



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

“PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD EN  
CELDA DE COMBUSTIBLE  
MICROBIANAS A PARTIR DE  
TIOSULFATO UTILIZANDO CEPAS DE  
*Acidithiobacillus ferrooxidans*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

**Bach. SANDRO JUNIORS JIBAJA CÁCERES**

Lima, Perú,

2018



## **ASESOR DE TESIS**

Dra. Jasmín Hurtado Custodio de Berastáin

# **DEDICATORIA**

A Dios, por su infinita misericordia en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino ángeles que han sido mi soporte y compañía durante toda esta aventura.

A mi Madre Nora Cáceres, por el amor, la formación, los valores y sobre todo por el apoyo incondicional en mi carrera y mis sueños en el campo de la biología.

A mis abuelos Alejandro Cáceres (QEPD) y Ruth Vásquez, por el amor que me brindaron

A mis hermanos, Alonso y Marcoantonio, por su amor fraternal y demostrarme que somos una sola fuerza cuando se trata de nuestras metas y aspiraciones.

# AGRADECIMIENTOS

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él.”

Louis Pasteur

Esta tesis no hubiera sido lograda sin el apoyo de las siguientes personas:

A Dios, por darme la fuerza para seguir con mis sueños y proyectos.

A mi Madre, por apoyarme con mis aventuras científicas.

A mis hermanos, por estar siempre conmigo y echarme ánimos.

A mi asesora, Dra. Jasmín Hurtado, por confiar en mi desde el inicio del proyecto, por brindarme su amistad, consejos, experiencia y apoyo para terminar mi tesis.

Al Dr. Iván Rodríguez Chávez, por su amistad, sus sabios consejos y apoyo.

A Luis Villegas, por ser mi padre putativo, por las llamadas de atención, por apoyarme siempre y por tu amistad.

Al Dr. Fred García y Mg. Enzo Foy por su amistad, palabras de aliento y sus buenos consejos.

Al Dr. Tomás Agurto, por sus enseñanzas en el campo de la microbiología y sus consejos.

A mis amigos, Fernando y Jean Paul por su amistad brindada desde la época de colegio y su apoyo constante.

A mis amigos del Laboratorio de Biotecnología Ambiental: Ángela, Andrea, Arturo, Daniel, Gabriela, Jacqueline, Jorge, Pamela, Yuri. Por hacerme sentir en familia desde el primer momento que ingrese al laboratorio.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

FONDECYT N°113-2015

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	4
	<b>2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	4
	<b>2.2. MARCO TEORICO</b> .....	5
	<b>2.3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>III.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	17
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVO ESPECÍFICOS</b> .....	17
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
	<b>5.1. Flujograma del Proceso</b> .....	18
	<b>5.2. Material Biológico</b> .....	19
	<b>5.3. Medios empleados</b> .....	19
	<b>5.3.1. Medios Líquidos</b> .....	19
	<b>5.3.2. Medios Sólidos</b> .....	19
	<b>5.3.3. Soluciones</b> .....	20
	<b>5.4. Caracterización de las cepas para inoculación en las CCMs</b> .....	20
	<b>5.4.1. Caracterización Microscopica</b> .....	20
	<b>5.4.1.1. Coloración GRAM</b> .....	20
	<b>5.4.1.2. Coloración de Esporas</b> .....	20
	<b>5.4.1.3. Observación de la Motilidad</b> .....	21
	<b>5.4.2. Crecimiento en medios líquidos</b> .....	21
	<b>5.4.3. Crecimiento en medios Sólidos</b> .....	22
	<b>5.5. Preparación de Inóculos</b> .....	22
	<b>5.5.1. De <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536</b> .....	22

5.5.2. De <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> 102 y 151 .....	23
5.6. Caracterización electroquímica.....	23
5.6.1. Voltmetría Cíclica.....	24
5.6.1.1. Estandarización del sistema de voltametría con Ferricianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_3$ ) /Ferrocianuro de potasio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) .....	24
5.6.1.2. VC1: Prueba con medio líquido de Tiosulfato.....	25
5.6.1.3. VC2: Prueba con medio líquido de Tiosulfato + Férrico .....	25
5.6.2. Cronoamperometría .....	26
5.6.2.1. C1:Prueba con medio líquido de Tiosulfato.....	26
5.6.2.1. C2:Prueba con medio líquido de Tiosulfato + Férrico .....	27
5.7. Producción de electricidad en Celdas de Combustible Microbianas.....	27
5.7.1. Construcción de Celdas de Combustible Microbianas .....	27
5.7.1.1. Estructura de la Celda de Combustible Microbiana.....	27
5.7.1.2. Activación de la Membrana Intercambiadora de Protones.....	28
5.7.1.3. Preparación de los electrodos de trabajo .....	28
5.7.1.3.1. Alambres de Cobre (Cu).....	28
5.7.1.3.2 Alambres de Platino (Pt) .....	29
5.7.1.4. Ensamblaje de la Celda de Combustible Microbiana .....	29
5.7.2. Estandarización de la Celda de Combustible Microbiana con <i>Escherichia coli</i> ATTC10536.....	30
5.7.3. Inoculación de la Celdas de Combustible Microbianas .....	31
5.7.3.1. Electrodo de trabajo de alambre de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito .....	32

