siguiente ecuación:

$$E_{fem} = - \frac{\Delta G_r}{nF} \quad \text{Ecuación 3}$$

Si todas las reacciones son evaluadas en condiciones estándar, de tal manera que  $Q = 1$ , entonces:

$$E_{fem}^0 = - \frac{\Delta G_r^0}{nF} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,  $E_{fem}^0$ : fuerza electromotriz estándar de la celda (V)

Empleando las ecuaciones anteriores se puede expresar la reacción global en términos de potenciales:

$$E_{fem} = E_{fem}^0 - \frac{RT \ln(Q)}{nF} \quad \text{Ecuación 5}$$

La ecuación 5 es conocida como la Ley de Nerst (Ortiz – Martínez, 2015).

Donde:

$E_{fem}^0$  = Potencial al equilibrio estándar de la semirreacción (V)

$E_{fem}$  = Potencial del electrodo (V)

R = Constante de los gases ideales ( $8.31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T = Temperatura (K)

n = Número de electrones intercambiados

F = Constante de Faraday (96,485 C/mol)

Q = Cociente de la concentración del compuesto en estado oxidado y la concentración en el estado reducido.

La fem de la celda se calcula como:

$$E_{fem} = E_{cat} - E_{an}$$

*Ecuación 6*

La ventaja de la *ecuación 6* es que es positiva para una reacción favorable y genera directamente un valor de fem para la reacción. Esta fem calculada proporciona un límite superior para el voltaje de celda, el potencial real derivado de una CCM será menor debido a varias pérdidas potenciales explicadas más adelante (Logan, 2006).

#### **2.4.1. Potenciales estándar de electrodo**

El tiosulfato como combustible de la CCM puede producir sulfitos, sulfatos, azufre elemental hasta tetrionato como intermediario de compuestos inorgánicos reducidos de azufre. En la Tabla 1 se muestra una lista de semirreacciones que podrían ocurrir en el ánodo (Suzuki, 1999; Hansford y Vargas, 2011; Saavedra, 2012).

**Tabla 1.** Potenciales redox estándar de compuestos inorgánicos reducidos de azufre en solución acuosa.  
Fuente: Zhdanov, 1975.

Semirreacciones	E° (V vs ENH)
$\text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 10\text{e}^- = \text{H}_2\text{S}_{(\text{ac})} + 4\text{H}_2\text{O}$	0.304
$\text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- = \text{S}^\circ + 4\text{H}_2\text{O}$	0.357
$\text{SO}_3^{2-} + 6\text{H}^+ + 4\text{e}^- = \text{S}^\circ + 3\text{H}_2\text{O}$	0.449
$\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	0.17
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 6\text{H}^+ + 4\text{e}^- = 2\text{S}^\circ + 3\text{H}_2\text{O}$	0.465
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 12\text{H}^+ + 10\text{e}^- = 4\text{S}^\circ + 6\text{H}_2\text{O}$	0.416
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2\text{e}^- = \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0.219; 0.08; -0.10

V: Voltaje (Voltios), ENH: Electrodo Normal de Hidrógeno (Electrodo estándar de hidrógeno), vs: versus

En la Tabla 2 se muestra una comparación de semirreacciones y potenciales teóricos de electrodo a condiciones típicas de una CCM de sustrato inorgánico y sustrato orgánico.

**Tabla 2.** Potencial redox estándar y teórico para reacciones y condiciones para CCM a 25°C. Fuente:  
Modificado de Logan, 2008.

E	Semirreacciones	E° (V vs ENH)	Condiciones	E° (V vs ENH)
Á N O D O	$\text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- = \text{S}^\circ + 4\text{H}_2\text{O}$	0.357	$[\text{SO}_4^{2-}] = 10\text{Mm}$ ; pH = 1.6	0.211
	$2\text{HCO}_3^- + 9\text{H}^+ + 8\text{e}^- = \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	0.187	$[\text{HCO}_3^-] = 5\text{mM}$ , $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 5\text{mM}$ pH = 7	-0.300
	$6\text{CO}_2 + 24\text{H}^+ + 4\text{e}^- = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O}$	0.0014	pH = 7	-0.428
C	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- = 2\text{H}_2\text{O}$	1.229	pO <sub>2</sub> = 0.2, pH = 7	0.805
Á	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- = 2\text{H}_2\text{O}$	1.229	pO <sub>2</sub> = 0.2, pH = 2.3	1.083
T	$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 4\text{e}^- = \text{H}_2\text{O}_2$	0.695	pO <sub>2</sub> = 0.2, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5\text{mM}$ ; pH = 7	0.370
O	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} + \text{e}^- = \text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$	0.361	$[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}] = [\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}]$	0.361
D	$\text{MnO}_{2(\text{s})} + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	1.29	$[\text{Mn}^{2+}] = 5\text{mM}$ ; pH = 7	0.470
O	$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- = \text{Fe}^{2+}$	0.77	$[\text{Fe}^{3+}] = [\text{Fe}^{2+}]$ ; pH ácido	0.77

E: Electrodo, V: Voltaje (Voltios), ENH: Electrodo Normal de Hidrógeno (Electrodo estándar de hidrógeno), vs: versus

Tomando como ejemplo las siguientes semirreacciones:



El potencial al equilibrio del ánodo por la oxidación del sulfito es:

$$E_{\text{an}} = E_{\text{an}}^0 - (RT/2F) \ln ([\text{SO}_4^-][\text{H}^+]^2 / [\text{SO}_3^-]) \quad \text{Ecuación 7}$$

El potencial al equilibrio del cátodo por la reducción del ion férrico es:

$$E_{\text{cat}} = E_{\text{cat}}^0 - (RT/F) \ln([\text{Fe}^{2+}]/[\text{Fe}^{3+}]) \quad \text{Ecuación 8}$$

#### 2.4.2. Factores que disminuyen el voltaje

Teóricamente para desarrollar una CCM debería tener un voltaje máximo (fem) 1.1V. Sin embargo, la medida del voltaje de una CCM es relativamente baja, esto debido a una serie de pérdidas de voltaje entre ellas mencionamos a las pérdidas óhmicas, pérdidas de activación, pérdidas metabólicas bacterianas y pérdidas de concentración.

- **Pérdidas óhmicas** o llamadas también polarización óhmica en una CCM abarca tanto a la resistencia al flujo de electrones a través de los electrodos y las interconexiones, así como a la resistencia al flujo de iones a través de la membrana de intercambio de protones y a los electrolitos anódicos y catódicos (Laminie y Dicks, 2000; Hoogers, 2003). Las pérdidas óhmicas se pueden reducir por medio de disminución de la distancia entre los electrodos, usando una membrana con una resistividad baja comprobando todos los contactos, y si es práctico incrementar la conductividad de la solución máxima tolerada por las bacterias (Logan, 2006).
- **Pérdidas de activación** o también conocidas como polarización de activación se manifiesta durante la transferencia de electrones desde o hacia el compuesto que reacciona en la superficie del electrodo. Este compuesto puede estar

presente sobre la superficie del electrodo, como mediador de electrones en la solución o como aceptor final de electrones en el cátodo. A menudo las pérdidas de activación muestran un fuerte incremento en corrientes bajas y un aumento constante paralelo incrementa la densidad de corriente. Es posible obtener bajas pérdidas de activación mediante el aumento de la superficie del electrodo, mejorando la catálisis de los electrodos e incrementando la temperatura de operación y mediante el establecimiento de una biopelícula (biofilm) enriquecida en el electrodo (u electrodos) (Logan, 2006).

- **Pérdidas metabólicas bacterianas.** Para generar energía metabólica, la bacteria transporta electrones de un sustrato a un potencial bajo a través de la cadena transportadora de electrones hacia u aceptor de electrones (oxígeno o nitrato) a un potencial más alto. En una CCM, el ánodo es el aceptor final de electrones y su potencial determina la ganancia de energía para las bacterias. Cuanto mayor sea la diferencia de potencial redox y el potencial del ánodo, será posible una mayor ganancia de energía metabólica en las bacterias, pero será menor el máximo voltaje realizado por la CCM. Para aumentar al máximo voltaje en una CCM, el potencial del ánodo debe mantenerse lo más bajo (negativo) como sea posible. Sin embargo, el potencial del ánodo es demasiado bajo, el transporte de electrones se inhibe y la fermentación del sustrato (si es posible) puede proporcionar una mayor energía a los microorganismos. Según Logan el impacto de un potencial bajo en el ánodo y su posible impacto en la estabilidad de la generación de energía debe ser abordado en nuevos estudios.
  
- **Pérdidas de concentración,** conocidas también como polarización por concentración, ocurre cuando la tasa de transporte de masa de las especies de o desde el electrodo limitan la producción de corriente (Lamminie y Dicks, 2000; Hoogers, 2003). Las pérdidas de concentración se producen principalmente a altas densidades de corriente, debido a la limitada transferencia de masa de las especies químicas por difusión en la superficie del electrodo. Las pérdidas de concentración en el ánodo son causadas por una descarga limitada de especies

oxidadas desde la superficie del electrodo o por un suministro limitado de especies oxidadas y reducidas en la superficie del electrodo, la cual puede producir un incremento en el potencial de electrodo. En el lado del cátodo puede producir un efecto contrario provocando caída de potencial en el ánodo (Logan, 2006).

## 2.5. DESEMPEÑO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM)

Cuando se habla de CCM tenemos que precisar las variables eléctricas que afectan a dichos sistemas, se consideran mencionar la densidad de potencia y eficiencia coulombica (Saavedra, 2012).

2.5.1. **Densidad de Potencia (DP):** es la cantidad de energía generada por unidad del área del electrodo (Wang *et al.*, 2010).

Matemáticamente se define como el cociente del voltaje de celda al cuadrado por unidad de área (m<sup>2</sup>) del electrodo anódico y la resistencia externa (Ω) o el cociente del voltaje de celda al cuadrado por el volumen (m<sup>3</sup>) del compartimento anódico y la resistencia externa (Ω). Las unidades de la densidad de potencia son en W/m<sup>2</sup> o W/m<sup>3</sup> (Luo *et al.*, 2010; Saavedra, 2012).

$$DP_{sup} = \frac{\Delta E_{celda}^2}{A_{ánodo} \cdot R_{ext.}} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$DP_{sup} = \frac{\Delta E_{celda}^2}{V_{ánodo} \cdot R_{ext.}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

DP<sub>sup</sub>: densidad de potencia en función al área superficial del electrodo (W/m<sup>2</sup>)

DP<sub>vol</sub>: densidad de potencia en función al volumen de sustrato (W/m<sup>3</sup>)

ΔE<sub>celda</sub> : potencial de celda (V)

$A_{\text{ánodo}}$ : área del electrodo ( $\text{m}^2$ )

$R_{\text{ext.}}$ : resistencia externa ( $\Omega$ )

$V_{\text{ánodo}}$ : volumen del ánodo ( $\text{m}^3$ )

### 2.5.2. Eficiencia coulombica (EC)

Es un parámetro que permite obtener la fracción de energía eléctrica que se puede generar en la celda de combustible microbiana a partir de un sustrato determinado (Revelo *et al*, 2013). Su medición es importante porque posibilita comparar el desempeño de diferentes celdas de combustible microbianas. La EC se define matemáticamente como la relación entre el número de coulombios realmente transferidos al ánodo desde el sustrato y el número máximo posible de coulombios transferidos si todo el sustrato fuera capaz de producir corriente.

$$EC (\%) = \frac{\text{Coulombios recuperados} \times 100}{\text{Coulombios totales en el sustrato consumido}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Los Coulombios recuperados es el total de coulombs calculados por la integración de la corriente en el tiempo (Pistonesi *et al*, 2010).

Donde:

I: corriente expresado en  $\text{mA}/\text{cm}^2$  (área superficial del electrodo)

t: tiempo en horas

Los coulombios en el sustrato consumido es la cantidad teórica de coulombs, calculada a partir de (Logan, 2008):

$$\text{Coulombios totales en el sustrato consumido} = \frac{F \cdot b \cdot v_{\text{an}} \cdot \Delta C}{M_s} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

F: constante de Faraday ( $96,485 \text{ C/mol. e}^-$ )

b: número de moles de electrones generados por mol de sustrato

$V_{\text{an}}$ : volumen total de la cámara anódica (L)

$\Delta C$ : Diferencia de concentración del sustrato (g/L)

$M_s$ : Masa molecular del sustrato (g/mol)

Ordenando las *ecuaciones 9 y 10* tenemos que la eficiencia coulombica se calcula como:

$$EC = \frac{M_s I t}{F b V_{an} \Delta C} \quad \text{Ecuación 13}$$

## 2.6. MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD ENERGÉTICA

Las bacterias son microorganismos cosmopolitas, es decir, se encuentran en diversos hábitats desde acuáticos hasta subterráneos y existe un grupo muy en particular de microorganismos con capacidad de producir electricidad. Estudios científicos han revelado que las especies *Geobacter Sulfurreducens*, *Shewanella Oneidensis*, *Geobacter Metallireducens* son capaces de generar electricidad, aunque en la actualidad se desconoce su mecanismo (Huitzil, 2010).

Actualmente las investigaciones más sobresalientes en celdas de combustible microbiana son empleando la familia Geobacteraceae como catalizador ya que presentan nanocables conductores “pili” de electrones; sin embargo, uno de los géneros conocidos como *Acidithiobacillus* son capaces de metabolizar el tiosulfato como fuente de energía, entre estos sobresalen *A. caldus*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans* siendo esta última la más estudiada por su importancia en el campo de la biotecnología (Huitzil, 2010; Ponce, 2007).

## 2.7. BACTERIAS ACIDÓFILAS: *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*

El género *Acidithiobacillus* integra a un numeroso grupo de bacterias caracterizadas por ser bacterias Gram negativas, presenta una forma de bastón que mide 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.3

µm de largo, tiene un flagelo que le da motilidad en medios líquidos, son acidófilas y quimiolitotróficas estrictas (Saavedra, 2012).

➤ **Bacterias oxidantes de azufre y hierro**

Las *Acidithiobacillus ferrooxidans* son bacterias capaces de oxidar el azufre, sulfuros metálicos y otros compuestos inorgánicos reducidos de azufre, entre ellos tiosulfato. Estas sustancias participan como dadores de electrones las cuales son indispensables para estas debido a su crecimiento quimiolitotrófico aerobio o anaerobio (Dopson, 2012; Ponce, 2007).

➤ **Hábitat**

Las bacterias que oxidan minerales sulfurados se encuentran en hábitats microbiológicos extremadamente complejos, es decir, diferentes composiciones mineralógicas y ambientes climáticos (Saavedra, 2012).

Existen pocos grupos de investigadores que se han enfocado en el descubrimiento y la caracterización de acidófilos con la capacidad de oxidar el hierro y azufre como se reporta en la Tabla 3. Estos acidófilos extremos crecen de manera óptima entre un pH de 1 – 4.5 y presentan adaptación a ciertas temperaturas. (Saavedra, 2012; Dopson y Johnson, 2012).

La especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* es considerada mesófila ya que crece a temperaturas menores a 40 °C, y se adapta a pH entre 2 – 4 (Menadier, 2009).

**Tabla 3.** Microorganismos Acidófilos oxidantes de azufre y hierro. Fuente: Watling, 2006.

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato de crecimiento reportado</b>	<b>Características</b>
<i>Acidianus ambivalens</i>	S° oxidación y reducción	Hipertermófilos
<i>Acidianus brierleyi</i>	Sulfitos	pH óptimo 1.5 – 2.5
<i>Acidianus infemus</i>	Fe oxidación	-----
<i>Acidianus tengchongensis</i>		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mixotrofia Fe oxidación y reducción, sulfuros (pobre)	Termófilo moderado; pH óptimo 2
<i>Acidiphilum spp</i>	Heterótrofos obligados	Mesófilos
<i>Acidiphilum SJH</i>	S° oxidación  Fe (III) reducción	pH óptimo 2 – 3
<i>Acidiphilum acidophilum</i>	Autótrofo facultativo  S° oxidación  Fe (III) reducción	Mesófilos  pH óptimo 2 – 3
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Autótrofos	Mesófilos
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	S° oxidación, sulfuros	pH rango 2 – 4
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	(Af. Fe (II) oxidación; Fe (III) reducción como anaerobio facultativo)	
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Mixótrofo  S° oxidación, sulfuros	Termófilo moderado; pH óptimo 2 – 2.5
<i>Acidolobus aceticus</i>	Heterótrofo	Hipertermófilo
<i>Alicyclobacillus spp</i>	S° reducción a H <sub>2</sub> S  S° oxidación, sulfuros	Mesófilos –Termófilos moderados; pH óptimo 3.8
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	(Ad. facultative autotroph.: At. mixótrofo, Fe (III) reducción)	pH rango 1.5 – 2.5
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>		

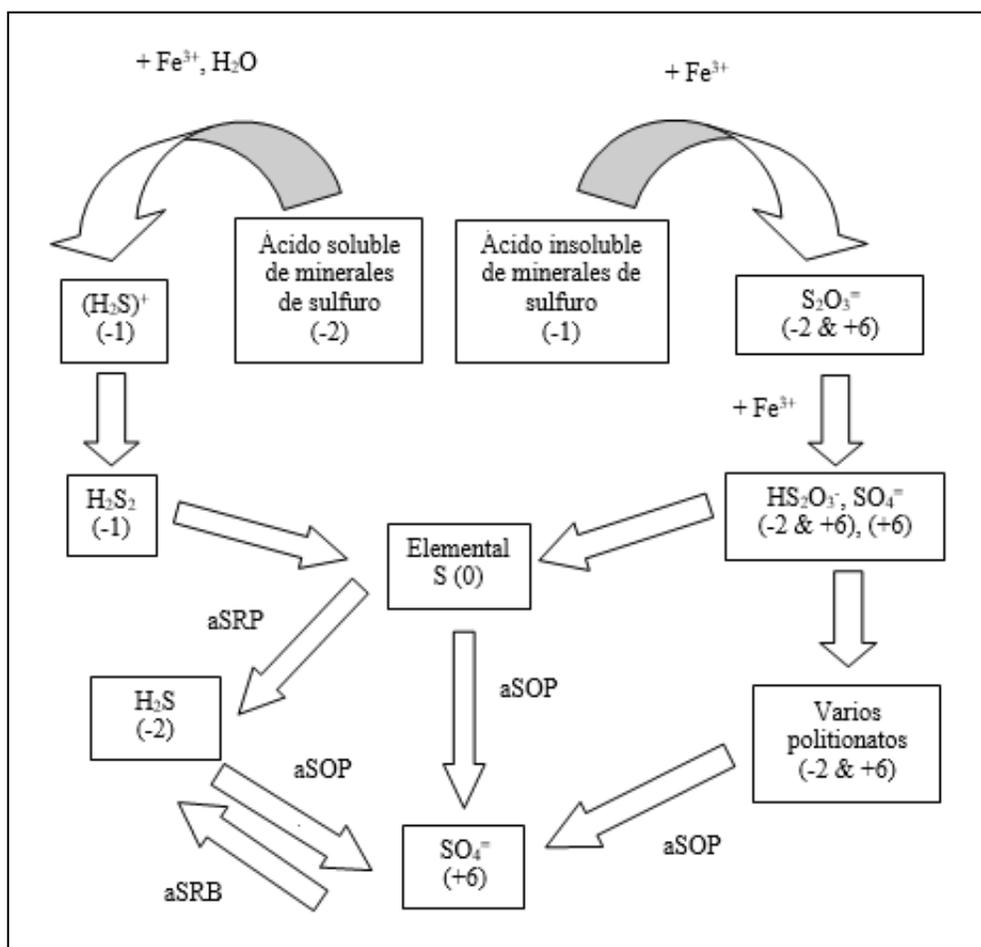
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Heterótrofo Fe (II) oxidación, sulfuros Fe (III) reducción	Mesófilo; pH óptimo 1.7 – 1.8
<i>Ferroglobus placidus</i>	Fe oxidación	Termófilo; pH neutral
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Posible autótrofo	Termófilos moderados
<i>Ferroplasma cypraxacervatum</i>	Fe oxidación	pH rango 1 – 2
<i>Ferroplasma acidophilum</i>	Pirita oxidación pobre	-----
<i>Ferroplasma MT17</i>		
<i>Hydrogenobaculum acidophilus</i>	S°, H oxidación para producir ácido sulfúrico	Termófilo; pH óptimo 3 – 4
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Fe oxidación	Mesófilos, algunas cepas termotolerantes
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Pirita	pH rango 1.6 – 1.9
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe oxidación, pirita	Mesófilo; pH óptimo 1.5 – 1.7
<i>Metallosphaera sedula</i>	S° oxidación	Termófilos
<i>Metallosphaera prunae</i>	Sulfuros	pH rango 1 – 4
<i>Metallosphaera hakonensis</i>		
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Fe (II) y S oxidación; Fe (III) reducción, sulfuros	Termófilos moderados
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	S° y Fe (II) oxidación	pH rango 1 – 2.5

### ➤ **Metabolismo**

En ambiente anaerobio *Acidithiobacillus ferrooxidans* usa oxígeno como aceptor de electrones y en condiciones aerobias emplea hierro como aceptor de electrones. Tiene cualidades quimiolitótrofas porque es capaz de oxidar al hierro y azufre en soluciones de ácido sulfúrico en presencia de oxígeno. La energía que obtiene de la oxidación de

compuestos azufrados y/o hierro la emplea para la fijación del dióxido de carbono,  $\text{CO}_2$ , y crecimiento celular (Díaz, 2007; Saavedra, 2012). Otra de las facultades de esta especie es que puede oxidar sulfuros metálicos a sulfatos solubles en soluciones ácidas lo cual es mediada por ion férrico que es reducido químicamente a ion ferroso y reoxidado por *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

En la Figura 11, se muestran las diversas transformaciones químicas que pueden sufrir los compuestos azufrados por las bacterias acidófilas.



**Figura 11.** Transformaciones de compuestos inorgánicos de azufre en ambientes extremadamente ácidos. aSOP: procariontas ácidas que oxidan azufre; aSRP: procariontas ácidas que reducen azufre y aSRB: procariontas ácidas que reducen sulfato. Modificado de Vairavamurthy *et al.*, 1993. Fuente: Dopson y Johnson, 2012.

Las bacterias sulfooxidantes son capaces de utilizar los compuestos reducidos inorgánicos de azufre como fuente energía para su metabolismo celular. Usualmente estas bacterias usan el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), azufre elemental ( $\text{S}$ ) y el tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ) que en condiciones adecuadas de crecimiento el producto final de la oxidación es el sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ). Sin embargo, en el caso de sulfuro y tiosulfato, bajo ciertas condiciones de cultivo es posible la formación de azufre elemental como producto parcial de la oxidación de estos compuestos (Alcántara, 2000).

#### ➤ **Sustrato: tiosulfato**

El ion tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ) es el combustible que se empleará en el ánodo de una Celda de Combustible Microbiana. Este anión se considera metaestable ya que en condiciones ácidas puede descomponerse a politionatos y sulfatos, pero en está en pH superior a 7, es posible la presencia de tiosales (Fernández, 1986). El anión tiosulfato está constituido de dos átomos de azufre no equivalentes. El átomo de azufre central tiene un número de oxidación de +6 y el átomo de azufre unido, el número de oxidación de -2.

El tiosulfato es considerado un compuesto de deterioro ambiental y al igual que otros compuestos de azufre son altamente corrosivos. Es uno de los causantes de las aguas ácidas de mina ya que junto con otros compuestos de azufre inorgánicos se convierten hasta formar ácido sulfúrico (Arias *et al*, 2015; Suzuki, 1999) ocasionando serios problemas en el medio ambiente.

Cabe recalcar que el azufre es necesario para el metabolismo celular de los seres vivos ya que forma parte de los aminoácidos cisteína y metionina. El 1% del peso de las bacterias es azufre que lo incorpora por una reacción de reducción asimilativa del sulfato (Cancino, 2002; Lee *et al.*, 1995).

### **III. HIPÓTESIS**

- El ion tiosulfato en presencia de *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, en el ánodo, será oxidado hasta azufre y ion sulfato, cuando en el cátodo se ingrese solución conteniendo iones férricos o cúpricos los cuales serán reducidos hasta iones ferrosos o iones cuprosos respectivamente.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar los cambios químicos en una celda de combustible microbiana generadora de electricidad a partir de tiosulfato de sodio con el fin de determinar la posible vía de oxidación.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estandarizar métodos analíticos para la determinación de analitos que se producirían de la reacción de tiosulfato de sodio en una celda de combustible microbiana.
- Estandarizar el medio tiosulfato para determinar los analitos producidos.
- Cuantificar los analitos producidos en el ánodo y cátodo de una Celda Combustible Microbiana, Celda de Combustible Control y Celda Electrolítica.
- Identificar los cambios químicos del tiosulfato en las Celdas de Combustible Microbiana.
- Determinar cuál de las tres Celdas de Combustible Microbiana es más eficiente.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

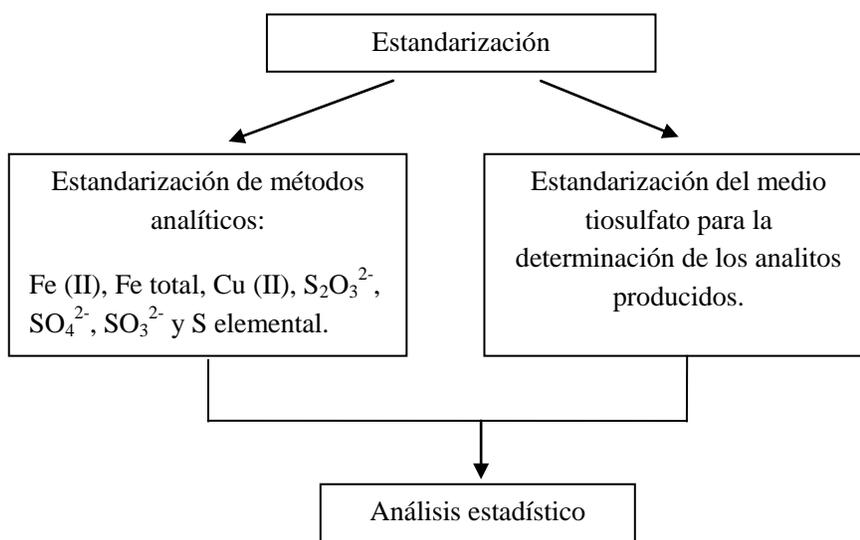
La selección de microorganismos acidófilos, el desarrollo, construcción y manejo de las celdas de dos cámaras y pruebas de cronoamperometría en una celda electroquímica fueron realizadas en el laboratorio de Biotecnología Ambiental – Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía (Facien); los datos de voltaje y muestras para investigar los cambios químicos que ocurren en estas celdas de dos cámaras y electroquímica fueron realizados en los laboratorios de Química y Química Instrumental de la Sección de Química del Departamento de Ciencias Exactas de la Facultad de Ciencias y Filosofía. En ANEXO 1 se detallan los materiales de laboratorio y reactivos empleados.

### 5.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

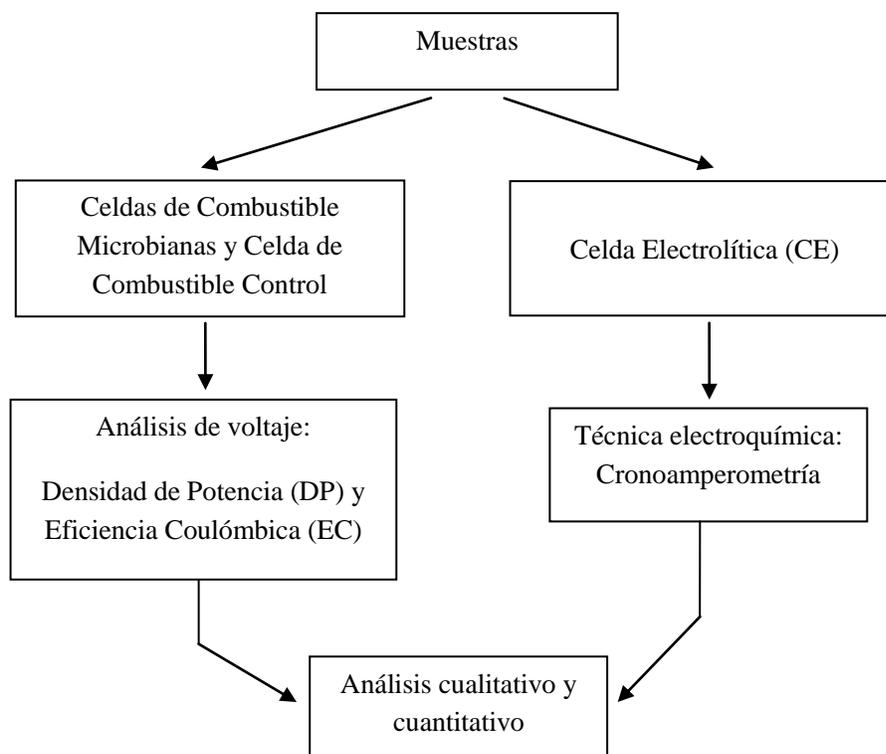
#### • FLUJOGRAMA DEL PROCESO

El trabajo de investigación se llevó a cabo en dos etapas.

#### Primera etapa



## Segunda etapa



### 5.1.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se realizó la estandarización de los métodos analíticos los cuales se emplearían para la determinación de los analitos en las celdas de combustible microbiana y celda de combustible control. Se empleó como solvente el agua para preparar las soluciones patrón

Fue necesario realizar la estandarización para asegurar que los métodos empleados son los adecuados para las pruebas posteriores en las CCM, CCC y CE siendo nuestro interés en realizar las cuantificaciones en dichas celdas de dos cámaras y celda electrolítica respectivamente.

#### 5.1.1.1. Determinación permanganimétrica de Fe (II) por el método Zimmermann – Reinhard (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)

Esta determinación se realizó para cuantificar la concentración de Fe (II) mediante una titulación redox usando como valorante permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ).

*Estandarización del valorante:* Previo a la determinación de Fe (II) es necesario preparar y estandarizar el valorante, se procedió a preparar la solución de  $\text{KMnO}_4$  0.2 N, se pesó 3.1606 g de  $\text{KMnO}_4$ , se disolvió en agua destilada. Se trasvasó a una fiola de 1 litro y enrasó con agua destilada. Todo el contenido se vertió a un vaso de 1 litro y se dejó hervir sobre una plancha eléctrica entre 1 ½ - 2 horas. Se dejó reposar 24 horas en un lugar oscuro. Se filtró al vacío en un recipiente de base porosa. Se envasó y guardó en un frasco oscuro.

Se valoró la solución de  $\text{KMnO}_4$  empleando oxalato de sodio como patrón primario (libre de humedad y seco). Se tomó lectura de los volúmenes gastados (ml) en la valoración y realizó tres repeticiones para garantizar la correcta concentración de  $\text{KMnO}_4$ .

*Estandarización de Fe (II):* Una vez que se obtuvo la concentración real del permanganato de potasio se procedió a preparar concentraciones conocidas de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) entre el intervalo de 5-15 g/l con el fin de corroborar la concentración de Fe (II). Se prepararon 100 ml de solución de Fe (II) de concentraciones conocidas de 5, 9, 10, 12 y 15 en g/l. En un erlenmeyer 250 ml se añadió 25 ml de la solución de Fe (II), 100 ml de agua destilada y 5 ml de solución manganoso fosfórico. Luego se valoró con solución  $\text{KMnO}_4$  hasta que cambiara a un color rosa tenue permanente. Se tomó lectura de los volúmenes gastados en la valoración y el ensayo fue realizado cuatro veces.

**5.1.1.2. Determinación de Fe total: Titulación con dicromato de potasio** (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)

El método consistió en determinar la concentración de Fe total mediante una valoración con solución dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 0.1 N.

Se prepararon 25 ml de solución de Fe (II) de concentraciones conocidas de 1, 4, 8, 12 y 16 en g/l. En un de erlenmeyer de 25 ml se colocó 1 ml de solución Fe total, 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, se cubrió la boca del erlenmeyer con una luna de reloj y se calentó en la plancha hasta ebullición, se añadió solución de SnCl<sub>2</sub> 20% hasta de colorar el hierro. Se lavó la tapa y las paredes del matraz con agua destilada. Se añadió 2 ml de HgCl<sub>2</sub> y 2 ml de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1) y 3 gotas del indicador difenilamina. Se tituló con la solución K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1 N hasta coloración azul o violeta verdosa persistente. Se tomó lectura de los volúmenes gastados (ml) en la valoración y el ensayo se realizó por triplicado.

#### **5.1.1.3. Determinación de hierro (III)**

Se determinó como la diferencia de hierro total y hierro (II).

#### **5.1.1.4. Determinación Iodométrica de cobre (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)**

El método consistió en determinar la concentración de cobre (II) mediante una titulación redox con tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0.1 N.

*Estandarización del valorante:* Previo a la determinación experimental de cobre (II) se preparó y estandarizó el valorante Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.1 N.

Se pesó 24.8 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> anhidro y se enrasó a 1 litro con agua destilada tibia. Se empleó KIO<sub>3</sub> como patrón primario. Se tomó lectura de los volúmenes gastados (ml) en la valoración y el ensayo se realizó por triplicado.

*Estandarización de Cu (II):* Una vez que se obtuvo la concentración real del tiosulfato de sodio se procedió a preparar concentraciones conocidas de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) entre el intervalo de 5-20 g/l con el fin de corroborar la concentración de Fe (II) en dicha muestra. Se prepararon 100 ml de solución Cu (II) de concentraciones 5, 6, 8, 10, 15 y 20 en g/l.

En un erlenmeyer de 250 ml se añadió 25 ml de la solución Cu (II) y 5 ml de ácido acético glacial. Se adicionó 5 g KI disueltos en 10 ml de agua destilada. Se cubrió el matraz con

una luna de reloj y se dejó reposar por dos minutos. Luego se procedió a valorar con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1N hasta un color amarillo claro. Se agregó 3 ml de almidón y se continuó titulando hasta que el color vire a azul claro, en dicho momento se adicionó 2 g de tiocianato de amonio pulverizado y finalmente se titula hasta la desaparición total del color azul. Se tomó lectura de los volúmenes gastados (ml) en la valoración y el ensayo se realizó por triplicado.

**5.1.1.5. Determinación de azufre elemental:** Extracción y determinación cuantitativa de azufre elemental – Método 8.5 (Propuesta de Reglamento del Parlamento europeo y del consejo relativo a los abonos, 2001).

El método consistió en la extracción del azufre elemental con disulfuro de carbono previa eliminación de los compuestos solubles y seguida de la gravimetría del azufre extraído.

Se pesó cantidades conocidas de azufre en polvo: 1, 0.5 y 0.05 en g depositadas en un cartucho cónico de papel filtro. Se lavó con agua caliente el contenido del cartucho para eliminar todos los compuestos solubles. Se secó en la estufa a 90 °C durante 1 hora, e introdujo el cartucho en la cámara de extracción del aparato de Soxhlet.

En un matraz redondo de base plana de 250 ml se añadió unas cuantas perlas de vidrio, se taró y pesó. Se vertió 200 ml de disulfuro de carbono.

Se conectó el aparato de Soxhlet y se extrajo el azufre durante 6 horas. Para recuperar el solvente se destiló hasta que el contenido del matraz se solidifique en una masa esponjosa.

Se secó el matraz en la estufa a 90°C hasta obtener una masa constante y tomó lectura de dicha masa.

**5.1.1.6. Determinación de sulfatos en minerales:** Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989).

El método consistió en la determinación cuantitativa de sulfato soluble mediante la técnica gravimétrica.

En primer lugar, procedió a preparar 100 ml de concentraciones conocidas de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ): 5, 7, 10, 13 y 16 en g/l. Posteriormente se calculó el volumen de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 5% necesario para hacer precipitar el contenido de sulfatos presentes en cada solución preparada. Se taró 4 cápsulas de porcelana previamente calentado en el mechero por 1 hora, se enfrió en el desecador y pesó. En un vaso de precipitado de 150 ml se añadió 25 ml de solución de sulfato, 75 ml de agua destilada, 3 gotas de anaranjado de metilo y 1 ml de HCl concentrado. Se calentó hasta ebullición y añadió el volumen hallado  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 5% con agitación constante. Se dejó calentar a temperatura aproximada de 70 °C por 1 hora. Luego se filtró por gravedad en caliente y usó papel Whatman 42, sin cenizas, se enjuagó el precipitado con agua caliente 5-6 veces. Se llevó a calcinar la cápsula usando el mechero bunsen bajo la campana extractora de gases. El proceso fue realizado por 1 hora, luego se dejó en la mufla a 900 °C durante 2 horas. Se tomó lectura de la masa de la cápsula con cenizas que por diferencia de pesos se determinó la masa de cenizas. El ensayo fue realizado cuatro veces.

**5.1.1.7. Determinación de sulfitos:** Método gravimétrico  
Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989).

El método consistió en la determinación cuantitativa de sulfito por oxidación a sulfato y precipitación como sulfato de bario.

Se procedió a preparar 50 ml de concentraciones conocidas de sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) anhidro: 1, 2, 3, 4 y 5 en g/l.

En un vaso de 50 ml se colocó 2.2 ml de solución de sulfitos y se colocó en baño maría. Se añadió una solución de peróxido de hidrógeno amoniacal en exceso (volúmenes iguales de 20 volúmenes de peróxido de hidrógeno y solución amoniacal 1:1). Se diluyó con 10 ml de agua destilada y adicionó 1 ml de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 5% con agitación constante. Se dejó calentar a temperatura aproximada de 70 °C por 30 minutos. Luego se filtró en caliente con

papel Whatman 42, sin cenizas, se enjuagó el precipitado con agua caliente 5-6 veces. Se realizó la verificación de sales de cloro añadiendo nitrato de plata. En una cápsula de porcelana, previamente pesada, se introdujo el papel filtro doblado y seco. Se calcinó la cápsula por media hora en mechero Bunsen. Luego se dejó por dos horas en la mufla a 900°C. Se tomó lectura de la masa de la cápsula con cenizas que por diferencia de pesos se determinó la masa de cenizas. El ensayo fue realizado cuatro veces.

**5.1.1.8. Determinación de tiosulfatos: Método gravimétrico**  
Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989).

El método consistió en la determinación cuantitativa de tiosulfato a sulfato y determinación como sulfato de bario.

En un vaso de 50 ml se colocó 2.2 ml de solución de tiosulfato de sodio en baño maría. Se añadió una solución de peróxido de hidrógeno amoniacal en exceso. Se diluyó con 10 ml de agua destilada y adicionó 1 ml de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 5% con agitación constante. Se dejó calentar a temperatura aproximada de 70 °C por 30 minutos. Luego se filtró por gravedad en caliente y usó papel Whatman 42, sin cenizas, se enjuagó el precipitado con agua caliente 5-6 veces. Se realizó la verificación de sales de cloro añadiendo nitrato de plata.

En una cápsula de porcelana, previamente pesada, se introdujo el papel filtro doblado y seco. Se calcinó la cápsula por media hora en mechero Bunsen. Luego se dejó por dos horas en la mufla a 900°C. Se tomó lectura de la masa de la cápsula con cenizas que por diferencia de pesos se determinó la masa de cenizas. El ensayo fue realizado cuatro veces.

### **5.1.2. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN MEDIO TIOSULFATO**

Se realizó la estandarización de tiosulfato mediante la técnica en el apartado 5.1.1.8, en este caso se evaluó en nutrientes para bacterias acidófilas, es decir, medio tiosulfato de sodio en presencia de bacterias acidófilas. Se consideró cinco concentraciones conocidas del medio tiosulfato en el rango de 1 a 5 g/l. Se trabajó con diferentes volúmenes de muestra teniendo en cuenta que se emplearía celdas de dos cámaras de volumen 10 ml cada una. Fue necesario realizar la estandarización de este método para asegurar que sería adecuado para las pruebas posteriores en la CCM y CCC siendo nuestro interés en realizar las cuantificaciones dichas celdas de dos cámaras. Las determinaciones se realizaron al tiempo cero y después de 24 horas.

### **5.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS ESTANDARIZACIONES**

El análisis estadístico se aplicó a los resultados de los apartados 5.1.1 y 5.1.2. Los datos que se obtuvieron de las variables cuantitativas, dependiendo del método, fueron: concentración g/l, masa de residuo de azufre en g los cuales se ingresó al software Minitab versión 18.

Se empleó la prueba T apareada (Bower, 2001) para determinar si la media de una muestra difiere significativamente de un valor específico.

#### **5.1.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM), CELDAS DE COMBUSTIBLE CONTROL (CCC) y CELDA ELECTROLÍTICA (CE)**

##### **5.1.4.1. Experimentación en Celdas de Combustible Microbiana (CCM) de dos cámaras**

Se instaló e hizo funcionar dos celdas: una celda de combustible microbiana con inóculo de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el ánodo y una celda de combustible control sin bacterias. Se utilizó como electrodo fieltro de carbono 1 cm<sup>2</sup> para ambos compartimentos. Cabe recordar que el cátodo no lleva bacterias en ninguna de las celdas.

Las CCM fueron llenadas con 5 ml del medio tiosulfato (o 5 ml de medio tiosulfato y solución ferrosa) (ver al detalle en el apartado 5.1.4.2) y 5 ml del inóculo *de Acidithiobacillus ferrooxidans* (no se empleó un método para contarlas) en la cámara anódica y 10 ml de la solución de férrica (o cúprica) en la cámara catódica. Se procedió a burbujear N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% nitrógeno y 20% de dióxido de carbono) durante 10 minutos para generar la anaerobiosis en la cámara anódica y se sellaron todos los orificios con plastiflim para mantener dichas condiciones; mientras que los agujeros de la cámara catódica se dejaron sin sellar para mantener las condiciones aerobias.

La cámara anódica de la CCC no fue inoculada con cepas *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En ésta se añadió 10 ml del medio tiosulfato (o 10 ml de medio tiosulfato y solución ferrosa) en la cámara anódica y 10 ml de solución férrica (o 10 ml de solución cúprica) en la cámara catódica siendo utilizada como control del experimento.

Ambas celdas fueron monitoreadas con un multímetro conectado a la resistencia del circuito eléctrico de las cámaras anódica y catódica, tomando los datos de voltaje manualmente cada 2 horas y anotándolos en el cuaderno de trabajo.

#### 5.1.4.2. Condiciones de trabajo y composición química en los compartimentos de las CCM y las CCC

- ❖ Las tres Celdas de Combustible Microbiana (CCM) analizadas trabajaron bajo las siguientes condiciones:

En la **cámara anódica** se añadió 5ml de inóculo de bacterias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* (no se usó un método para contarlas), 5 ml del medio tiosulfato (o 5 ml de medio tiosulfato y solución ferrosa) se trabajó a temperatura ambiente de 23 - 25 °C, a pH 3.5 el cual fue medido con un potenciómetro de pH y se desempeñó a condiciones anaeróbicas, es decir, en ausencia de oxígeno ya que éste fue desplazado por el burbujeo de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> durante 10 minutos.

En la **cámara catódica** no se añadió inóculo de bacterias sino 10 ml de solución férrica (o solución cúprica), se trabajó a temperatura ambiente alrededor de 23 y 25 °C, a pH 3.6 el cual fue medido con un potenciómetro de pH y se desempeñó a condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno.

- ❖ Las tres Celdas de Combustible Control (CCC) analizadas trabajaron bajo las siguientes condiciones:

En la **cámara anódica** no se agregó inóculo de bacterias sino se añadió 10 ml de medio tiosulfato (o 10 ml de medio tiosulfato y solución ferrosa), en cuanto a temperatura: 23 – 25°C, pH: 3.5, condiciones anaeróbicas y composición química permanece igual a un ánodo de la CCM.

En la **cámara catódica** no se añadió inóculo de bacterias sino 10 ml de solución férrica (o solución cúprica), se trabajó a temperatura ambiente alrededor de 23 y 25 °C, a pH 3.6 el cual fue medido con un potenciómetro de pH y se desempeñó a condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno.

#### **5.1.4.3. Experimentación en la Celda Electrolítica (CE) para análisis electroquímico**

Se instaló dos celdas de vidrio de una sola cámara para análisis electroquímico: una celda electrolítica con inóculo de bacterias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* (no se empleó un método para contarlas) y otra sin inóculo de bacterias.

La CE con bacterias fue llenada con 18 ml de medio tiosulfato, 18 ml solución férrica y 4 ml de inóculo de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En la CE control se introdujo 20 ml de medio tiosulfato y 20 ml solución férrica.

Ambas celdas electrolíticas para análisis electroquímico presentaron la configuración de tres electrodos: electrodo de referencia, contraelectrodo de carbón y electrodo de trabajo (fieltro de carbono). Se procedió a burbujear N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% nitrógeno y 20% de dióxido de carbono) durante 10 minutos para generar la anaerobiosis y se sellaron los orificios con plastifilm. Los terminales de los tres electrodos utilizados fueron conectados a un potenciostato *Model 273A Potentiostat/Galvanostat - Princeton Applied Research* para la medición de la cronoamperometría. Se midió a temperatura ambiente y procedió a aplicar un potencial de 440 mV constante durante 1 hora.

#### **5.1.4.4. Condiciones de trabajo, composición química y características en la Celda Electrolítica (CE) para análisis electroquímico**

❖ La Celda Electrolítica (CE) analizada se trabajó bajo las siguientes condiciones:

En la **CE con bacterias**: Se colocó 18 ml de medio tiosulfato, 18 ml solución férrica y 4 ml de inóculo de bacterias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* (no se empleó un método para contarlas), pH 3.5, temperatura ambiente 23 – 25 °C y se desempeñó a condiciones anaerobias, es decir, en ausencia de oxígeno ya que éste fue desplazado por el burbujeo de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> durante 10 minutos.

En la **CE control**: Se empleó las mismas condiciones de la CE con bacterias a diferencia que esta celda no se inoculó bacterias. En este caso se añadió 20 ml de medio tiosulfato y 20 ml solución férrica.

#### 5.1.4.5. Material de trabajo

Se dispuso un total de 16 muestras de la cámara anódica y catódica – compartimentos de la Celda de Combustible Microbiana (ver ANEXO 7, página 126) (CCM 1, CCM 2, CCM 3) y Celda de Combustible Control (ver ANEXO 7, página 126) (CCC 1, CCC 2, CCC 3), 1 muestra de la Celda Electrolítica (ver Figura 7) (CE) para análisis electroquímico donde se realizó la cronoamperometría, y los datos de voltaje (mV) de la CCM y CCC.

Las muestras fueron los componentes químicos presentes en cada uno de los compartimentos al final de la reacción de celdas de combustible y celda electrolítica.

##### ➤ **CCM 1 y CCC 1: Medio tiosulfato (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica)**

El medio tiosulfato y solución férrica (Tablas 4 y 5) es la composición química en la cámara anódica y catódica respectivamente de la CCM 1 y CCC 1 los cuales más adelante serán considerados como muestras.

La experimentación en las celdas de dos cámaras duró un total de 475 horas dividiéndose en dos etapas.

**Etapas A:** El tiempo de reacción para esta etapa se experimentó desde las 209 horas hasta las 307 horas. Al tiempo 209 horas se ingresó 2 ml adicionales solución férrica sólo a las cámaras catódicas. Finalizada la reacción química de óxido reducción a las 307 horas se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo a cada uno de los compartimentos de la celda de combustible microbiana y celda de combustible control.

En la Tabla 4 se detalla la composición química inicial del ánodo y cátodo en la CCM 1 y CCC 1. En el ánodo de la CCM 1 se colocó 5ml de medio tiosulfato y 5ml de inóculo de bacterias y en el cátodo, 10 ml de solución férrica; mientras que en el ánodo de la CCC se añadió 10 ml del medio tiosulfato y en el cátodo 10 ml de solución férrica.

Tabla 4. Composición química inicial en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa A.

<b>Cámara anódica: Medio tiosulfato (g/l)</b>	<b>Cámara catódica: Solución férrica (g/l)</b>
<p><b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O = 5 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.4 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.4 g            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.5 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.5</b></p>	<p><b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> = 6.92 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.33 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.53 g            TSB = 0.25 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.6</b></p>

ET: Elementos traza, TSB: Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

**Etapa B:** El tiempo de reacción para esta etapa se experimentó desde las 308 horas hasta las 475 horas. Al tiempo 308 horas se ingresó 2 ml adicionales de medio tiosulfato sólo a las cámaras anódicas. Finalizada la reacción química al cabo de 475 horas se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo a cada uno de los compartimentos de la celda de combustible microbiana y celda de combustible control.

En la Tabla 5 se detalla la composición química inicial del ánodo y cátodo en la CCM 1 y CCC 1.

Tabla 5. Composición química en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa B.

<b>Cámara anódica: Medio tiosulfato (g/l)</b>	<b>Cámara catódica: Solución férrica (g/l)</b>
<p><b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O = 5g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.57 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.535 g            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.655 g            ET = 1.25 ml  <b>pH = 3.5</b></p>	<p><b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> = 6.92 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.33 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.53 g            TSB = 0.25 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.6</b></p>

ET: Elementos traza, TSB: Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

➤ **CCM 2 y CCC 2: Medio tiosulfato (cámara anódica) solución cúprica (cámara catódica)**

El medio tiosulfato y solución cúprica es la composición química de la cámara anódica y catódica en la CCM 2 y CCC 2 los cuales más adelante serán considerados como muestras. Finalizada la reacción química al cabo de 183 horas se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo a cada uno de los compartimentos de la celda de combustible microbiana y celda de combustible control.

En la Tabla 6 se detalla la composición química inicial del ánodo y cátodo en la CCM 2 y CCC 2. En el ánodo de la CCM 2 se colocó 5ml de medio tiosulfato y 5ml de inóculo de bacterias y en el cátodo, 10 ml de solución cúprica; mientras que en el ánodo de la CCC se añadió 10 ml del medio tiosulfato y en el cátodo 10 ml de solución cúprica.

**Tabla 6.** Composición química inicial en la CCM 2 y CCC 2.

<b>Cámara anódica: Medio tiosulfato (g/l)</b>	<b>Cámara catódica: Solución cúprica (g/l)</b>
<p><b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O = 5 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.42 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.416 g            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.516 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.5</b></p>	<p><b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O = 1 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.33 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.53 g            TSB = 0.25 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.6</b></p>

ET: Elementos traza, TSB: Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

➤ **CCM 3 y CCC 3: Medio tiosulfato y solución ferrosa (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica)**

La composición química inicial en la cámara anódica y catódica en la CCM 3 y CCC 3 se muestra en la Tabla 7. En el ánodo de la CCM 3 se colocó 5ml de medio tiosulfato y solución ferrosa con 5ml de inóculo de bacterias, y en el cátodo, 10 ml de solución férrica;

mientras que en el ánodo de la CCC se añadió 10 ml del medio tiosulfato y solución ferrosa, y en el cátodo 10 ml de solución férrica.

Finalizada la reacción química al cabo de 145 horas se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo a cada uno de los compartimentos de la celda de combustible microbiana y celda de combustible control.

**Tabla 7.** Composición química inicial en la CCM 3 y CCC 3.

<b>Cámara anódica: Medio tiosulfato y solución ferrosa (g/l)</b>	<b>Cámara catódica: Solución férrica (g/l)</b>
<p><b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O = 5g</b>  <b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 33.4 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.4 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.4 g            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.5 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.5</b></p>	<p><b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> = 6.92 g</b>            (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.33 g            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 0.53 g            TSB = 0.3125 g            ET = 1 ml  <b>pH = 3.6</b></p>

ET: Elementos traza, TSB: Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

➤ **CE: Medio tiosulfato y solución férrica**

La composición química inicial del medio tiosulfato y solución férrica se muestra al detalle en la Tabla 8. Se introdujo 18 ml de medio tiosulfato, 18 ml solución férrica y 4 ml de inóculo de bacterias acidófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* (no se empleó un método para contarlas).

Finalizada la reacción química al cabo de 1 hora se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo a los analitos presentes en la celda electrolítica.

**Tabla 8.** Composición química inicial de la CE.

<b>Medio tiosulfato y solución férrica</b>	
<b>Medio tiosulfato (g/l)</b>	<b>Solución férrica (g/l)</b>
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O = 5 g</b>	<b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> = 6.92 g</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 0.456 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 1.33 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O = 0.428 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O = 0.53
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> = 0.524 g	TSB = 0.25 g
ET = 1 ml	ET = 1 ml
<b>pH = 3.5</b>	<b>pH = 3.6</b>

ET: Elementos traza, TSB: Trypticase Soy Broth (Caldo de soya tripticasa)

#### **5.1.4.6. Análisis cualitativo**

Antes de proceder a realizar el análisis cuantitativo en el ánodo y cátodo de la celda de combustible microbiana CCM 1, CCM 2, CCM 3 con sus respectivos controles se llevó a cabo el análisis cualitativo. De igual manera se procedió analizar los iones presentes en la celda electrolítica (CE).

Cada identificación de iones por el análisis cualitativo fue basada según lo descrito por Alexeiev, 1975.

- **Descripción del general de proceso**

Las muestras colectadas (descritas en el apartado 5.1.4.5) se filtraron en caso de obtener sólidos en suspensión, de lo contrario se procedió a trabajar sólo con el líquido. El sólido se usó para la extracción de azufre elemental. La muestra líquida fue empleada para el análisis cualitativo y cuantitativo el cual se describe a continuación.

##### **5.1.4.6.1. Identificación de sulfuros**

A dos gotas de muestra se añadió una gota de nitroprusiato de sodio (Na[Fe(CN)<sub>6</sub>NO].2H<sub>2</sub>O). La presencia de un color rojo – violeta indica una prueba positiva.

#### 5.1.4.6.2. Identificación de tiosulfatos

A dos gotas de muestra se adicionó 3 a 4 gotas de HCl 2N y se calentó hasta ligera ebullición. La formación de un enturbiamiento blanco o amarillento (azufre) indica la presencia de tiosulfatos.

#### 5.1.4.6.3. Identificación de sulfitos y sulfatos

Como prueba confirmativa de tiosulfatos (según el apartado 5.4.2), se prosiguió a la identificación de sulfitos y sulfatos. A dos gotas de muestra se añadió solución de  $\text{SrCl}_2$  o  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  hasta precipitación completa, y el precipitado formado se lavó varias veces con agua destilada. El líquido turbio se separó en dos porciones:

- **Identificación de sulfitos.** A una porción se agregó 2 o 3 gotas de solución 2N de HCl, y gota a gota solución de yodo. Su decoloración es indicio de la presencia de sulfitos.
- **Identificación de sulfatos.** A la otra porción se trató con dos gotas de solución de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y con un exceso de 2 N de HCl. Un precipitado blanco es indicio positivo de la presencia de sulfatos.

#### 5.1.4.6.4. Identificación de hierro (II)

Dos gotas de muestra se trataron con una gota de NaOH 1M. En condiciones ordinarias, se efectúa una oxidación parcial, entonces la prueba positiva tiene un precipitado verde sucio.

**Otra opción:** A dos gotas de muestra se colocó una gota de ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). La prueba positiva tiene un precipitado azul de Turnbull.

#### 5.1.4.6.5. Identificación de hierro (III)

A dos gotas de muestra se añadió NaOH una gota de NaOH 1M. La prueba es positiva si da un precipitado pardo – rojizo de hidróxido de hierro (III).

**Otra opción:** A dos gotas de muestra se añadió una gota de tiocianato de potasio (KSCN). La prueba positiva da una solución color rojo sangre.

#### **5.1.4.6.6. Identificación de cobre (II)**

El ferrocianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) a un  $pH \leq 7$  forma con el  $Cu^{2+}$  un precipitado pardo rojizo de hexacianoferrato (II) de cobre.

En un tubo de ensayo se colocó dos gotas de muestra y una gota de ferrocianuro de potasio.

#### **5.1.4.7. Análisis cuantitativo**

Los materiales de laboratorio, reactivos, equipos e instrumentos son descritos detalladamente en el ANEXO 1, página 95, y los procedimientos de las técnicas empleadas en el análisis cuantitativo son descritos detalladamente en el ANEXO 2, página 97.

## VI.RESULTADOS

### 6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

De la estandarización de los métodos analíticos se obtuvo que no existe diferencia significativa en la repetición de las concentraciones experimentales con respecto a las concentraciones teóricas lo que mostró valor  $p > 0.01$ , al 90% de confianza.

El resultado del análisis estadístico de la estandarización a los métodos analíticos se detalla en el ANEXO 3, página 101.

#### 6.1.1. Hierro (II)

Los resultados correspondientes a la estandarización de hierro (II) se muestran en la Tabla 9 los cuales son expresados como concentración en g/l. No hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 9.** Resultados de la estandarización de hierro (II) de concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4	C5
1.0108	1.8019	2.1974	2.4172	3.0325

C: concentración experimental

Valor  $p (0.025) > 0.01$ , entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Fe (II).

#### 6.1.2. Hierro total

Los resultados correspondientes a la estandarización de hierro total se muestran en la Tabla 10 los cuales son expresados como concentración en g/l. No hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 10.** Resultados de la estandarización de hierro total de concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4	C5
0.5	1.5	3.5	5.0	6.5

C: concentración experimental

Valor  $p$  (0.217) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Fe total.

### 6.1.3. Cobre (II)

Los resultados correspondientes a la estandarización de cobre (II) se muestran en la Tabla 11 los cuales son expresados como concentración en g/l  $\pm$  desviación estándar. No hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 11.** Resultados de la estandarización de cobre (II) a concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4	C5	C6
1.2591	1.5417	2.0300	2.5439	3.8158	5.877

C: concentración experimental

Valor  $p$  (0.05) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Cu (II).

### 6.1.4. Tiosulfatos

Los resultados correspondientes a la estandarización de tiosulfatos se muestran en la Tabla 12 los cuales son expresados como concentración en g/l  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 12.** Resultados de la estandarización de tiosulfato a concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4
1.74 $\pm$ 0.45	2.64 $\pm$ 0.06	3.52 $\pm$ 0.05	5.84 $\pm$ 0.05

C: concentración experimental

Valor  $p$  (0.343) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$ .

### 6.1.5. Sulfatos

Los resultados correspondientes a la estandarización de sulfatos se muestran en la Tabla 13 los cuales son expresados como concentración en g/l  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 13.** Resultados de la estandarización de sulfatos a concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4	C5
3.3843 $\pm$ 0.007	3.8497 $\pm$ 0.007	5.4978 $\pm$ 0.007	7.1484 $\pm$ 0.007	8.8048 $\pm$ 0.007

C: concentración experimental

Valor p (0.056)  $>$  0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

### 6.1.6. Sulfitos

Los resultados correspondientes a la estandarización de sulfitos se muestran en la Tabla 14 los cuales son expresados como concentración en g/l  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 14.** Resultados de la estandarización de sulfitos a concentraciones conocidas g/l.

C1	C2	C3	C4	C5
0.4770 $\pm$ 0.0561	0.9446 $\pm$ 0.0620	1.4543 $\pm$ 0.1369	1.9594 $\pm$ 0.0580	2.3475 $\pm$ 0.0582

C: concentración experimental

Valor p (0.013)  $>$  0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

### 6.1.7. Azufre elemental

Los resultados correspondientes a la estandarización del azufre elemental (Tabla 15) no hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 15.** Resultados de la estandarización de azufre elemental (S).

Masa de S (g)	Masa de S extraído (g)
1.0223	0.9945
0.5593	0.5577
0.0557	0.0555

Valor  $p$  (0.386)  $>$  0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las tres masas de S.

## 6.2. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN MEDIO TIOSULFATO

Los resultados revelaron que la estandarización del medio tiosulfato no existe diferencia significativa en la repetición de las concentraciones experimentales al tiempo cero con respecto a las concentraciones teóricas después de un día, lo que mostró valor  $p >$  0.01, al 90% de confianza.

El resultado del análisis estadístico se detalla en el ANEXO 4, página 108.

### 6.2.1. Tiosulfatos

Se evaluó la técnica en medio tiosulfato en condiciones de esterilidad observada en la Tabla 16. La determinación de tiosulfato se realizó al tiempo cero (medio recién preparado) y a las 24 horas.

**Tabla 16.** Determinación de tiosulfato con medio tiosulfato no estéril.

Concentración experimental (C) de sulfatos g/l	$t_1 = 0$ h	$t_2 = 24$ h
<b>C1</b>	1.39 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.09
<b>C2</b>	2.56 $\pm$ 0.07	Contaminada
<b>C3</b>	3.54 $\pm$ 0.05	3.54 $\pm$ 0.04
<b>C4</b>	4.77 $\pm$ 0.06	4.27 $\pm$ 0.05
<b>C5</b>	6.04 $\pm$ 0.17	4.97 $\pm$ 0.19

Se evaluó la técnica en medio tiosulfato en condiciones de no esterilidad observada en la Tabla 17. La determinación de tiosulfato se realizó al tiempo cero (medio recién preparado) y a las 24 horas.

**Tabla 17.** Determinación de tiosulfato con medio tiosulfato estéril.

Concentración experimental (C) de sulfatos g/l	t <sub>1</sub> = 0 h	t <sub>2</sub> = 24 h
C1	1.45 ± 0.20	1.38 ± 0.24
C2	2.30 ± 0.06	2.33 ± 0.04
C3	3.65 ± 0.11	3.07 ± 0.02
C4	4.92 ± 0.02	4.79 ± 0.08
C5	5.81 ± 0.03	5.83 ± 0.09

Se evaluó la técnica en medio tiosulfato con y sin elementos traza observada en la Tabla 18. La determinación de tiosulfato se realizó al tiempo cero y a las 24 horas con la concentración de 5g/l de tiosulfato de sodio en medio tiosulfato estéril.

**Tabla 18.** Determinación de tiosulfato 5g/l con medio tiosulfato estéril.

Tiempo (horas)	Concentración experimental sulfatos con medio tiosulfato con ET g/l	Concentración experimental sulfatos con medio tiosulfato sin ET g/l
t <sub>1</sub> = 0	5.81 ± 0.03	6.34 ± 0.04
t <sub>2</sub> = 24	5.83 ± 0.09	6.22 ± 0.21

ET: elementos traza

### 6.3. TÉCNICAS CUALITATIVAS, CUANTITATIVAS Y ANÁLISIS DE VOLTAJE A LA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA DE DOS CÁMARAS

#### 6.3.1. CCM 1: Medio tiosulfato (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica)

**Etapa A:** Los iones identificados cualitativamente en el ánodo con bacterias, ánodo control, cátodo y cátodo control no mostraron diferencias por lo que los resultados se resumen en la Tabla 19. En ambos ánodos se encontró presencia de iones sulfatos, y en los cátodos se identificaron iones ferroso y férrico.

**Tabla 19.** Pruebas cualitativas en cada una de las cámaras de la CCM 1 y CCC 1 – Etapa A.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S^{2-}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$S_2O_3^{=}$	Positivo	-----	Negativo	-----
$SO_4^{=}$	Positivo	-----	Positivo	-----
$SO_3^{=}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$Fe^{3+}$	-----	Positivo	-----	Positivo
$Fe^{2+}$	-----	Negativo	-----	Positivo

-----: no se colocó

En la Tabla 20 se muestran los resultados teóricos al inicio correspondiente a la composición química inicial en la CCM 1 (ánodo y cátodo) y el análisis cuantitativo realizado al final de la reacción en la CCM 1 – Etapa A donde se reveló la presencia de sulfatos en el ánodo; iones ferroso y férrico en el cátodo. Los resultados en esta cámara no hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 20.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 1 – Etapa A

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	0.4682	-----	$4.28 \pm 0.23$	-----
$S^0$	-----	-----	< 0.05	-----
$Fe^{3+}$	-----	11.2	-----	4.5
$Fe^{2+}$	-----	-----	-----	5.5
<b>Fe total</b>	-----	11.2	-----	10

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

En la Tabla 21 se reportan los resultados teóricos al inicio, correspondiente a la composición química inicial en la CCC 1 (ánodo y cátodo), y los resultados cuantitativos realizados a la CCC 1 - Etapa A. Con estas pruebas se comprobó la producción de sulfatos un valor de 4.90 g/l en el ánodo. En cuanto a la producción de azufre elemental, tanto en el ánodo con bacterias como ánodo control se observó ligeramente sólidos amarillos

(característico de azufre elemental) en suspensión por lo que la extracción de azufre fue inferior a 0.05 g/l. En el cátodo se cuantificó iones ferroso y férrico. Las determinaciones en ésta cámara no hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

**Tabla 21.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 1 – Etapa A.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	0.4682	-----	$4.90 \pm 0.20$	-----
$S^0$	-----	-----	< 0.05	-----
$Fe^{3+}$	-----	11.2	-----	4.5
$Fe^{2+}$	-----	-----	-----	5.5
<b>Fe total</b>	-----	11.2	-----	10

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

**Etapa B:** Los iones identificados cualitativamente en el ánodo con bacterias, ánodo control, cátodo y cátodo control no mostraron diferencias por lo que los resultados se resumen en la Tabla 22. En ambos ánodos hubo presencia de iones sulfatos, mas no de iones tiosulfato lo que indicaría la oxidación de este. Los sulfatos dieron un precipitado blanco más abundante que al inicio por lo que sería señal de producción de sulfatos a partir de tiosulfato. En los cátodos se identificaron iones ferroso y férrico.

**Tabla 22.** Pruebas cualitativas en la CCM 1 y CCC 1 – Etapa B.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S^{-2}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$S_2O_3^{=}$	Positivo	-----	Negativo	-----
$SO_4^{=}$	Positivo	-----	Positivo	-----
$SO_3^{=}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$Fe^{3+}$	-----	Positivo	-----	Positivo
$Fe^{2+}$	-----	Negativo	-----	Positivo

-----: analito ausente

El análisis cuantitativo a las muestras del ánodo con bacterias y cátodo antes de iniciar y al finalizar la reacción (Tabla 23) revelaron la producción de sulfatos un valor de 2.69 g/l, menor cantidad con respecto al ánodo control.

**Tabla 23** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 1 – Etapa B.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	4.75	-----	$2.69 \pm 0.09$	-----
$S^0$	-----	-----	$< 0.05$	-----
$Fe^{3+}$	-----	5.6	-----	$0.5 \pm 0$
$Fe^{2+}$	-----	-----	-----	$5.5 \pm 0$
<b>Fe total</b>	-----	5.6	-----	$6 \pm 0$

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

Con respecto a los analitos del cátodo de la CCM 1 y CCC 1 (Tabla 24) no mostraron diferencias cuantitativas y tampoco hubo variación entre las repeticiones por lo que la desviación estándar fue nula.

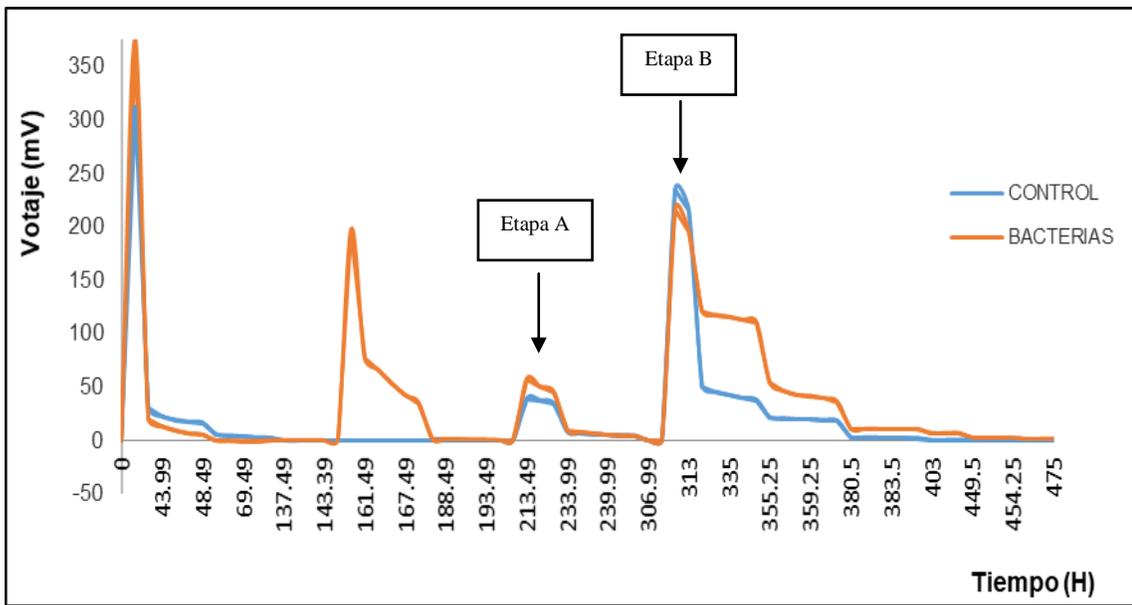
**Tabla 24.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 1– Etapa B.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	5.40	-----	$3.28 \pm 0.35$	-----
$S^0$	-----	-----	$< 0.05$	-----
$Fe^{3+}$	-----	5.6	-----	$0.5 \pm 0$
$Fe^{2+}$	-----	-----	-----	$5.5 \pm 0$
<b>Fe total</b>	-----	5.6	-----	$6 \pm 0$

-----: analito ausente

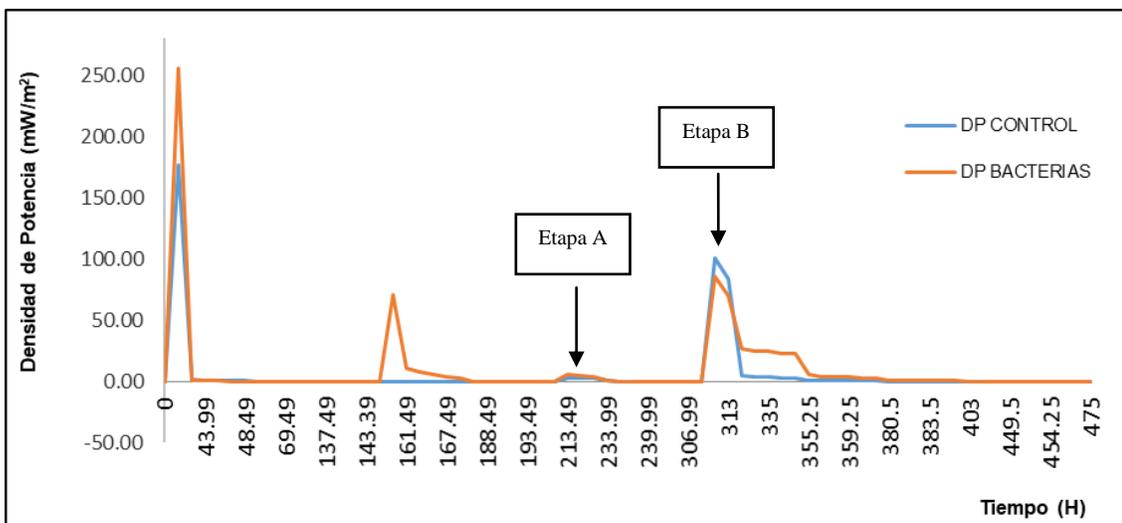
N.D.: No detectable

En base a la data de voltaje en función al tiempo de la celda con bacterias y celda control (ANEXO 5, página 113) se esquematizó el Gráfico 3 donde se observa que a las primeras horas del ingreso de solución catódica (Etapa A) se genera un incremento leve de voltaje a diferencia cuando se ingresa medio tiosulfato sin bacterias en el ánodo.



**Gráfico 3.** Voltaje & Tiempo (209 – 475 horas) – Etapa A y B de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.

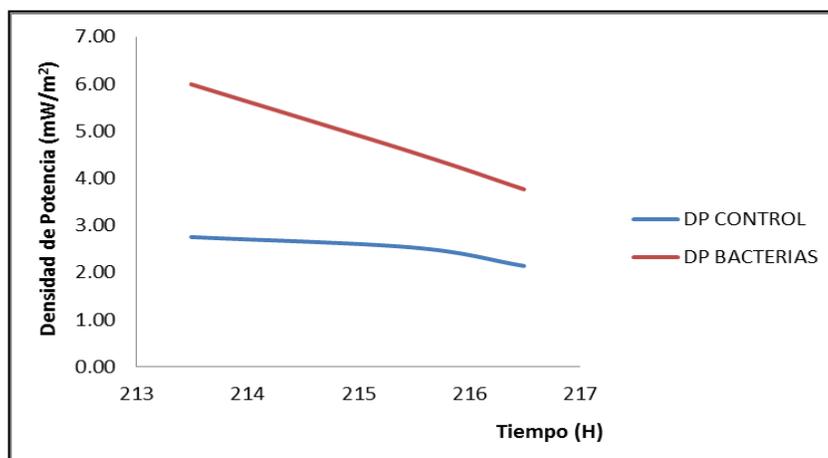
Se mostró un comportamiento similar al Gráfico 3 cuando se esquematizó Densidad de Potencia en función al tiempo (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Densidad de Potencia (DP) & Tiempo (209 – 475 horas) – Etapa A y B de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.

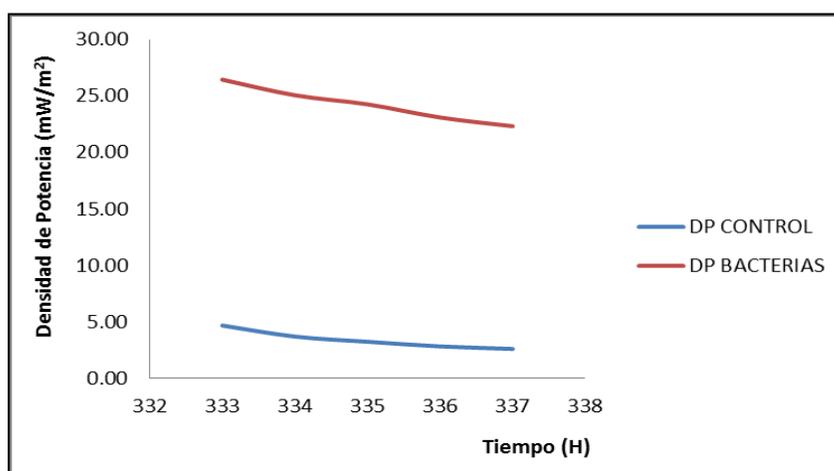
Se escogió un intervalo de tiempo donde aparece mayor estabilidad en cuanto a la densidad de potencia y por consecuencia la energía generada resulta un valor positivo. El intervalo

de tiempo para la Etapa A va desde las 213.49 horas hasta 216.49 horas tramo donde la CCM produce densidad de potencia promedio es  $4.77\text{mW}/\text{m}^2$  a comparación de la celda control,  $2.47\text{mW}/\text{m}^2$ , ver Gráfico 5.



**Gráfico 5.** Densidad de Potencia & Tiempo (213.49 – 216.49 horas) de una celda control y con bacterias en la Etapa A. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.

El intervalo de tiempo para la Etapa B va desde las 333.49 horas hasta 337 horas tramo donde la CCM produce densidad de potencia promedio es  $24.24\text{mW}/\text{m}^2$  a comparación de la celda control,  $3.41\text{mW}/\text{m}^2$ , ver Gráfico 6.



**Gráfico 6.** Densidad de Potencia & Tiempo (333 – 337 horas) de una celda control y con bacterias en la Etapa B. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución férrica.

### 6.3.2. CCM 2: Medio tiosulfato (cámara anódica) y solución cúprica (cámara catódica)

Los iones identificados cualitativamente en el ánodo con bacterias, ánodo control, cátodo y cátodo control no mostraron diferencias por lo que los resultados se resumen en la Tabla 25. En ambos ánodos hubo presencia de iones sulfatos, mas no de iones tiosulfato lo que indicaría la oxidación de este. Los sulfatos dieron un precipitado blanco más abundante que al inicio por lo que sería señal de producción de sulfatos a partir de tiosulfato. En los cátodos se identificaron iones ferroso y férrico.

**Tabla 25.** Pruebas cualitativas en la CCM 2 y CCC 2.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S^{-2}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$S_2O_3^=$	Positivo	-----	Negativo	-----
$SO_4^=$	Positivo	-----	Positivo	-----
$SO_3^=$	Negativo	-----	Negativo	-----
$Cu^{2+}$	-----	Positivo	-----	Negativo

-----: analito ausente

En la Tabla 26 se muestran los resultados teóricos al inicio, correspondiente a la composición química inicial en la CCM 2 (ánodo y cátodo), y el análisis cuantitativo realizado al final de la reacción en la CCM 2 donde se reveló un incremento en la producción de azufre elemental en el ánodo con bacterias el cual se determinó 10.37 g/l, y < 0.005 g/l de cobre (II) en el cátodo.

**Tabla 26.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 2.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^=$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^=$	0.49	-----	1.51 ± 0.13	-----
$S^0$	-----	-----	10.37	-----
$Cu^{2+}$	-----	0.25	-----	-----

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

Los resultados teóricos al inicio, correspondiente a la composición química inicial en la CCM 2 (ánodo y cátodo), y el análisis cuantitativo realizado al final de la reacción en la CCM 2 se reportan en la Tabla 27. En el ánodo control se cuantificó 3.45 g/l de sulfatos y en el cátodo control < 0.005 g/l de cobre (II).

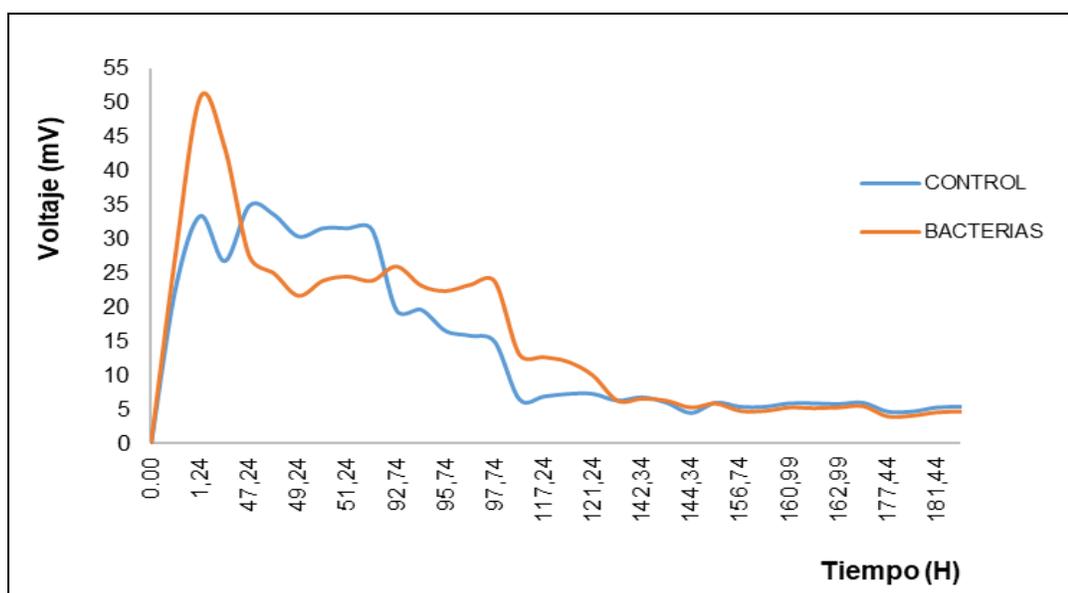
**Tabla 27.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 2.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	2.26	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	0.49	-----	$1.74 \pm 0.05$	-----
$S^o$	-----	-----	3.45	-----
$Cu^{2+}$	-----	0.25	-----	-----

-----: analito ausente

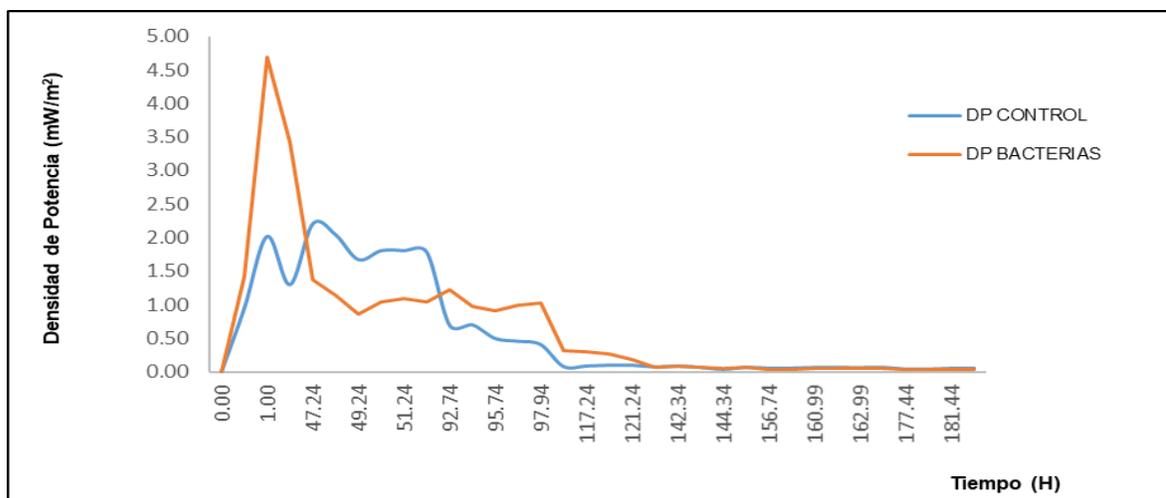
N.D.: No detectable

En base a la data de voltaje en función al tiempo de la celda con bacterias y celda control (ANEXO 5, página 113) se esquematizó el Gráfico 7 donde se observa un incremento de voltaje de la celda con bacterias a las primeras horas de reacción a diferencia del control.



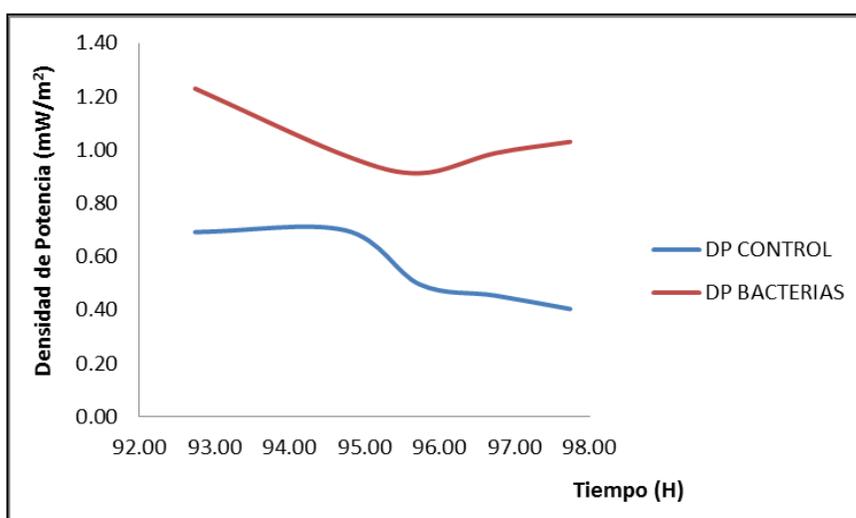
**Gráfico 7.** Voltaje & Tiempo (0 – 183.44 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.

En la Gráfica 8 muestra la densidad de potencia a lo largo de las 183.44 horas de funcionamiento la CCM y celda control. En este caso se observa que a las primeras horas de reacción la CCM produce un incremento de DP a diferencia de la celda control. Se escogió un intervalo de tiempo de 92.74 – 97.74 horas porque hay cierta estabilidad de la señal y la energía generada del sistema sale positiva.



**Gráfico 8.** Densidad de Potencia & Tiempo (0 – 183.44 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.

En la Gráfica 9 se observa la densidad de potencia en función al intervalo de tiempo escogido la cual DP Bacterias tiene una señal por encima de DP Control.



**Gráfico 9.** Densidad de Potencia & Tiempo (92.74 – 97.74 horas) de una celda control y con bacterias. Ánodo: medio tiosulfato y cátodo: solución cúprica.

### 6.3.3. CCM 3: Medio tiosulfato – ferroso (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica)

Se realizó el análisis cualitativo al medio tiosulfato – solución ferrosa y solución férrica componentes de la cámara anódica y catódica respectivamente de la CCM 3 y CCC 3.

La muestra de la CCCM 3 tuvo ligera coloración lechosa a diferencia de la CCC 3 la cual presentaba coloración transparente con restos de sólidos blanquecinos.

En la Tabla 28 se muestra los resultados de las pruebas cualitativas realizadas a la CCM 3 y CCC 3 evidenciándose que al final de la reacción óxido reducción se consume el ion tiosulfato en el ánodo y se oxida el ion ferroso a férrico; en el cátodo hubo reducción del ion férrico a ion ferroso.

**Tabla 28.** Pruebas cualitativas en CCM 3 y CCC 3.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S^{-2}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$S_2O_3^{=}$	Positivo	-----	Negativo	-----
$SO_4^{=}$	Positivo	-----	Positivo	-----
$SO_3^{=}$	Negativo	-----	Negativo	-----
$Fe^{3+}$	-----	Positivo	Positivo	Positivo
$Fe^{2+}$	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

-----: analito ausente

En la Tabla 29 se muestran los resultados teóricos al inicio, correspondientes a la CCM 3 (ánodo y cátodo), y los resultados cuantitativos al final de la reacción. Se reporta mayor producción de azufre elemental en la CCM 3 con respecto a su control.

**Tabla 29.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCM 3.

ANALITO	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	3.87	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	12.01	-----	$10.91 \pm 0.23$	-----
$S^0$	-----	-----	0.57	-----
$Fe^{3+}$	-----	5.6	$0.5 \pm 0$	$0.5 \pm 0$
$Fe^{2+}$	6.73	-----	$5.5 \pm 0$	$5.5 \pm 0$
<b>Fe total</b>	6.73	5.6	$6.0 \pm 0$	$6.0 \pm 0$

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

Los resultados cuantitativos realizadas a las CCC 3 se muestran en la Tabla 30. Las concentraciones iniciales y finales con respecto al ion ferroso, férrico y hierro total no muestran diferencia tanto para la CCM 3 y CCC 3.

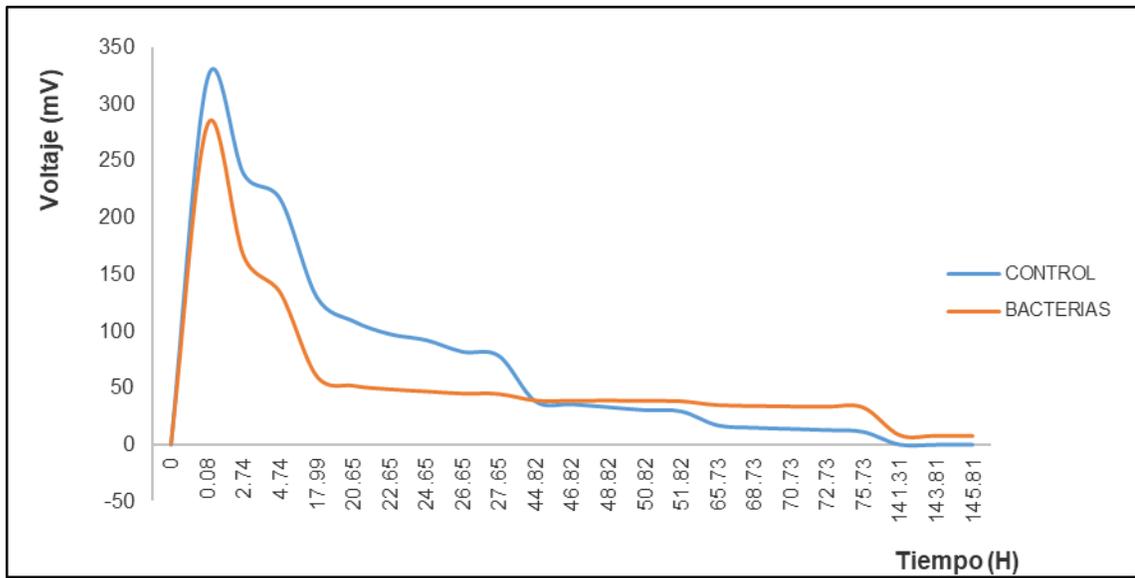
**Tabla 30.** Resultados cuantitativos en g/l de analitos presentes en la CCC 3.

Analito	INICIO		FINAL	
	Ánodo	Cátodo	Ánodo	Cátodo
$S_2O_3^{=}$	3.87	-----	N.D	-----
$SO_4^{=}$	12.01	-----	$10.70 \pm 0$	-----
$S^0$	-----	-----	N.D	-----
$Fe^{3+}$	-----	5.6	$0.5 \pm 0$	$0.5 \pm 0$
$Fe^{2+}$	6.73	-----	$5.5 \pm 0$	$5.5 \pm 0$
<b>Fe total</b>	6.73	5.6	$6.0 \pm 0$	$6.0 \pm 0$

-----: analito ausente

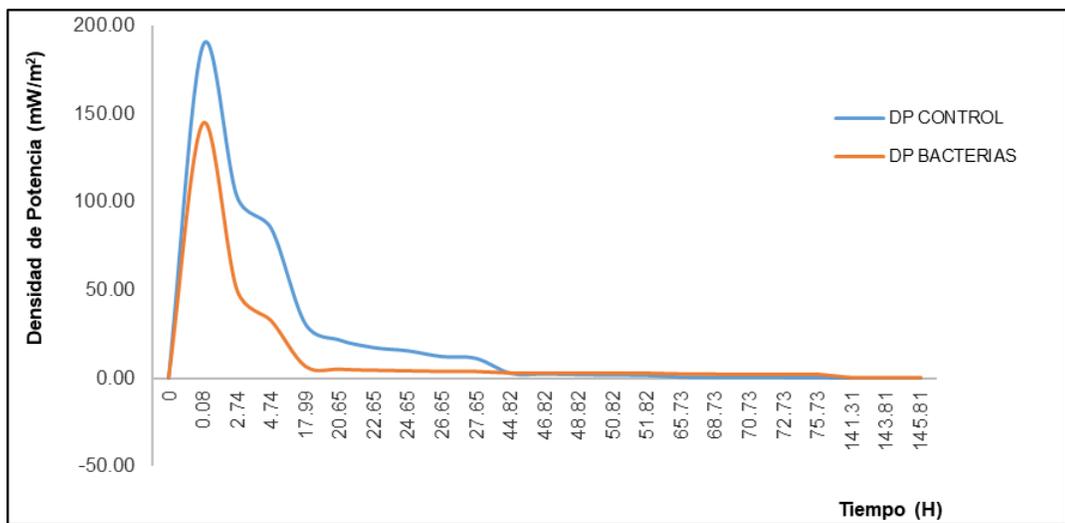
N.D.: No detectable

En base a la data de voltaje en función al tiempo de la celda con bacterias y celda control (ANEXO 5, página 113) se esquematizó el Gráfico 10 donde se observa que a las primeras horas de reacción un incremento del voltaje para el control; sin embargo, a las 44 horas el voltaje producido por las bacterias es constante en función al tiempo.



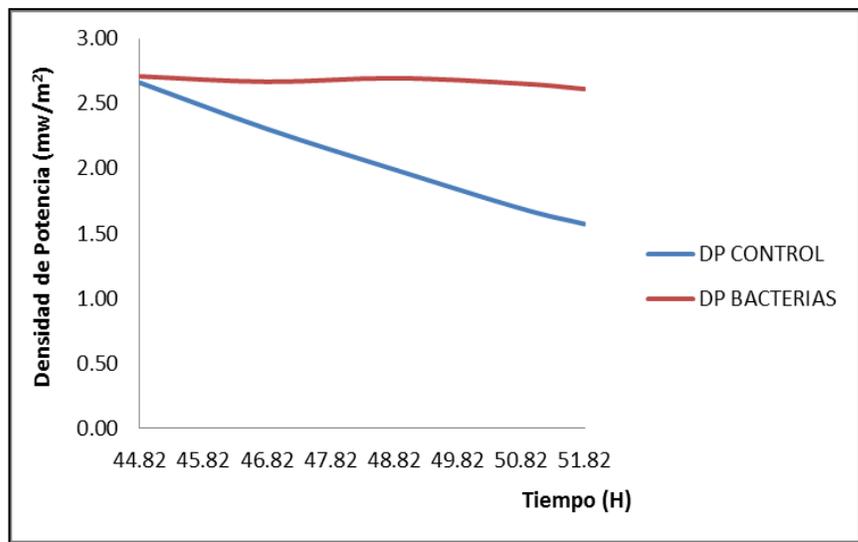
**Gráfico 10.** Voltaje & Tiempo (0 – 145.81 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato – solución ferrosa y cátodo: solución férrica.

En la Gráfica 11 se compara las densidades de potencia generadas en una CCM y celda control cuya composición en el ánodo es el medio tiosulfato - ferroso y en el cátodo, solución férrica. La gráfica está en función al tiempo de reacción en las celdas, un total de 145.81 horas. Se observa una ligera variación cuando hay presencia de bacterias en el ánodo a diferencia de la celda control generando a las primeras horas una señal más elevada; sin embargo, un intervalo de tiempo donde se aparece mayor estabilidad en cuanto a la densidad de potencia y por consecuencia la energía generada resulta un valor positivo.



**Gráfico 11.** Densidad de potencia & Tiempo (0 - 145.81 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: tiosulfato – ferroso y cátodo: férrico.

Realizando la Gráfica 12 que esquematiza la densidad de en función al intervalo de tiempo (44.82 – 51.82 horas) donde se observó cierta estabilidad nos resultó que la señal se mantiene cuando hay presencia de bacterias a comparación del control que la densidad de potencia va disminuyendo.



**Gráfico 12.** Densidad de potencia & Tiempo (44.82 – 51.82 horas) de una celda con bacterias y una celda control. Ánodo: medio tiosulfato – solución ferrosa y cátodo: solución férrica.

#### 6.4. ENERGÍAS GENERADAS EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE DOS CÁMARAS

La Tabla 31 resume las energías generadas por las bacterias en una CCM en los tiempos especificados en el apartado 5.1.4.5. La CCM 3 con 96.48 mJ produjo mayor energía cuando la composición en el ánodo hubo medio tiosulfato y solución ferrosa, mientras en el cátodo, solución férrica.

**Tabla 31.** Resumen de la energía generada por las bacterias en una CCM.

COMPOSICIÓN DE LA CCM	Energía generada
CCM 1: Medio tiosulfato (ánodo) y solución férrica (cátodo) Etapa A	1.13 mJ
CCM 1: Medio tiosulfato (ánodo) y solución férrica (cátodo) Etapa B	71 mJ
CCM 2: Medio tiosulfato (ánodo) y solución cúprica (cátodo)	4 mJ
CCM 3: Medio tiosulfato - solución ferrosa (ánodo) y solución férrica (cátodo)	96.48 mJ

#### 6.5. EFICIENCIA COULÓMBICA EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS DE DOS CÁMARAS

Se determinó la eficiencia coulombica a partir de las energías generadas entre la celda de combustible microbiana y celda de combustible control generando mayor eficiencia coulombica, 66.87 %, la CCM 3 en donde se añadió hierro en la cámara anódica, seguidamente la CCM 1 etapa A, 4.77%, cuyo ánodo se adicionó más medio tiosulfato a diferencia de la etapa B (Tabla 32).

**Tabla 32.** Eficiencias Coulómbicas de una CCM de dos cámaras en los medios analizados.

<b>COMPOSICIÓN DE LA CCM</b>	<b>% EFICIENCIA COULÓMBICA</b>
CCM 1: Medio tiosulfato (ánodo) y solución férrica (cátodo) Etapa A	4.77
CCM 1: Medio tiosulfato (ánodo) y solución férrica (cátodo) Etapa B	0.83
CCM 2: Medio tiosulfato (ánodo) y solución cúprica (cátodo)	0.03
CCM 3: Medio tiosulfato - ferroso (ánodo) y solución férrica (cátodo)	66.87

## **6.6. TÉCNICAS CUALITATIVAS, CUANTITATIVAS Y ANÁLISIS DE VOLTAJE A LA CELDA ELECTROLÍTICA PARA ANÁLISIS ELECTROQUÍMICO**

### **6.6.1. Celda Electrolítica (CE) con bacterias: Medio tiosulfato y solución férrica**

Antes de iniciar el análisis electroquímico en la CE con bacterias, hubo presencia de iones sulfato, tiosulfato, férrico y ferroso en el medio tiosulfato y solución férrica tal como se muestra en la Tabla 33, mientras que al finalizar la cronoamperometría se determinó la presencia de los iones mencionados anteriormente a excepción del tiosulfato. La muestra tuvo apariencia lechosa amarillenta la cual fue filtrada para analizar los sólidos presentes y el líquido resultante fue transparente. Este último se usó para los análisis cualitativos y cuantitativos.

**Tabla 33.** Resultados cualitativos antes y después de la cronoamperometría del medio tiosulfato y solución férrica de la CE con bacterias.

<b>Analitos</b>	<b>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>Fe<sup>+3</sup></b>	<b>Fe<sup>+2</sup></b>
<b>Inicial</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
<b>Final</b>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

Al finalizar la reacción química en la CE con bacterias se determinó cuantitativamente sulfatos, hierro (II), hierro (III) y la aparición de azufre elemental con 0.3 g/l a diferencia de la inicial. Los resultados en g/l se muestran en la Tabla 34.

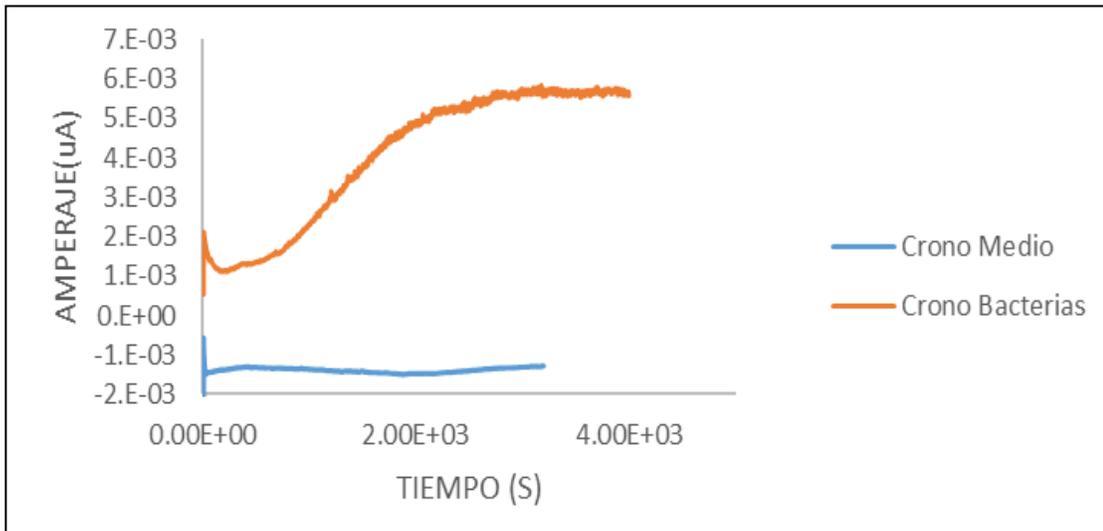
**Tabla 34.** Resultados cuantitativos antes y después de la cronoamperometría del medio tiosulfato y solución ferrosa de la CE con bacterias.

<b>Analitos</b>	<b>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>S<sup>o</sup></b>	<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	<b>Fe total</b>
<b>Inicial</b>	2.26	1.94	-----	1.4	-----	1.4
<b>Final</b>	N.D	3.99 ± 0.45	0.3	0.66 ± 0	0.84 ± 0	1.5 ± 0

-----: analito ausente

N.D.: No detectable

Los datos de amperaje (uA) y tiempo (s) resultantes de la cronoamperometría al medio tiosulfato y solución férrica, las cuales se evaluó una en ausencia de bacterias y otro medio en presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se emplearon para realizar la Gráfica 16 correspondientes a la señal de la técnica electroquímica mencionada. La cronoamperometría en ausencia de bacterias (línea celeste) evidencia una señal constante por debajo de cero mientras que la cronoamperometría en presencia de bacterias (línea roja) da una señal electroquímica que se incrementa y hace constante en función del tiempo.

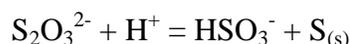


**Gráfica 13.** Cronoamperometría al medio tiosulfato y solución férrica en ausencia y presencia de bacterias (línea celeste: medio sin bacterias y línea roja: medio con bacterias).

## VII. DISCUSIÓN

Existe una variedad de estudios sobre celdas de combustible microbiana; sin embargo, este trabajo de investigación corresponde a un trabajo experimental en CCM empleando sustrato tiosulfato de sodio y *Acidithiobacillus ferrooxidans* como catalizador en la cámara anódica.

Las soluciones acuosas de tiosulfato de sodio, es decir, disueltas en agua, son resistentes a la oxidación por aire, pero tienden a descomponerse para dar azufre e ion sulfito ácido:



Siendo las variables que afectan a la estabilidad del tiosulfato de sodio la velocidad de reacción, el pH, la presencia de microorganismos, la concentración de la solución y la exposición de luz del sol. La velocidad de descomposición de esta solución aumenta considerablemente a medida que se acidifica el medio (Skoog *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, debido a que el medio tiosulfato, de la cámara anódica de una CCM, fue preparado a condiciones ácidas (pH = 3.5) y en presencia de bacterias ocurrió una descomposición hasta azufre elemental y sulfatos; sin embargo, en una CCC a pesar de la ausencia de las bacterias el tiosulfato siguió siendo inestable por lo que genera también sulfatos y azufre, en este caso se produjo concentraciones mayores de sulfatos a diferencia del medio tiosulfato con bacterias, esto puede deberse a que la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* metaboliza el tiosulfato siguiendo una vía final hasta la producción de azufre elemental mediante reacciones biológicas, mientras que en una CCC seguiría una ruta por oxidación química.

Según Skoog *et al.*, 2005 la causa más importante de inestabilidad del tiosulfato es debida a la acción de microorganismos como las bacterias, en este caso *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que son capaces de metabolizar el ion tiosulfato convirtiéndolos a sulfatos, sulfitos y azufre elemental. Hay otros factores que alteran la estabilidad de este ion como la exposición a la luz solar, en este caso se emplearon celdas de acrílico las cuales estuvieron expuestas a luz.

En este trabajo, con respecto a las pruebas cualitativas de la etapa A, en la CCM 1 y CCC 1 (Tablas 20) se obtuvo el mismo comportamiento para el anión tiosulfato en la cámara anódica ya que se consumió produciendo sulfatos. En la cámara catódica hubo una transformación de iones férrico a ferroso Comparando las pruebas cuantitativas en la CCM 1 y CCC 1 (Tablas 20 y 21) se corroboró que hubo mayor producción de sulfatos (4.90 g/l) en la cámara anódica control que la cámara anódica con bacterias (4.28 g/l).

En ambos ánodos se obtienen azufre elemental inferior a 0.05 g/l; sin embargo, es probable que el azufre haya precipitado sobre el ánodo y adherido a las paredes de la cámara, puesto que, el tiosulfato de sodio en medios fuertemente ácido se pone turbio casi de inmediato como consecuencia de la precipitación de azufre elemental (Skoog *et al.*, 2005).

En las cámaras catódicas se da la reducción de hierro (III) a hierro (II), al tratarse de condiciones ácidas, lo cual facilita su disolución. En ambas celdas se encontró 5.5 g/l de ion ferroso y como hierro total 10 g/l, este resultado es coherente ya que en la etapa A se añaden 2 ml adicionales de solución férrica en los cátodos habiendo al inicio una concentración de 11.2 g/l.

El ingreso de iones hidrógeno a través de la membrana de intercambio de protones hacia la cámara catódica genera agua ya que se encuentra a condiciones aeróbicas. De acuerdo a la literatura el  $O_2$  y  $Fe^{3+}$  son los aceptores terminales de electrones que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es capaz de usar en su cadena respiratoria de electrones para sostener su crecimiento bacteriano (Pronk *et al.*, 1990; Rawlings, 2005).

Con respecto a la etapa B, las pruebas cualitativas en la CCM 1 y CCC 1 (Tabla 22) muestran similitud en los resultados ya que hubo consumo de tiosulfatos en la cámara anódica y formación de ion ferroso en la cámara catódica de la CCM 1 y CCC 1. En este experimento se añadió 2 ml adicionales de medio tiosulfato sin inóculo de bacterias en las cámaras anódicas dando como resultado producción de sulfatos (Tablas 23 y 24); sin embargo, los valores muestran mayor generación de sulfatos (3.28 g/l) en la CCC 1 a comparación de la CCM 1 (2.69 g/l).

Con respecto al Gráfico 4, se evidencia un incremento en la densidad de potencia en la CCM 1 (DP bacterias) en comparación con la densidad de potencia de la CCC 1 (DP control), esto es probable por la acción de las bacterias sobre el sustrato tiosulfato de sodio ya que sirve de combustible y lo metaboliza en sulfatos y azufre elemental (Arias, 2015).

En la etapa B con respecto a la etapa A, se evidencia altos valores de densidad de potencia tanto para la celda control como para la celda microbiana, diferenciándose que esta última cae lentamente y a partir de las 333 horas se observó predominancia de la DP bacterias (Gráfica 6) con respecto al DP control. Este efecto es probable que ocurra por la adición de medio tiosulfato en el ánodo, mejor respuesta generó la celda microbiana, observándose una cierta estabilidad por lo que se evaluó en el rango de tiempo de las 333 horas hasta las 337 horas.

Por otro lado, la energía generada por la CCM 1 de la etapa A fue de 1.13 mJ (Tabla 31) mucho menor a la energía generada en la etapa B la cual fue de 71 mJ. Esto es posible debido a que en la segunda etapa hubo mayor cantidad de sustrato (tiosulfato de sodio) puesto que se añadió 2 ml adicionales de medio tiosulfato en la cámara anódica, mientras que en la etapa A no se añadió exceso en la cámara anódica sino en la cámara catódica. En este caso hay una variación directamente proporcional del sustrato anódico en función a la energía generada en la celda de combustible microbiana.

Al finalizar el proceso de óxido reducción en la CCM 2 y CCC 2 se desarmaron las cámaras de las celdas y se retiró todo el precipitado depositado en la cámara anódica, determinándose que era azufre elemental (Tablas 26 y 27). Se observa una ligera diferencia en cuanto a la producción de sulfatos a partir de tiosulfato; sin embargo, se genera tres veces más (10.37 g) de azufre elemental en la CCM 2. Estas diferencias significativas pueden deberse a la capacidad de la *Acidithiobacillus ferrooxidans* de oxidar el tiosulfato hasta azufre elemental. En la cámara catódica no se detectó iones cúprico al final de la reacción aunque hubo un precipitado color blanco suspendido en el cátodo lo que podría indicar la reducción del cobre (II) a cobre (I), puesto que las sales de iones cuproso son insolubles en soluciones acuosas; sin embargo, no se llegó a determinar porque no fue considerado dentro de la estandarización de las técnicas.

Cabe mencionar para la determinación de azufre elemental en la CCM 1 y CCM 3 con sus respectivos controles no se consideró el precipitado depositado en las paredes ni en el fondo de las celdas, y es muy probable que se haya producido en todas las celdas tal como se verificó en los ensayos de tiosulfato de sodio con bacterias en frascos observándose la turbidez y precipitación de sólidos blanquecinos medio amarillentos lo cual indica la presencia de azufre elemental.

Con respecto a las pruebas cualitativas de los compartimentos anódicos y catódicos de la CCM 3 y CCC 3 se reportaron (Tabla 28) el mismo comportamiento de los iones sulfatos, férrico y ferroso, registrándose la conversión de tiosulfatos a sulfatos, y la oxidación de ion ferroso a férrico en la cámara anódica. En la cámara catódica se evidenció la reducción del ion férrico a ferroso.

En cuanto a los resultados cuantitativos, al comparar la CCM 3 (Tabla 29) y CCC 3 (Tabla 30) se observa una ligera diferencia en cuanto a la producción de sulfatos a partir de tiosulfato ya que las concentraciones de sulfatos al inicio y al final permanece relativamente constante; sin embargo, ocurre paralelamente una oxidación de hierro (II) los cuales estarían actuando también como donadores de electrones (Kelly y Harrison, 1989). La oxidación biológica de los sustratos del medio, en este caso iones ferroso y tiosulfato estarían siguiendo un mecanismo indirecto puesto que las bacterias oxidan el catión ferroso soluble a catión férrico, que a su vez oxidaría químicamente al tiosulfato de sodio (Silverman *et al*, 2001; Zárate, 2015). En la CCM 3 se genera 0.57 g de azufre elemental mientras que en el control no se detectó, esto es posible por la oxidación biológica de las cepas *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta producción de azufre por estas cepas es respalda según lo investigado por Bounds y Colmer, 1972. Las concentraciones de hierro (II), hierro (III) y hierro total son idénticamente igual tanto en CCM 3 y CCC 3, al final de la reacción había una ligera disminución de la concentración de ion ferroso y aumento de ion férrico en el ánodo.

La conversión de la reducción del ion férrico a ferroso en la cámara catódica se da a concentraciones de 5.5 g/l tanto en la CCM 3 y CCC 3. La solubilidad de hierro en agua es favorecida en soluciones ácidas; sin embargo, el hierro (III) es insoluble en dichas

condiciones y es probable encontrarse precipitado de sales férricas sobre el cátodo o en el fondo del mismo (Aduvire, 2006).

Al comparar la densidad de potencia de la CCM 3 y CCC 3 (Gráfica 11) solo la DP bacterias genera mayor potencia por unidad de superficie del ánodo verificándose en el intervalo de 44.82 a 51.82 horas (Gráfica 12) es en este rango donde muestra mayor estabilidad de la señal. Esto se puede deber a la capacidad de las bacterias de metabolizar el tiosulfato y por consecuencia generar valores altos de potencial.

Se obtuvo 96.48 mJ de energía generada en la CCM 3 (Tabla 31) durante 145 horas atribuyendo este efecto porque es la única celda donde se añadió hierro (II) como analito adicional al medio tiosulfato de sodio. En este caso la adición de sulfato ferroso heptahidratado en la cámara anódica tuvo resultados positivos porque ha mejorado las densidades de potencia en la CCM 3 durante el tiempo puesto en marcha (Wei *et al.*, 2013).

Cabe resaltar que las tres gráficas correspondientes a comparación de densidad de potencia de la CCM y CCC (Gráfica 4, 8 y 11), la primera presenta una fase de latencia o adaptación lo que significaría que en esa etapa el microorganismo logra sintetizar todos los sistemas enzimáticos para activar su metabolismo de oxidación de tiosulfato de sodio. Por otro lado, los componentes del medio de cultivo aportan sulfato y tiosulfato garantizan fuentes de energía suficientes para lograr la adaptación del microorganismo (Zárate, 2015).

Tanto la CCM 3 y CCC 3 funcionaron a las mismas condiciones de temperatura, tiempo, pH, ausencia de oxígeno (ánodo) y concentración de sustrato con la diferencia que en la celda control el ánodo no contenía bacterias, mientras que en la celda de combustible microbiana sí hubo presencia de bacterias. Desde el tiempo cero hasta las 44 horas se observó un incremento en la densidad de potencia del control con respecto a la celda microbiana. Estas diferencias en las densidades de potencia de las celdas se pueden deber a que el inóculo de bacterias provenía de minerales de minas cuyas características son anaeróbicas y su hábitat presenta condiciones ácidas. Otro factor que puede afectar es que el cátodo funcionó en condiciones aeróbicas permitiendo la reducción del oxígeno hasta la formación de agua ya que se transportan los protones desde la cámara anódica hasta el

cátodo a través de la membrana catiónica (Pronk *et al.*, 1990; Rawlings, 2005). Adicional a esto ocurre la reducción de ion férrico en el cátodo.

Hay limitada información en base a los productos de oxidación de materiales de azufre por bacterias que oxidan compuestos reducidos inorgánicos de azufre; sin embargo, los investigadores Waksman y Starkey determinaron que el azufre y el tiosulfato llegan a oxidarse completamente a sulfato por *Thiobacillus thiooxidans*, aunque algo de azufre puede producirse a partir de tiosulfato y la vez produce reacciones secundarias debido a la alta acidez que se desarrolla en el medio (Starkey, 1934).

Por otra parte, la adición de sulfato ferroso heptahidratado en la cámara anódica de la CCM 3 generó un incremento en las densidades de potencia a comparación de la CCM 1 y CCM 2. Estudios han demostrado que la adición de sulfato ferroso en el medio anódico ha mejorado las densidades de potencia en la CCM (Wei *et al.*, 2013).

El medio tiosulfato y solución férrica (Tabla 8) fueron sometidos a una técnica de electrólisis, llamada cronoamperometría la cual se realizó en ausencia y presencia de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* donde se evidenció estabilidad en presencia de cepas a diferencia cuando estaban ausentes en la CE con bacterias. Estos resultados demostraron que en presencia de bacterias hubo una producción de corriente eléctrica mostrada en el Gráfico 13 debido a las reacciones de óxido reducción acontecidas en la CE con bacterias. Los resultados cualitativos del medio tiosulfato y solución férrica en la CE con bacterias mostrados en la Tabla 33 evidenció la conversión de tiosulfato en sulfatos y la reducción de ion férrico en ion ferroso dando positiva las reacciones de identificación de esos iones. En base a estos resultados se determinó de forma cuantitativa (Tabla 34) sulfatos, ion ferroso, hierro total e ion férrico. El precipitado lechoso amarillento en el medio de tiosulfato y solución férrica se cuantificó como azufre elemental dando 0.3 g/l. Se obtuvo 0.84 g/l de ion ferroso habiéndose convertido más de la mitad de la concentración de ion férrico, aunque cabe la posibilidad que el ion férrico se haya depositado en el electrodo ya que estas cepas son capaces de oxidar y reducir el hierro a condiciones ácidas (Nieto, 2009). Con estos resultados corroboramos la óxido reducción de los iones tiosulfato y férrico respectivamente imponiendo 440 mV a la CE.

## VIII. CONCLUSIONES

- En general, de las tres CCM y CCC analizadas químicamente, el mecanismo de oxidación de tiosulfatos conduce a la producción de sulfatos y azufre elemental. En la Etapa A de la CCM 1, sulfatos se produjo 4.28 g/l y en la CCC, 4.90 g/l de sulfatos. En la Etapa B de la CCM 1, sulfatos se produjo 2.69 g/l y en la CCC, 3.28 g/l de sulfatos. En las celdas mencionadas se cuantificó azufre elemental inferior a 0.05 g/l. En la CCM 2, sulfatos se determinó 1.51 g/l y 3.45 g/l de azufre elemental; en la CCC, 1.74 g/l de sulfatos y 10.37 g/l de azufre elemental. En la CCM 3, se cuantificó 10.91 g/l de sulfatos y 0.57 g/l de azufre elemental; en la CCC 3, 10.70 g/l de sulfatos e inferior a 0.05 g/l de azufre elemental.
- Los métodos analíticos estandarizados para analizar iones sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, ferrosos, hierro total y azufre elemental mostraron que no existe diferencia significativa en la repetitividad entre las concentraciones experimentales con respecto a las concentraciones teóricas (valor  $p > 0.01$ ), por lo que se infiere que fueron los adecuados para determinar los analitos presentes en los compartimentos de la CCM y CCC.
- La estandarización de tiosulfato empleando nutrientes para bacterias acidófilas como solvente permitió conocer la máxima concentración a trabajar (5g/l) en la CCM y CCC dando un valor  $p > 0.01$ .
- La determinación de los analitos en la cámara catódica con solución férrica de las CCM 1, CCC 1 (etapa B), CCM 3 y CCC 3 se obtuvo 0.5 g/l de hierro (III), 5.5 g/l de hierro (II) y 6 g/l de hierro total por lo que no se encontraron diferencias entre ellas. En la CCM 1 y CCC 1 (etapa A) se obtuvo 4.5 g/l de hierro (III), 5.5 g/l de hierro (II) y 10 g/l de hierro total.
- Es probable que la cámara catódica con solución cúprica de la CCM 2 y CCC 2 ocurra la reducción de cobre (II) a ion cobre (I).

- El uso de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la cámara anódica de la CCM 1 promueve un incremento de densidad de potencia promedio de  $4.77 \text{ mW/m}^2$  (Etapa A) en 3 horas a diferencia de la ausencia de estas cepas en la CCC 1 en el mismo tiempo,  $2.47 \text{ mW/m}^2$ ; en la Etapa B produjo un promedio de  $24.24 \text{ mW/m}^2$  en 4 horas a diferencia de la ausencia de estas cepas en la CCC,  $3.41 \text{ mW/m}^2$ .
- Los análisis de voltaje en función a la densidad de potencias evaluadas en las tres CCM con respecto a la CCC permitieron determinar la energía generada de los cuales sólo la CCM 3: medio tiosulfato - ferroso (ánodo) y solución férrica (cátodo) generó mayor eficiencia coulombica (66.87%) a comparación de la CCM 1 (Etapa A: 4.77% y Etapa B: 0.83%) y CCM 2 (0.03%).
- Se demostró que la presencia de iones ferroso en la cámara anódica contribuye a la producción de energía (96.48 mJ) y, por ende, a la Eficiencia Coulombica (66.87%) tal como se registró en la CCM 3.
- La cronoamperometría con bacterias del medio tiosulfato y solución férrica demostró la presencia de microorganismos electrogénicos.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- Continuar con la investigación a nivel de laboratorio, esta vez aplicada a aguas ácidas de drenaje de mina.
- Emplear cámaras con volúmenes más grandes que permitan una mejor cuantificación de los analitos producidos en el óxido – reducción de la celda de combustible microbiana.
- Emplear instrumentación más exacta para identificar y cuantificar todos los analitos presentes en cada compartimento de la celda de combustible microbiana.
- Estudiar el metabolismo microbiano a diferentes concentraciones de tiosulfato de la bacteria acidófilas empleada en la celda de combustible microbiana.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcántara S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa.
2. Aduvire O. (2006). Tratamiento de aguas ácidas de mina. Drenaje ácido de mina. Generación y tratamiento.
3. Aguilar – González M., Buitrón G., Shimada – Miyasaka A., Mora – Izaguirre O. (2016). Estado actual de los sistemas bioelectroquímicos: Factibilidad de su uso para aumentar la producción ruminal de propionato. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 50:2, 149 – 166.
4. Allen, R. y Bennetto, H. (1993). Microbial fuel cells: electricity production from carbohydrates, Appl. Biochem. Biotechnol. 39:27 – 40.
5. Angelov A., Nikolova K., Bratkova S. (2013). Development of microbial fuel cell for treatment of mining wastewater. Conference paper. Proceedings of the XV Balkan mineral processing congress, Sazopol, Bulgaria, June 12 - 16.
6. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1998). Washington: 20<sup>th</sup> Edition.
7. Arias V, Lovera D, Gil J, Ramírez L y Cayo H. (2015). Biooxidación de tiosulfato como mecanismo indirecto para la lixiviación de minerales mediante cepas nativas acidófilas. Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM., 18, 61-67.
8. Bard A., Faulkner L. Electrochemical methods fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Inc. 2<sup>nd</sup> ed. 2001.
9. Bond D., Lovley D. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1548 - 1555.
10. Bounds H. and Colmer A. (1972). Comparison of the kinetics of thiosulfate oxidation by three iron-sulfur oxidizers. Canadian Journal of Microbiology. 18: 735 – 740.
11. Bower K. (2001). “The Paired T-Test Using MINITAB”. Scientific Computing and Instrumentation.

12. Buitrón G., Pérez J. (2011). Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: efecto de la distancia entre electrodos. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas, 14 (1): 5 – 11.
13. Camargo A., Aperador W., Rios, Ortiz C., Vera E. (2009). Caracterización mediante espectroscopia de impedancia electroquímica de películas anódicas crecidas sobre Al 2024-T3. Revista Colombiana de Física, 41:2, 261 – 263.
14. Cancino M. (2002). Estudio del crecimiento y respiración de *Thiobacillus sp.* Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.
15. Carbajosa S, Malki M, Caillard R, López M, Palomares J, Martín-Gago J, et al. (2010). Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferroxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. Biosensors and Bioelectronics, 26, 877-880.
16. Cedrón J., Landa V., Robles J. (2011). Química general. Pontificia Universidad Católica del Perú. Disponible en:  
<http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/index.html>
17. Chaparro L. (2015). Drenajes Ácidos de Mina Formación y Manejo. Revista ESAICA, 1, 53-57.
18. Chaudhuri SK., Lovley DR. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. Nature Biotechnology. 21(10):1229-32.
19. Cohen B. (1931). The bacterial culture as an electrical half – cell. Journal of Bacteriology. 21:18 – 19.
20. Comisión de las comunidades europeas. Propuesta de reglamento del parlamento europeo y del consejo relativo a los abonos. 2001, Bruselas, Vol. III, 49-51.
21. Cornejo A. (2017). Estudio del microbioma presente en celdas de combustible microbianas. Memoria de la especialidad de Ingeniería Ambiental. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C. – Cideteq.
22. Delaney G., Bennetto H., Mason J., Roller S., Stirling J., Thurston C. (1984). Electron – transfer coupling in microbial fuel cells. 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism – mediator – substrate combinations. Journal of Chemical Technology and Biotechnology MB, 34 (B): 10 – 27.

23. Del Campo A. (2015). Valorización energética y tratamiento de efluentes residuales mediante celdas de combustible microbiológicas. Memoria para optar el título de doctor. Universidad Castilla – La Mancha.
24. Díaz P. (2007). Estudio de la actividad oxidativa y crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de ion ferroso en presencia de carbón activado. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile.
25. Di Salvo, E. A., Videla, H. A. y Arvã-a, A. J. (1979b). Kinetic model of a depolarization type bioelectrochemical fuel cell, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 104(C): 493 – 508.
26. Di Salvo, E. A., Videla, H. A. (1979a). Relation between biological parameters and the bioelectrochemical fuel – cell response, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 104(C): 185 – 195.
27. Durán M, Jiménez A y Martel F. (2001). Tratamiento biológico de aguas ácidas de minería: selección de una población bacteriana enriquecida en bacterias sulfatoreductoras. *Artículos técnicos: Tecnología del agua*, 209, 56-60.
28. Dopson M., Johnson B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur – metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14, 2620-2631.
29. ElMekawy A., Srikanth S., Bajrachayra S., Hegab H., Singh Nigam P., Singh A., Mohan S., Pant D. (2014). Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): The synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Research International*, 73: 213 – 225.
30. Elsom D. *La contaminación atmosférica*. Madrid: Ediciones Cátedra; 1990.
31. Espinosa J, Revah S y Le Borgne S. (2010). Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitioautótrofas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensajero Bioquímico*, XXXIV, 101-120.
32. Farias G., Cercado – Quezada B., Asaff S., Reyes – Vidal, Y. (2015 – 2016). *Sistemas Innovadores para obtener energías renovables*. Innovation Match MX

- 2015 – 2016 1er Foro Internacional de Talento Mexicano. Articulando Conocimiento Global.
33. Farias, N. (2016). Análisis técnico – económico de la tecnología de celdas de combustible microbianas para la producción de energías alternas. Memoria de la especialidad de Ingeniería Ambiental. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C. – Cideteq.
34. Fernández R. (1986). Abandono de minas impacto hidrológico. IGME. Imprenta IDEAL, S.A.
35. Fornero, J.; Rosenbaum, M.; Angenent, L. (2010). Electric power generation from municipal, food, and animal wastewaters using microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 22: 832 -843.
36. Fuentes – Albarrán C., A. Del Razo K., Juarez, Alvarez – Gallegos. (2012). Influence of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and O<sub>2</sub> on power generation from microbial fuel cells with non-catalyzed carbon electrodes and natural inocula. *Solar Energy*, 86 (4): 1099 – 1107.
37. G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham and R. C. Denney. (1989). *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. New York: Longman Scientific & Technical.
38. Galicia G. (2016). Evaluación de la eficiencia de operación de una celda microbiana de biocombustible utilizando sistemas electrónicos. Tesis para optar el título de ingeniero eléctrico electrónico. Universidad Autónoma de México.
39. García – Muñoz J., Amils R., Fernández V., De Lacey A., Malki M. (2011). Electricity generation by microorganisms in the sediment – water interface of an extreme acidic microcosm. *International Microbiology*, 14: 73 – 81.
40. Garfias F. La interfase electrodo – electrolito y el modelo de la doble capa. Universidad Nacional Autónoma de México.
41. Guerrero C. Influencia de la actividad minera en la cuenca del rio Ramis – Puno. Sector Energía y Minas – INGEMMET. Perú 2012 [diapositivas]
42. Guía Ambiental para el Manejo de Drenaje Ácido de Minas. Disponible en URL: <http://www.ingenieroambiental.com/4014/compendio-drenaje.pdf>

43. Habermann W, Pommer EH. (1991) Biological fuel cells with sulphide storage capacity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 35: 128 – 133.
44. Hansford G., Vargas T. (2001). Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, 59: 135 – 145.
45. Hernández F., Perez A. Lozano L. “Montaje y estudio de una pila de combustible microbiana para la producción de electricidad con depuración simultánea de aguas residuales.” *ReserchGate*, 2015.
46. Hoogers G. (2003). *Fuel Cell Technology Handbook*. CRC Press LLC.
47. Horizonte Minero. *Revista Internacional de Minería y Energía*. Tratamiento de Drenaje Ácidos de Mina. Disponible en URL: <http://www.horizonteminero.com/>
48. Huitzil T. (2010). Generación de electricidad empleando *Geobacter Sulfurreducens*. Memoria de la especialidad de Ingeniero Eléctrico – Electrónico. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
49. Kelly, D. P. and A. P Harrison. (1989). *Thiobacillus*. **In**. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* J. G. Holt. ed. Aerobic chemolithtrophic bacteria and associated organisms. Section 20, 3: 1842 - 1858.
50. Koivuniemi K. (2016). Bioelectricity production from simulated mining and forest industry wastewaters in microbial fuel cells. Memory of Master of Science Thesis. Tampere University of Technology.
51. Laminie J., Dicks A. (2000). *Fuel Cell Systems Explained*. Willey, New York.
52. Lee M., Senios J., Grossman M. (1995). Sulfur- specific microbial desulfurization of stencally hidered analogs of o-benzothipheno. *App. Envirom. Microbial.*, 61: 4362 – 4366.
53. Li X., Sheng G., Yu H. Chapter 14: Electricity Generation from food industry wastewater using microbial fuel cell technology. London, UK. Elsevier Academic Press. C14. P. 249 – 26, 2013b.
54. Liu Q., Liu B., Wei L., Zhao X., Zuo W. and Xing D. (2017). Impact of Ferrous Iron on Microbial Community of the Biofilm in Microbial Fuel Cells. *Front Microbiol*. V8.

55. Logan B., Hamelers B., Rozendal R., Schröder U., Keller J., Freguia, S., Rabaey, K. "Microbial fuel cells: methodology and technology". Environmental Science and Technology, Vol. 40. P. 5181-5192, 2006.
56. Logan B., Regan M. (2006b). Electricity – producing bacterial communities in microbial fuel cells. Trends Microbiol. 14: 512 – 518.
57. Logan B. Willey – Interscience. New Jersey. 2008.
58. Luo Y., Zhang R., Liu G., Li J., Li M., Zhang C. (2010). Electricity generation from indole and microbial community analysis in the microbial fuel cell. Journal of Hazardous Materials, 176: 759 – 764.
59. Martínez R. (2006). Determinación electroquímica del coeficiente de difusión para Gd (III). Tesis para obtener el título de Ingeniero en Ciencia de los Materiales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
60. Menadier M. (2009). Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile.
61. Montero R. L. y Martínez M. (2014) Composición físico-química de aguas ácidas procedentes de dos minas de carbón: Lobatera, Estado Táchira, Venezuela. Rev. Fac. Ing. UCV, 29, 55-66.
62. Ni G, et al., Electricity generation from an inorganic sulfur compound containing mining wastewater by acidophilic microorganisms, Research in Microbiology (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.04.010>.
63. Nieto P. (2009). Sistemas de captación y transporte de hierro en *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Efecto de la biodisponibilidad de hierro sobre la expresión génica. Universidad de Chile.
64. Oddi L. A. Determinación de metales mayoritarios en monedas argentinas [tesina de licenciatura]. Buenos Aires: Univ. de Belgrano; 2010.
65. Ortiz – Martínez V., Salar – García M., de los Ríos A., Hernández – Fernández F., Egea J., Lozano L. (2015). Development in microbial fuel cell modeling. Chemical Engineering Journal, 271: 50 – 60.

66. Pant D., Singh A., Van Bogaert G., Olsen I., Singh P., Diels L., Vanbroekhoven K. (2012). Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances*, 2: 1248 – 1263.
67. Pistonesi C., Haure J., D'Elmar R. *Energía a partir de las aguas residuales*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe, 2010.
68. Ponce J. (2007). Caracterización de un tiosulfato azufre transferasa (rodonasa) del microorganismo quimiolitotrófico *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Memoria entregada para optar al título profesional de Bioquímico. Universidad de Chile.
69. Potter, M. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Royal Society Publishing*, 84 (571):260 – 276.
70. Pronk J, Meulenber R, Bos P and Kuenen J. (1990). Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by *acidophilic thiobacilli*. *FEMS Microbiology Letters*, 75, 293-306.
71. Quatrini R., Appia – Ayme C., Denis Y., Ratouchniak J., Veloso F., Valdes J., Lefimil C., Silver S., Roberto F., Orellana O., *et al.* (2006). Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy*, 83:263 – 272.
72. Raffo E., Rojas O., Rojas J. (2007). Cálculo de áreas de superficies irregulares aplicando el software Matlab® y Autocad®. *Ind. data*, 10(2):54 – 61.
73. Rahimnejad M., Ghoreyshi A., Najafpour G., Younesi H., Shakeri M. (2012). A novel microbial fuel cell stack for continuous production of clean energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:5992 – 6000.
74. Rawlings, D.E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* 4, 13.
75. Raymod Chang y Kenneth A. Goldsby. (2013). *Electroquímica*. En *Química* (776-799). México: Mc Graw-Hill.

76. República del Perú, Ministerio de Energía y Minas – MINEM (2006). Guía Ambiental para el Manejo de Drenaje Ácido de Minas.
77. Resumen ejecutivo. Plan Energético Nacional 2014 – 2025. Documento de trabajo. MINEM, Dirección General de Eficiencia Energética.
78. Revelo D., Hurtado N., Ruiz J. (2013). Celdas de combustible microbianas (CCMS): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información Tecnológica*, 24(6): 17 - 28.
79. Roller SD, BennettoHP, Delaney GM, Mason JR, Stirling JL, Thurston CF. Electron – transfer coupling in microbial fuel cells: 1. Comparison of redox – mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *Journal Chemical Technology Biotechnology*.
80. Romero M, Vásquez J y Lugo A. (2012). Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Tecnura*, 16, 118-143.
81. S. Douglas y W. Donald. (1986). *Introducción a la Química Analítica*. México: Editorial Reverté.
82. Saavedra, S. (2012). Diseño de una celda de combustible microbiológica con uso de bacterias oxidantes de azufre y hierro. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero en Biotecnología. Universidad de Chile.
83. Shu S., Majumdar A. (2012). Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature*, 488, 294-303.
84. Shukla AK, Suresh P, Berchmans S, Rajendram A. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Curr Sci India*, 87(4): 455- 468.
85. Skoog D. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edición. Ediciones Paraninfo S.A.
86. Sutton S. (2011). Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*, 17(1):46 – 49.
87. Suzuki S. (1976). Fuel cells with hydrogen forming bacteria. *Hosp Hyg Gesundheitswes Desifekt*. 68:159.

88. Suzuki I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45, 97-105.
89. Starkey R. (1934). Products of the oxidation of thiosulfate by bacteria in mineral media. *The Journal of General Physiology*, 325 – 349.
90. Tremblay P., Zhang T. (2015). Electrifying microbes for the production of chemicals. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1 – 10.
91. V. Alexeiev. (1975). *Semimicroanálisis Químico Cualitativo*. URSS: Editorial Mir Moscú.
92. Villar – Lázaro R., López –Martínez C., Cussó – Pérez F., 2014. Fundamentos físicos de los procesos biológicos. Volumen III. Editorial Club Universitario. Pág. 64 – 70. San Vicente, España.
93. Wang C., Chen W., Huang R. (2010). Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 7217 – 7223.
94. Wang H., Ren Z. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31: 1796 – 1807.
95. Watling H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review. *Hydrometallurgy*, 84: 81 – 108.
96. Wei L., Han H., Shen J. (2013). Effects of temperature and ferrous sulfate concentrations on the performance of microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy* 38 11110–11116.
97. Weibel MK, Dodge C. (1975). Biochemical fuel cells. Demonstration of an obligatory pathway involving an external circuit for the enzymatically catalyzed aerobic oxidation of glucose. *Arch Biochem Biophys*, 169 (1): 146 – 151.
98. Whitten K., Davis R., Peck L., Stanley G. (2008). *Química*. Cengage Learning. Octava edición.
99. Zárata E. (2015). Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* en sustrato hidrófobo de azufre. Informe final de proyecto de investigación. Universidad Nacional del Callao.

100. Zhdanov S. I., Bard A. J. (1975). Sulfur. En Encyclopedia of the Elements. New York, Basel: Marcel Dekker, pp. 273 -360.
101. Vairavamurthy A., Manowitz B., Luther G., Jeon Y. (1993). Oxidation state of sulfur in thiosulfate and implications for anaerobic energy metabolism. *Geochim Cosmochim Acta*57: 1619 – 1623.

## **XI. ANEXOS**

## ANEXO 1. MATERIAL DE LABORATORIO, REACTIVOS, EQUIPOS E INSTRUMENTOS

### 1. Material de laboratorio

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Erlenmeyer 125 ml, 250 ml        | <input type="checkbox"/> Pastilla magnética                 |
| <input type="checkbox"/> Fiolas 25, 50, 100, 250 ml y 1 l | <input type="checkbox"/> Propipeta                          |
| <input type="checkbox"/> Vasos precipitados 50 y 100 ml   | <input type="checkbox"/> Baguetas                           |
| <input type="checkbox"/> Probeta 10, 25 y 100 ml          | <input type="checkbox"/> Embudo                             |
| <input type="checkbox"/> Pipeta aforada 1, 2.2, 25 ml     | <input type="checkbox"/> Aro de metal                       |
| <input type="checkbox"/> Pipetas graduadas 1, 5 y 10 ml   | <input type="checkbox"/> Pinzas de metal                    |
| <input type="checkbox"/> Bureta de 50 ml                  | <input type="checkbox"/> Espátula                           |
| <input type="checkbox"/> Soporte universal                | <input type="checkbox"/> Papel filtro análisis cuantitativo |
| <input type="checkbox"/> Nueces y pinzas                  | 1246, 125 mm  |
| <input type="checkbox"/> Desecador                        |   |

### 2. Reactivos

- Agua destilada
- Agua desionizada P.A
- Cloruro de bario dihidratado –  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  P.A
- Ácido sulfúrico ACS, ISO, Reag. Ph Eur
- Ácido clorhídrico 37% ACS, ISO, Reag. Ph Eur
- Hidróxido de amonio concentrado ACS, ISO
- Peróxido de hidrógeno P.A
- Ácido acético glacial P.A
- Indicador difenilamina P.A
- Indicador murexide P.A
- Hidróxido de sodio P.A
- Ácido fosfórico –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% P.A
- Disulfuro de carbono –  $\text{CS}_2$  (Scharlau, ACS)
- Permanganato de potasio –  $\text{KMnO}_4$  0.1 N (Merck) P.A

- Dicromato de potasio –  $K_2Cr_2O_7$  0.1 N (Merck) P.A
- Sulfato ferroso heptahidratado –  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (J. T. Baker) P.A
- Sulfato férrico hidratado –  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$  (Himedia) P.A
- Tiosulfato de potasio pentahidratado –  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  (Merck) ACS, ISO, Reag. Ph Eur
- Sulfato de cobre pentahidratado –  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (CDH) P.A
- Estaño – Sn P.A
- Yoduro de potasio – KI (Himedia) P.A
- Yodato de potasio –  $KIO_3$  (Himedia) P.A
- Tiocianato de amonio –  $NH_4SCN$  (Himedia) P.A
- Oxalato de sodio –  $Na_2C_2O_4$  (Merck) P.A
- Solución de almidón (Himedia) P.A
- Silica gel (CDH)

### **3. Equipos e instrumentos**

- Plancha eléctrica (Práctica)
- Agitador magnético (Mistral)
- Balanza analítica con cuatro decimales (Sartorius)
- Balanza electrónica con dos decimales (Scout™ Pro)
- Potenciómetro (Mettler Toledo Inlab® Expert Pro – ISM)
- Estufa (Mettler)
- Mufla (Vulcan™ A – 550)
- Campana extractora de gases (Fisher Hamilton)

**ANEXO 2. PROCEDIMIENTOS DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS EN  
LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM) Y CELDA DE  
COMBUSTIBLE CONTROL (CCC)**

**1. Determinación permanganométrica de hierro (II) por el método Zimmermann – Reinhard** (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)

Se colocó 1 ml de muestra en un matraz, se añadió 1 gota de SnCl<sub>2</sub> 20%, HgCl<sub>2</sub> hasta formación de precipitado, 1 ml de solución manganeso fosfórica, y se valoró con KMnO<sub>4</sub> 0.1 N hasta ligera coloración rosada permanente. El ensayo se realizó por triplicado.

$$\text{g/l Fe} = \frac{56 \times (V \times N) \text{ KMnO}_4 \times 1000}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde:

V = volumen (ml) de KMnO<sub>4</sub>

N = normalidad (N) de KMnO<sub>4</sub>

V<sub>muestra</sub> = volumen (ml) de la muestra

**2. Determinación de hierro total: Titulación con dicromato de potasio** (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)

Se colocó 1 ml de muestra en un matraz, 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, se tapó y calentó en la plancha hasta ebullición, se añadió solución de SnCl<sub>2</sub> 20% hasta de colorar el hierro. Se lavó con agua la tapa y las paredes del matraz. Se añadió 2 ml de HgCl<sub>2</sub> y 2 ml de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1) más 3 gotas del indicador difenilamina. Se tituló con la solución K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1 N hasta coloración azul o violeta verdosa persistente. El ensayo se realizó por triplicado.

$$\text{g/l Fe total} = \frac{VK_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 0.01 \times 1000}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde:

VK<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = volumen (ml) de dicromato de potasio

V<sub>muestra</sub> = volumen (ml) de muestra

### 3. Determinación de hierro (III)

$$[\text{Fe (III)}] = [\text{Fe total}] - [\text{Fe (II)}]$$

Donde:

[Fe (II)] = concentración (g/l) de hierro (II)

[Fe total] = concentración (g/l) de hierro total

[Fe (III)] = concentración (g/l) de hierro (III)

### 4. Determinación Iodométrica de cobre (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998)

En un matraz de 125 ml se añadió 1 ml de muestra con 0.2 ml de ácido acético glacial.

Se añadió 0.2 g KI disueltos en 5 ml de agua destilada. Se cubrió el matraz con una luna de reloj y se dejó reposar por dos minutos. Luego se procedió a valorar con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1N hasta un color amarillo claro. Se agregó 1 ml de almidón y se continuó titulando hasta que el color vire hacia azul claro, en dicho momento se adicionó 0.08 g de tiocianato de amonio pulverizado y finalmente se titula hasta la desaparición total del color azul. El ensayo se realizó por triplicado.

$$\text{g/l Cu} = \frac{63.5 \times (\text{V} \times \text{N}) \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 1000}{\text{Vmuestra}}$$

Donde:

V = volumen (ml) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

N = normalidad (N) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Vmuestra = volumen (ml) de la muestra

### 5. Determinación de azufre elemental: Extracción y determinación cuantitativa de azufre elemental – Método 8.5 (Propuesta de Reglamento del Parlamento europeo y del consejo relativo a los abonos, 2001)

La muestra sólida (libre de impurezas solubles en agua) se depositó en el cartucho de papel filtro y se colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet. El balón se pesó con 3 perlas de vidrio, se añadió 100 ml de  $\text{CS}_2$  y extrajo durante 4 – 5 horas. El solvente se recuperó por destilación simple. Se secó el matraz en una estufa a  $90^\circ \text{C}$  hasta peso constante, y mediante una diferencia de pesos

entre el balón y el residuo se obtuvo el azufre extraído. Se realizó una medición por cada cámara anódica.

$$g/l S = \frac{MS_{\text{extraída}} \times 1000}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde:

$V_{\text{muestra}}$  = volumen (ml) de la muestra

$MS_{\text{extraída}}$  = masa (g) de azufre extraída

#### 6. Determinación de sulfatos en minerales: Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989)

Se colocó 1 ml de muestra en un vaso de 50 ml y añadió 1 ml de solución  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ , se diluyó con 20 ml de agua destilada, se procedió a calentar por 1 hora. Se filtró en papel sin cenizas y lavó con agua destilada caliente. Se añadió al filtrado 2 gotas de  $AgNO_3$  0.1 N para descartar la presencia de cloro. En una cápsula de porcelana, previamente pesada, se introdujo el papel filtro doblado y seco. Se calcinó la cápsula por media hora en mechero Bunsen. Luego se dejó por dos horas en la mufla a  $900^\circ C$ . Se obtuvo cenizas blancas de  $BaSO_4$ . El ensayo se realizó por triplicado.

$$g/l SO_4^{2-} = \frac{M_{\text{cenizas}} \times (96.06/233.43) \times 1000}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde:

$M_{\text{cenizas}}$  = masa (g) de  $BaSO_4$

$V_{\text{muestra}}$  = volumen (ml) de la muestra

#### 7. Determinación de sulfitos: Método gravimétrico Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989)

Se colocó 1 ml de muestra en un vaso de 50 ml en baño maría. Se añadió 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno amoniacal en exceso. Se diluyó con 10 ml de agua destilada y adicionó 1 ml de  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  al 5% con agitación constante. Se dejó calentar a temperatura aproximada de  $70^\circ C$  por 30 minutos. Luego se filtró por gravedad en caliente y usó papel Whatman 42, sin cenizas, se enjuagó el precipitado con agua caliente 5-6 veces. Se realizó la verificación de sales de plata añadiendo nitrato de plata.

En una cápsula de porcelana, previamente pesada, se introdujo el papel filtro doblado y seco. Se calcinó la cápsula por media hora en mechero Bunsen. Luego se dejó por dos horas en la mufla a

900°C. Se obtuvieron cenizas blancas. El ensayo se realizó por duplicado. Los cálculos de g/l de sulfitos se realizan tal cual la fórmula de g/l de sulfatos puesto que la muestra se oxidó hasta sulfatos.

**8. Determinación de tiosulfatos:** Método gravimétrico Método gravimétrico (Jeffery G. *et al.*, 1989)

Se colocó 1 ml de muestra en un vaso de 50 ml en baño maría. Se añadió 1 ml de una solución de peróxido de hidrógeno amoniacal en exceso. Se diluyó con 10 ml de agua destilada y adicionó 1 ml de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O al 5% con agitación constante. Se dejó calentar a temperatura aproximada de 70 °C por 30 minutos. Luego se filtró por gravedad en caliente y usó papel Whatman 42, sin cenizas, se enjuagó el precipitado con agua caliente 5-6 veces. Se realizó la verificación de sales de plata añadiendo nitrato de plata.

En una cápsula de porcelana, previamente pesada, se introdujo el papel filtro doblado y seco. Se calcinó la cápsula por media hora en mechero Bunsen. Luego se dejó por dos horas en la mufla a 900°C. Se obtuvieron cenizas blancas de BaSO<sub>4</sub>. El ensayo se realizó por duplicado. Los cálculos de g/l de sulfitos se realizan tal cual la fórmula de g/l de sulfatos puesto que la muestra se oxidó hasta sulfatos.

### ANEXO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN SOLUCIONES ACUOSAS

**Análisis estadístico: T pareada.** Para la estandarización de la técnica se procedió a emplear el programa estadístico Minitab 18.

#### 1. Hierro (II)

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de Fe (II) con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de Fe (II) con respecto a las concentraciones teóricas.

#### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. Fe (II)	5	2.092	0.751	0.336
C teórica Fe (II)	5	2.109	0.749	0.335

#### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.01722	0.01098	0.00491	(-0.02769, -0.00675)

*diferencia\_μ: media de (C exp. Fe (II) - C teórica Fe (II))*

#### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0

Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-3.51	0.025

Valor p (0.025) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Fe (II).

## 2. Hierro total

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de Fe total con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de Fe total con respecto a las concentraciones teóricas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. Fe total	5	3.40	2.46	1.10
C teórica Fe total	5	3.33	2.43	1.09

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
0.0700	0.1068	0.0477	(-0.0318, 0.1718)

*diferencia\_μ: media de (C exp. Fe total - C teórica Fe total)*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
1.47	0.217

Valor p (0.217) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Fe total.

### 3. Cobre (II)

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las seis concentraciones experimentales de Cu (II) con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las seis concentraciones experimentales de Cu (II) con respecto a las concentraciones teóricas.

#### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. Cu (II)	6	2.713	1.472	0.601
C teórico Cu (II)	6	2.718	1.469	0.600

#### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.00498	0.00474	0.00193	(-0.00888, -0.00109)

*diferencia\_μ: media de (C exp. Cu (II) - C teórico Cu (II))*

#### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0

Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-2.58	0.050

Valor p (0.05) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de Cu (II).

#### 4. Sulfatos

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $SO_4^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $SO_4^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

##### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. $SO_4^{2-}$	5	5.74	2.27	1.01
C teórica $SO_4^{2-}$	5	5.76	2.28	1.02

##### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.02092	0.01756	0.00785	(-0.03766, -0.00418)

*diferencia\_μ: media de (C exp.  $SO_4^{2-}$  - C teórica  $SO_4^{2-}$ )*

##### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-2.66	0.056

Valor p (0.056) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $SO_4^{2-}$ .

## 5. Sulfitos

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $\text{SO}_3^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $\text{SO}_3^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. $\text{SO}_3^{2-}$	5	1.436	0.753	0.337
C teórica $\text{SO}_3^{2-}$	5	2.302	1.208	0.540

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.866	0.456	0.204	(-1.300, -0.432)

*diferencia\_μ: media de (C exp.  $\text{SO}_3^{2-}$  - C teórica  $\text{SO}_3^{2-}$ )*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0

Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-4.25	0.013

Valor p (0.013) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

## 6. Tiosulfatos

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  con respecto a las concentraciones teóricas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. $S_2O_3^{2-}$	4	3.435	1.760	0.880
C teórica $S_2O_3^{2-}$	4	3.547	1.925	0.962

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.112	0.200	0.100	(-0.348, 0.123)

*diferencia\_μ: media de (C exp.  $S_2O_3^{2-}$  - C teórica  $S_2O_3^{2-}$ )*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0

Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-1.12	0.343

Valor p (0.343) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$ .

## 7. Azufre elemental

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las masas de S teórica con respecto a las masas de azufre extraídas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las masas de S teórica con respecto a las masas de azufre extraídas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp. S	3	0.546	0.483	0.279
C teórica S	3	0.536	0.470	0.271

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
0.00987	0.01555	0.00898	(-0.01634, 0.03608)

*diferencia\_μ: media de (C exp. S - C teórica S)*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
1.10	0.386

Valor p (0.386) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las tres masas de S.

## ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTANDARIZACIÓN DE TIOSULFATO EN NUTRIENTES PARA BACTERIAS ÁCIDAS

Se realizó la prueba **t apareada** para determinar si la media de una muestra difiere significativamente de un valor específico.

### 1. DETERMINACIÓN DE TIOSULFATO CON MEDIO TK NO EESTÉRIL

**t<sub>1</sub> = 0 horas**

H<sub>0</sub>: Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> a tiempo cero con respecto a las concentraciones teóricas.

H<sub>1</sub>: Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> a tiempo cero con respecto a las concentraciones teóricas.

#### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp.	5	3.666	1.831	0.819
C teórica	5	3.666	1.923	0.860

#### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
0.0002	0.1288	0.0576	(-0.1226, 0.1230)

*diferencia\_μ: media de (C exp. - C teórica)*

#### Prueba

Hipótesis nula    H<sub>0</sub>: diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna    H<sub>1</sub>: diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
0.00	0.998

Valor p (0.998) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$  a tiempo cero.

**$t_2 = 24$  horas**

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas con respecto a las concentraciones teóricas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp.	4	3.50	1.64	0.82
C teórica	4	3.93	2.09	1.04

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.437	0.539	0.269	(-1.071, 0.196)

*diferencia\_μ: media de (C exp. - C teórica)*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-1.62	0.203

Valor p (0.203) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones (C2 contaminada) de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas.

## 2. DETERMINACIÓN DE TIOSULFATO CON MEDIO TK ESTÉRIL

$t_1 = 0$  horas

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a tiempo cero con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a tiempo cero con respecto a las concentraciones teóricas.

### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp.	5	3.626	1.798	0.804
C teórica	5	3.664	1.935	0.865

### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.0380	0.1979	0.0885	(-0.2267, 0.1506)

*diferencia\_μ: media de (C exp. - C teórica)*

### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-0.43	0.689

Valor p (0.689) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$  a tiempo cero.

**$t_2 = 24$  horas**

$H_0$ : Con la estandarización de la técnica, no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas con respecto a las concentraciones teóricas.

$H_1$ : Con la estandarización de la técnica, existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cuatro concentraciones experimentales de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas con respecto a las concentraciones teóricas.

#### Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
C exp.	5	3.480	1.812	0.811
C teórica	5	3.664	1.935	0.865

#### Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 90% para la diferencia_μ
-0.184	0.280	0.125	(-0.451, 0.083)

*diferencia\_μ: media de (C exp. - C teórica)*

#### Prueba

Hipótesis nula  $H_0$ : diferencia\_μ = 0  
 Hipótesis alterna  $H_1$ : diferencia\_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
-1.47	0.216

Valor p (0.216) > 0.01, entonces se acepta la hipótesis nula al 90% de confianza. Se concluye que no existe diferencia significativa en la repetitividad de los resultados entre las cinco concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$  a las 24 horas.

## ANEXO 5. MEDICIONES DE VOLTAJE EN LA CCM Y CCC DE DOS CÁMARAS

**Tabla 35.** Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 1 y CCC 1: medio tiosulfato (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica).

<b>Tiempo (H)</b>	<b>Voltaje CCM 1 (V)</b>	<b>Voltaje CCC 1 (V)</b>	<b>DP CCM 1 (mW/m<sup>2</sup>)</b>	<b>DP CCC 1 (mW/m<sup>2</sup>)</b>
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.08	0.38	0.31	255.68	176.99
41.74	0.02	0.03	0.76	1.71
43.99	0.01	0.02	0.29	0.90
45.49	0.01	0.02	0.14	0.66
47.49	0.01	0.02	0.07	0.53
48.49	0.01	0.02	0.05	0.49
65.49	0.00	0.01	0.00	0.06
67.82	0.00	0.00	0.00	0.03
69.49	0.00	0.00	0.00	0.02
71.49	0.00	0.00	0.00	0.01
72.49	0.00	0.00	0.00	0.01
137.49	0.00	0.00	0.00	0.00
139.49	0.00	0.00	0.00	0.00
141.39	0.00	0.00	0.00	0.00
143.39	0.00	0.00	0.00	0.00
145.39	0.00	0.00	0.00	0.00
145.99	0.20	0.00	70.69	0.00
161.49	0.08	0.00	10.72	0.00
163.49	0.07	0.00	7.97	0.00
165.49	0.05	0.00	5.20	0.00
167.49	0.04	0.00	3.19	0.00
168.99	0.04	0.00	2.24	0.00
186.49	0.00	0.00	0.00	0.00

188.49	0.00	0.00	0.00	0.00
190.49	0.00	0.00	0.00	0.00
192.49	0.00	0.00	0.00	0.00
193.49	0.00	0.00	0.00	0.00
209.49	0.00	0.00	0.00	0.00
211.49	0.00	0.00	0.00	0.00
213.49	0.06	0.04	5.99	2.75
215.49	0.05	0.04	4.55	2.53
216.49	0.05	0.03	3.76	2.14
233.99	0.01	0.01	0.16	0.11
235.99	0.01	0.01	0.10	0.08
237.99	0.01	0.01	0.07	0.06
239.99	0.01	0.00	0.05	0.04
240.99	0.00	0.00	0.04	0.04
241.99	0.00	0.00	0.03	0.03
306.99	0.00	0.00	0.00	0.00
308.99	0.00	0.00	0.00	0.00
311	0.22	0.24	85.85	100.41
313	0.20	0.22	69.49	84.05
333	0.12	0.05	26.44	4.67
334	0.12	0.05	25.06	3.70
335	0.12	0.04	24.26	3.24
336	0.11	0.04	23.09	2.82
337	0.11	0.04	22.32	2.60
355.25	0.05	0.02	5.26	0.84
357.25	0.05	0.02	3.86	0.76
358.25	0.04	0.02	3.25	0.70
359.25	0.04	0.02	3.13	0.68

360.25	0.04	0.02	2.79	0.64
361.25	0.04	0.02	2.34	0.60
380.5	0.01	0.00	0.20	0.01
381.5	0.01	0.00	0.20	0.01
382.5	0.01	0.00	0.20	0.01
383.5	0.01	0.00	0.19	0.01
384.5	0.01	0.00	0.19	0.01
385.5	0.01	0.00	0.18	0.01
403	0.01	0.00	0.08	0.00
404	0.01	0.00	0.08	0.00
405	0.01	0.00	0.08	0.00
449.5	0.00	0.00	0.01	0.00
452	0.00	0.00	0.01	0.00
453.25	0.00	0.00	0.01	0.00
454.25	0.00	0.00	0.01	0.00
471	0.00	0.00	0.00	0.00
473	0.00	0.00	0.00	0.00
475	0.00	0.00	0.00	0.00

**Tabla 36.** Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 2 y CCC 2: medio tiosulfato (cámara anódica) y solución cúprica (cámara catódica).

<b>Tiempo (H)</b>	<b>Voltaje CCM 2 (V)</b>	<b>Voltaje CCC 2 (V)</b>	<b>DP CCM 2 (mW/m<sup>2</sup>)</b>	<b>DP CCC 2 (mW/m<sup>2</sup>)</b>
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.38	0.03	0.02	1.42	0.95
1.24	0.05	0.03	4.69	2.02
3.24	0.04	0.03	3.42	1.30
47.24	0.03	0.03	1.38	2.20
48.24	0.03	0.03	1.14	2.04
49.24	0.02	0.03	0.86	1.67
50.24	0.02	0.03	1.04	1.80
51.24	0.02	0.03	1.09	1.80
52.24	0.02	0.03	1.04	1.78
92.74	0.03	0.02	1.23	0.69
94.74	0.02	0.02	0.98	0.70
95.74	0.02	0.02	0.91	0.50
96.74	0.02	0.02	0.99	0.45
97.74	0.02	0.01	1.03	0.40
115.24	0.01	0.01	0.31	0.08
117.24	0.01	0.01	0.29	0.09
119.24	0.01	0.01	0.26	0.10
121.24	0.01	0.01	0.18	0.10
139.24	0.01	0.01	0.07	0.07
142.34	0.01	0.01	0.08	0.08
143.34	0.01	0.01	0.07	0.07
144.34	0.01	0.00	0.05	0.04
145.34	0.01	0.01	0.06	0.07
156.74	0.00	0.01	0.04	0.05

158.74	0.00	0.01	0.04	0.05
160.99	0.01	0.01	0.05	0.06
161.99	0.01	0.01	0.05	0.06
162.99	0.01	0.01	0.05	0.06
163.99	0.01	0.01	0.06	0.07
177.44	0.00	0.00	0.03	0.04
179.44	0.00	0.00	0.03	0.04
181.44	0.00	0.01	0.04	0.05
183.44	0.00	0.01	0.04	0.05

**Tabla 37.** Datos de potencial de celda en función al tiempo de la CCM 3 y CCC 3: medio tiosulfato y solución ferrosa (cámara anódica) y solución férrica (cámara catódica).

<b>Tiempo (H)</b>	<b>Voltaje CCM 3 (V)</b>	<b>Voltaje CCC 3 (V)</b>	<b>DP CCM 3 (mW/m<sup>2</sup>)</b>	<b>DP CCC 3 (mW/m<sup>2</sup>)</b>
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.08	0.28	0.32	144.59	188.52
2.74	0.17	0.24	49.86	102.99
4.74	0.13	0.22	32.45	84.83
17.99	0.06	0.13	6.55	30.73
20.65	0.05	0.11	4.84	21.52
22.65	0.05	0.10	4.28	17.25
24.65	0.05	0.09	3.95	15.42
26.65	0.04	0.08	3.63	12.17
27.65	0.04	0.08	3.57	11.12
44.82	0.04	0.04	2.71	2.66
46.82	0.04	0.04	2.67	2.30
48.82	0.04	0.03	2.70	1.99
50.82	0.04	0.03	2.65	1.69
51.82	0.04	0.03	2.61	1.57
65.73	0.03	0.02	2.16	0.53
68.73	0.03	0.02	2.06	0.41
70.73	0.03	0.01	2.02	0.36
72.73	0.03	0.01	1.98	0.30
75.73	0.03	0.01	1.91	0.23
141.31	0.01	0.00	0.11	0.00
143.81	0.01	0.00	0.10	0.00
145.81	0.01	0.00	0.09	0.00

## ANEXO 6. CÁLCULOS DE DENSIDAD DE POTENCIA Y EFICIENCIA

### COULÓMBICA

En base a los datos de voltaje (mV) de las tres celdas de combustible microbiana (CCM 1, CCM 2 y CCM 3) y celdas de combustible control (CCC 1, CCC 2 y CCC 3) se procedió a calcular la densidad de potencia y eficiencia coulombica detallados en los siguientes apartados.

#### 1. Densidad de Potencia (Buitrón y Pérez, 2011)

El ánodo se conectó al cátodo mediante un alambre externo que contenía una resistencia. El alambre anódico y catódico se une a un cocodrilo de tal manera que cerró el circuito conectados a un multímetro (ver ANEXO 8, página 130).

Tanto la celda de combustible microbiana y la celda control se corrieron en paralelo.

Se registró los valores de voltaje en unidades de mV en función al tiempo en horas y se procedió a ingresar los datos al programa de procesamiento Matlab. Se graficó voltaje (mV) & tiempo (H) de las dos celdas. Se restó los valores de la gráfica de control a la de bacterias, de tal manera se obtuvo el voltaje generado por las bacterias. A partir de estos valores se calculó la densidad de potencia según la fórmula en la ecuación 9, página 28).

Según Raffo *et al.* (2007), se procedió a calcular el área bajo la curva con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides, teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias en unidades de mW.H/m<sup>2</sup>

Considerando que el área del electrodo es de 1cm<sup>2</sup> y 1W.H equivale a 3600 J, se obtuvo el siguiente factor de conversión:  $1 \text{ mW.H/m}^2 = 3600/10^7 \text{ J}$

Con ese factor de conversión se expresó la energía generada en unidades de mJ.

## 2. Eficiencia Coulómbica

La eficiencia coulómbica de la celda de combustible microbiana se determinó en base a la densidad de potencia calculada en ANEXO 7, página 121, cuyas unidades de DP en  $\text{mW.H/m}^2$  se igualó a la  $I^2/R.A$  despejándose la intensidad de corriente (I). Teniendo en cuenta que  $1\text{J} = \text{Kg.m}^2/\text{s}^2$ ,  $1\text{W} = \text{J/s}$ ,  $\Omega = \text{Kg.m}^2/\text{A}^2.\text{s}^3$  se realizaron las conversiones respectivas para hallar la intensidad de corriente. Se empleó la fórmula citada en la ecuación 13, página 30, para calcular la eficiencia coulómbica.

Se calculó multiplicando la masa del sustrato (g/mol), la corriente (cabe resaltar la corriente unidad de área del electrodo,  $\text{mA/cm}^2$ ) y el tiempo (H) dividido por el producto de la constante de Faraday ( $\text{C/mol e}^-$ ), electrones producidos por mol de sustrato ( $\text{mol e}^-/\text{mol}$ ), volumen de celda (l) y la diferencia de concentración del sustrato (g/l).

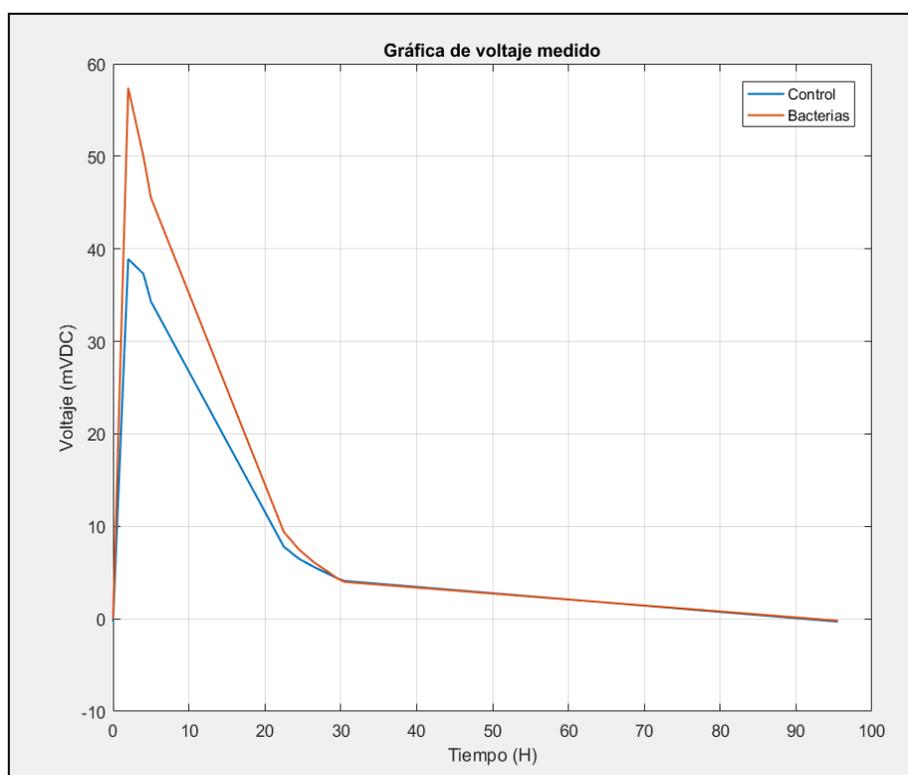
La eficiencia coulómbica al ser adimensional se eliminaron las unidades realizando conversiones sencillas, esto es, al cociente anterior se multiplicó por  $1\text{A} \times 3600\text{s}$ , y se dividió  $103 \text{ mA} \times \text{H}$  (Logan, 2008; Pistonesi *et al.*, 2010).

## ANEXO 7. DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA GENERADA EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

### CCM 1

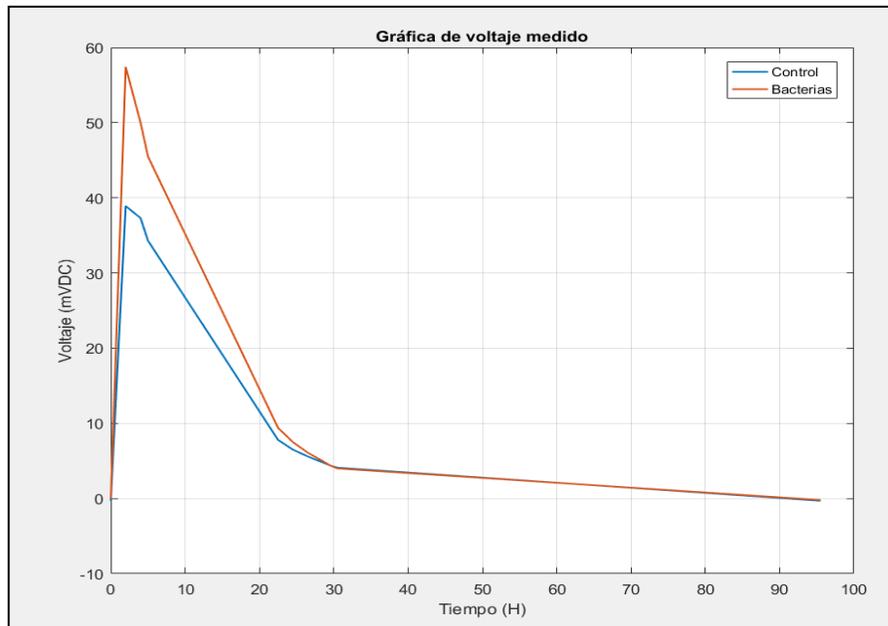
#### - ETAPA A

Este experimento tuvo una duración de 95 horas y un total de 200 muestras tomadas, las cuales se observan en la siguiente gráfica:



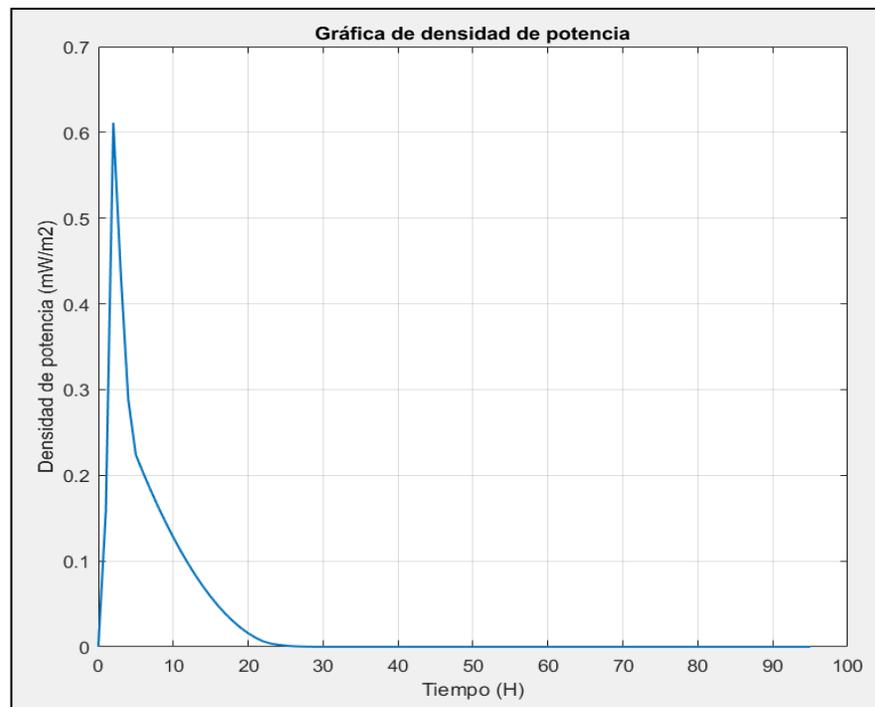
**Gráfico 14.** Voltaje medido (mV) de la CCM 1 (bacterias) y CCC 1(control) en función al tiempo (H) – Etapa A.

Se procedió a usar los puntos mapeados para calcular la diferencia de voltaje medido entre la celda de estudio y la celda control:



**Gráfico 15.** Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa A.

Con estos valores se calculó la densidad de potencia según la fórmula citada en la ecuación 9, página 28. En la siguiente gráfica se muestra la DP instantánea calculada:



**Gráfico 16.** Densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>) de la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa A.

Se procedió a calcular el área bajo la curva con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides (Raffo, 2017), teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias:

$$3.13 \text{ mW.H/m}^2$$

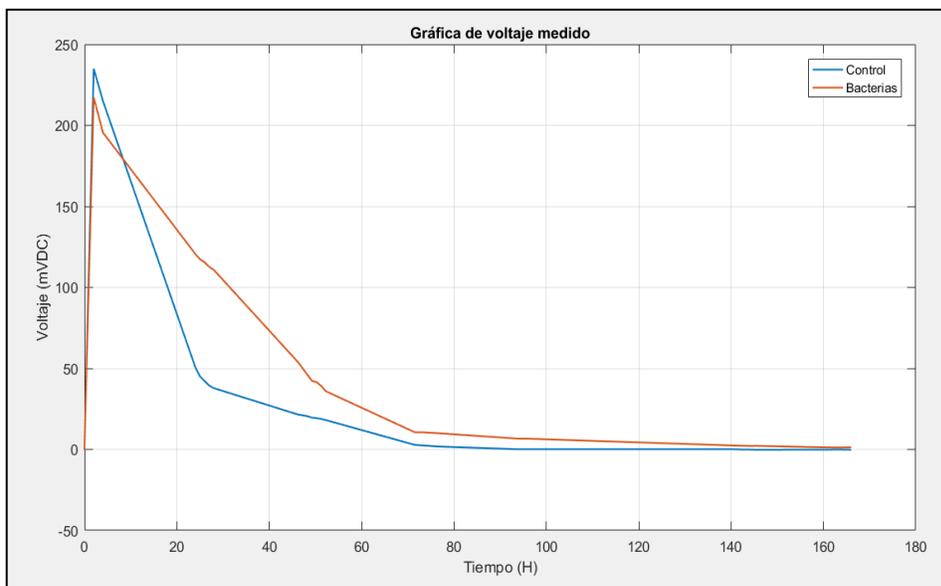
Considerando que el área del electrodo es de  $1\text{cm}^2$  y  $1\text{W.H}$  equivale a  $3600 \text{ J}$ , se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW.H/m}^2 = 3600/10^7 \text{ J}$$

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada como:  $1.13 \text{ mJ}$

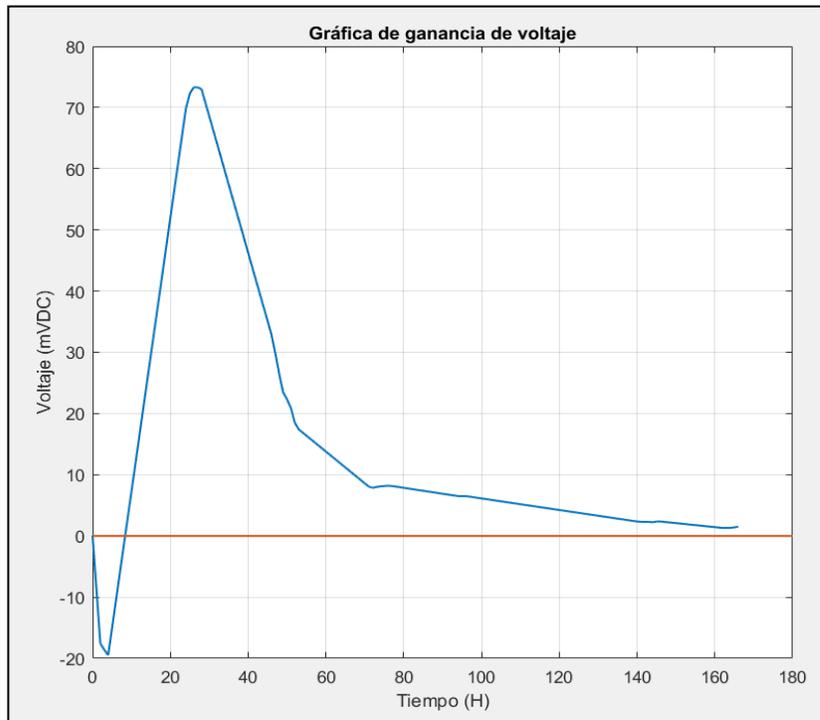
#### - ETAPA B

Este experimento duró 170 horas y un total de 200 muestras tomadas, las cuales se observan en la siguiente gráfica:



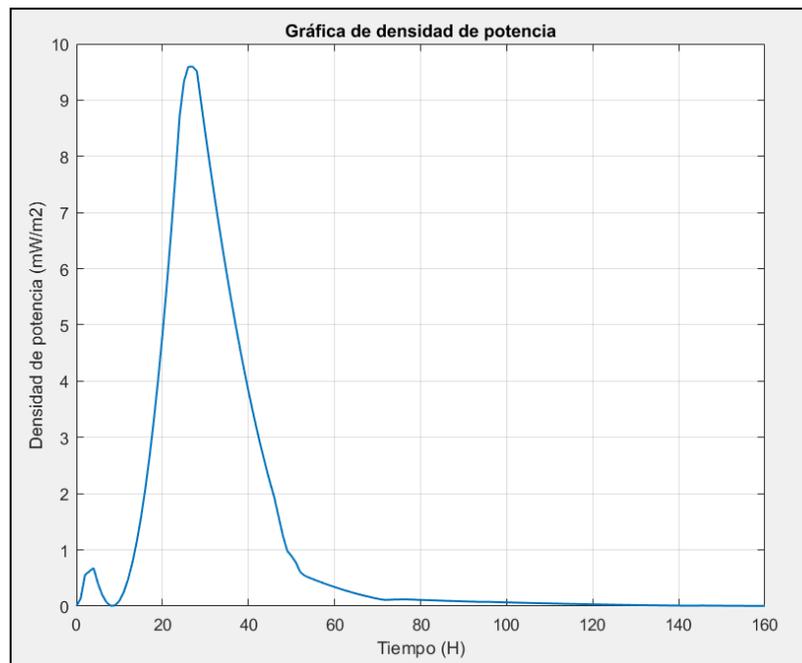
**Gráfico 17.** Voltaje medido (mV) de la CCM 1 (bacterias) y CCC 1(control) en función al tiempo (H) – Etapa B.

Se procede a usar los puntos mapeados para calcular la diferencia de voltaje medido entre la celda de estudio y la celda de control:



**Gráfico 18.** Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa B.

En la siguiente gráfica se muestra la DP instantánea calculada:



**Gráfico 19.** Densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>) de la CCM 1 en función al tiempo (H) – Etapa B.

Se procede a calcular el área bajo la curva con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapecoides (Raffo, 2017), teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias:

$$197.3 \text{ mW.H/m}^2$$

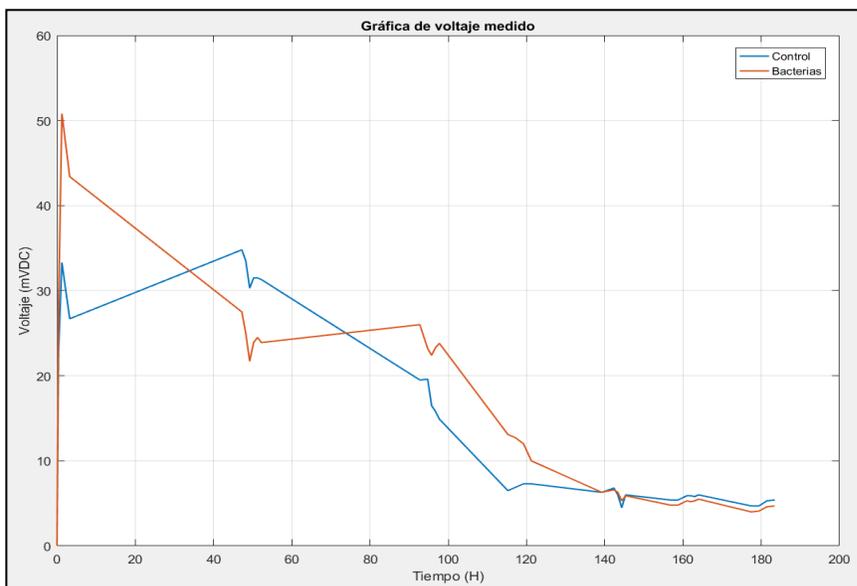
Considerando que el área del electrodo es de  $1\text{cm}^2$  y  $1\text{W.H}$  equivale a  $3600 \text{ J}$ , se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW.H/m}^2 = 3600/10^7 \text{ J}$$

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada como:  $71 \text{ mJ}$

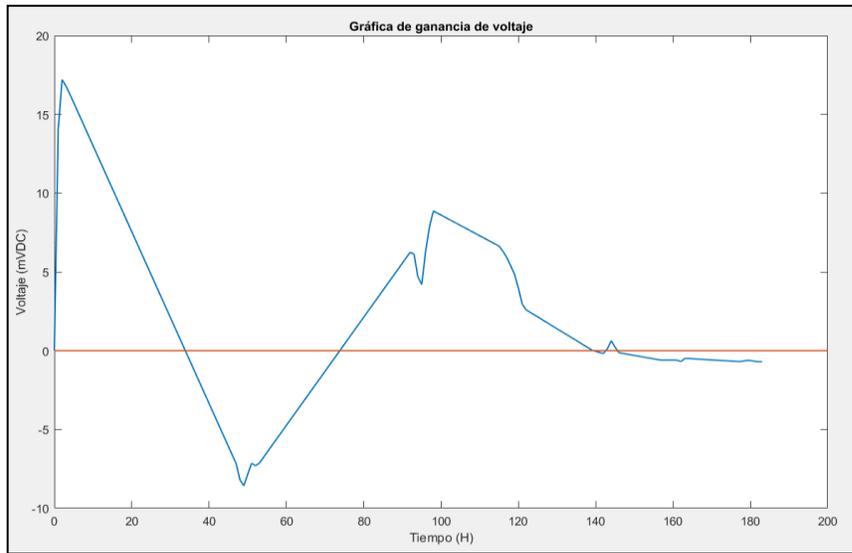
## CCM 2

Este experimento tiene una duración de 180 horas y un total de 70 muestras tomadas, las cuales se muestran en la siguiente gráfica:



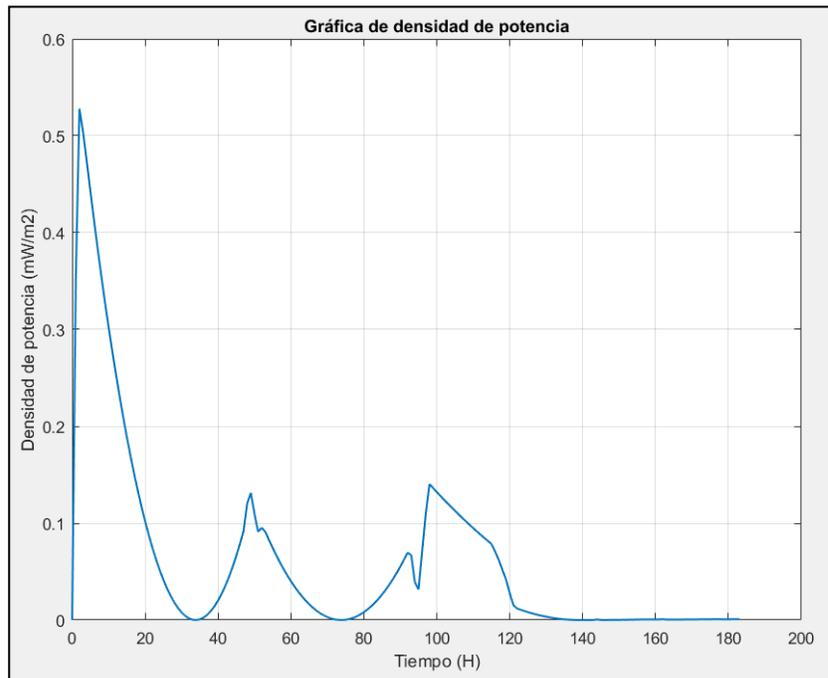
**Gráfico 20.** Voltaje medido (mV) de la CCM 2 (bacterias) y CCC 2 (control) en función al tiempo (H).

Se procede a usar los puntos mapeados para calcular la diferencia de voltaje medido entre la celda de estudio y la celda de control:



**Gráfico 21.** Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 2 en función al tiempo (H).

En la siguiente gráfica se muestra la DP instantánea calculada:



**Gráfico 22.** Densidad de potencia ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) de la CCM 2 en función al tiempo (H).

Se procede a calcular el área bajo la curva con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides (Raffo, 2017), teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias:

$$11.1 \text{ mW.H/m}^2$$

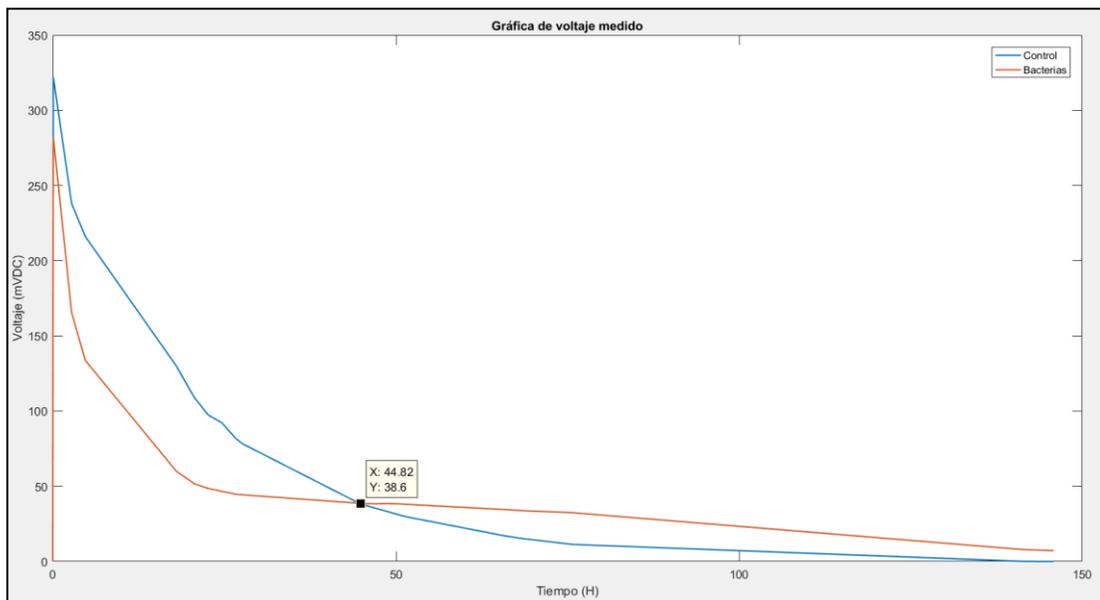
Considerando que el área del electrodo es de  $1\text{cm}^2$  y  $1\text{W.H}$  equivale a  $3600 \text{ J}$ , se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW.H/m}^2 = 3600/10^7 \text{ J}$$

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada como:  $4 \text{ mJ}$

### CCM 3

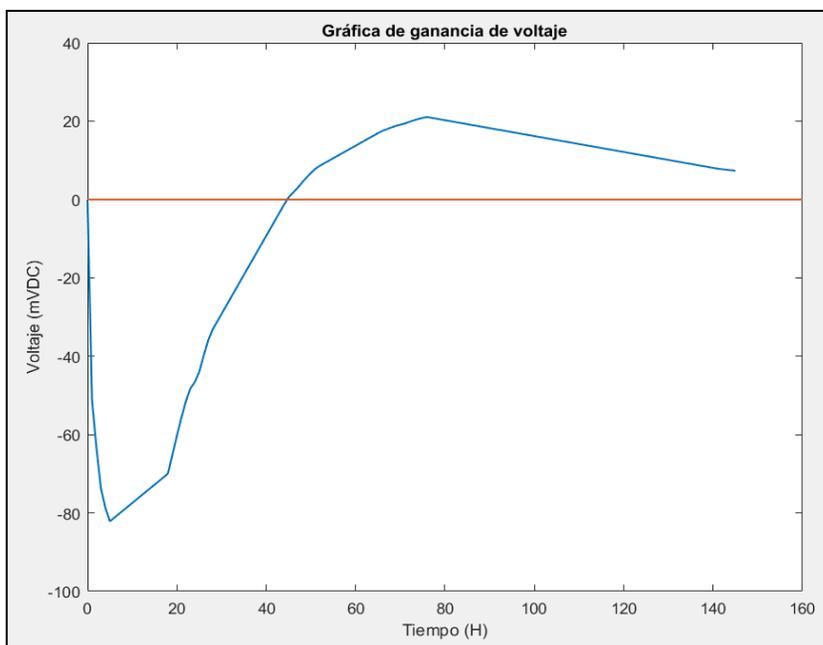
Durante este experimento se usaron dos celdas, una para ser usada de control y otra en la que se introducen las bacterias estudiadas. En este caso la prueba duró 145 horas, en las que se tomaron un total de 45 puntos. Se graficaron ambas tablas de mediciones usando el programa de procesamiento Matlab:



**Gráfico 23.** Voltaje medido (mV) de la CCM 3 (bacterias) y CCC 3 (control) en función al tiempo (H).

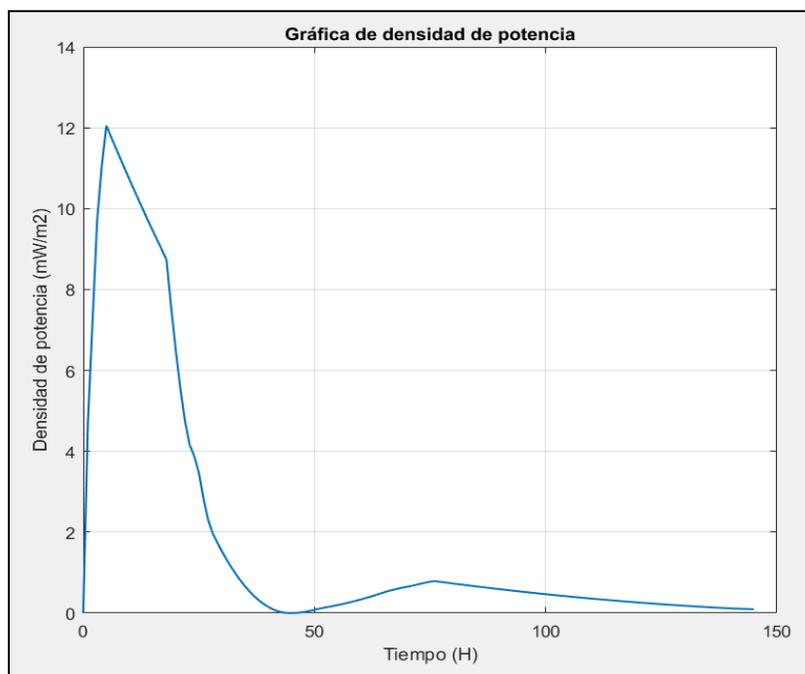
Se puede notar que a las 45 horas la celda con bacterias superó en energía generada a la celda de control.

Con ambas gráficas definidas se puede restar los valores de la gráfica de control a la de bacterias, así obtenemos el voltaje generado por las bacterias estudiadas.



**Gráfico 24.** Ganancia de voltaje (mV) en la CCM 2 en función al tiempo (H).

En la siguiente gráfica se muestra la DP instantánea calculada:



**Gráfico 25.** Densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>) de la CCM 3 en función al tiempo (H).

Se procede a calcular el área bajo la curva con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides (Raffo, 2017), teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias:

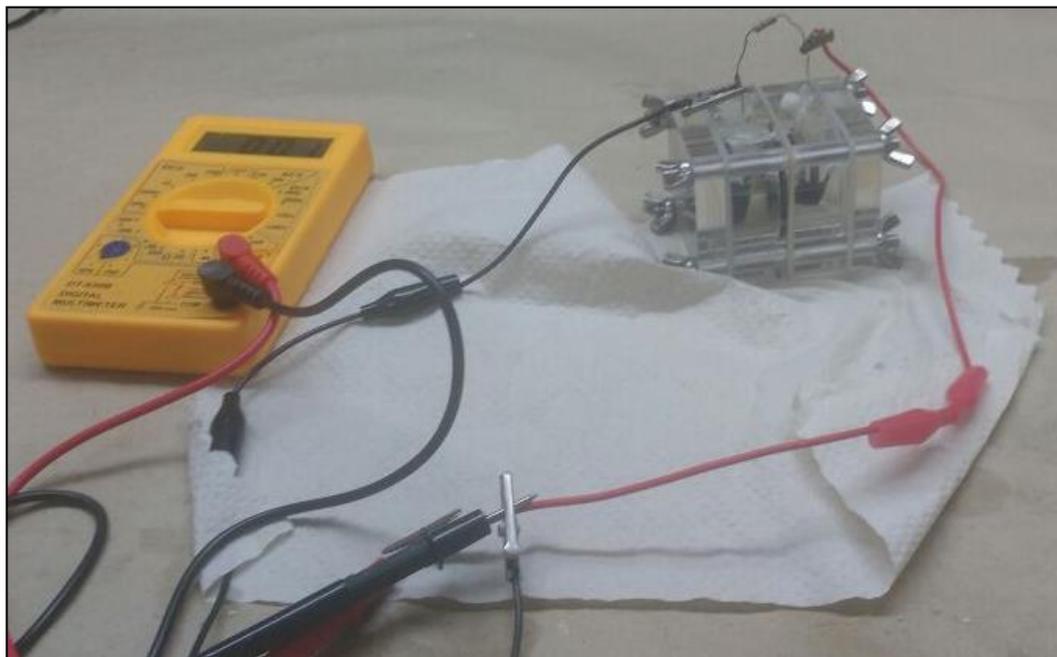
$$268 \text{ mW.H/m}^2$$

Considerando que el área del electrodo es de  $1\text{cm}^2$  y  $1\text{W.H}$  equivale a  $3600 \text{ J}$ , se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW.H/m}^2 = 3600/10^7 \text{ J}$$

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada como:  $96.48 \text{ mJ}$

## ANEXO 8. FOTOS



**Figura 12.** Celda de combustible microbiana conectada a un multímetro.



**Figura 13.** Muestra de la CE: medio tiosulfato y solución férrica.



**Figura 14.** Ánodo (izquierda) y cátodo (derecha) de la CCM 2.



**Figura 15.** Ánodo (izquierda) y cátodo (derecha) de la CCC 2.



**Figura 16.** Muestras de la CCM 1 y CCC 1.

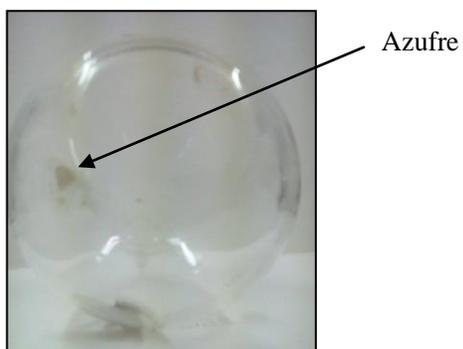
Derecha: ánodo y cátodo de la CCM 1. Izquierda: ánodo y cátodo control.



**Figura 17.** Muestras de la CCM 2 y CCC 2.  
De izquierda a derecha: cátodo, cátodo control, ánodo y ánodo control.



**Figura 18.** Muestras de la CCM 3 y CCC 3.  
De izquierda a derecha: cátodo control, cátodo, ánodo control y ánodo.



**Figura 19.** Residuos de azufre.