5.7.1.3.1. CCM1 y CCM2 con medio líquido de tiosulfato (ánodo) y buffer fosfato ácido (cátodo).....	32
5.7.3.2. Electrodo de trabajo de alambre de platino (Cu) unido al fieltro de grafito .....	33
5.7.3.2.1. CCM3 con medio líquido de tiosulfato (ánodo) y solución Férrica (cátodo) .....	33
5.7.3.2.2. CCM4 con medio líquido de tiosulfato + ferroso (ánodo) y solución férrica (cátodo).....	33
5.7.3.2.3. CCM5 con medio líquido de tiosulfato (ánodo) y solución de cobre (cátodo) .....	34
5.7.4. Cálculo de la densidad de potencia y la energía producida por cada celda de combustible microbiana.....	34
5.7.4.1. Cálculo del Voltaje generado (mV).....	34
5.7.4.2. Cálculo de la Densidad de Potencia (mW/m <sup>2</sup> ).....	35
5.7.4.2. Cálculo de la Energía Producida (J).....	35
5.8. Identificación Molecular de los cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> productores de electricidad. ....	36
5.8.1. Extracción de ADN .....	36
5.8.2. Verificación de la Integridad del ADN genómico .....	38
5.8.3. Amplificación del Gen Ribosomal 16S por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
5.8.4. Secuenciamiento de los Productos de PCR.....	39
VI. RESULTADOS.....	40
6.1. Caracterización de las Cepas para inoculación en las Celdas de Combustible Microbianas.....	40

<b>6.1.1. Caracterización Microscópica .....</b>	<b>40</b>
<b>6.1.2. Crecimiento en medio líquidos .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1.3. Crecimiento en medio sólidos .....</b>	<b>42</b>
<b>6.1.4. Caracterización electroquímica .....</b>	<b>44</b>
<b>6.1.4.1. Estandarización del sistema de voltametría con     Ferricianuro de potasio (<math>C_6N_6FeK_3</math>) /Ferrocianuro de potasio     (<math>K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O</math>).....</b>	<b>44</b>
<b>6.1.4.2. Voltametría Cíclica del medio líquido de     Tiosulfato.....</b>	<b>45</b>
<b>6.1.4.3. Voltametría Cíclica del medio líquido de Tiosulfato +     Férrico.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1.4.4. Cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1.4.5. Cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato +     Férrico.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2. Producción de Electricidad Celdas de Combustible Microbianas.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2.1. Estandarización de las Celdas de Combustible Microbianas con     <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2.2. Inoculación de las Celdas de Combustible Microbianas.....</b>	<b>50</b>
<b>6.2.2.1. Electrodo de Trabajo con alambre de cobre (Cu) unidos         al fieltro de grafito. ....</b>	<b>50</b>
<b>6.2.2.2. Electrodo de Trabajo con alambre de platino (Pt)         unidos al fieltro de grafito.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2.2.2.1. CCM3 con medio líquido de tiosulfato (ánodo)             y solución Férrica (cátodo).....</b>	<b>54</b>

6.2.2.2.2. CCM4 con medio líquido de tiosulfato + ferroso (ánodo) y solución Férrica (cátodo).....	56
6.2.2.2.3. CCM5 con medio líquido de tiosulfato (ánodo) y solución de cobre (cátodo).....	57
<b>6.3. Identificación Molecular de los cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> productores de electricidad .....</b>	<b>58</b>
6.3.1. Verificación de la integridad de ADN extraído .....	58
6.3.2. Amplificación del Gen 16 S rRNA por PCR.....	59
6.3.3. Secuenciamiento de los productos de PCR .....	59
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>
11.1. Anexo 1: Composición y preparación de los medios empleados .....	77
11.2. Anexo 2:Fotos .....	86

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Configuración típica de una Celda de Combustible Microbiana.

**Figura 2.** Esquema de una celda electrolítica.

**Figura 3.** Celda Galvánica o Voltaica

**Figura 4.** Diagrama esquemático de una CCM mostrando oxidación de compuestos inorgánicos de azufre.

**Figura 5.** Celda de Combustible en forma de H.

**Figura 6.** Crecimiento en placa de FeTio de *At. ferrooxidans*.

**Figura 7.** Crecimiento en placa de Feo de *At. ferrooxidans*.

**Figura 8.** Voltametría Cíclica del Medio Ferricianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_3$ ) /Ferrocianuro de potasio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ )

**Figura 9.** Voltametría Cíclica del Medio líquido de tiosulfato sin ser inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans*.

**Figura 10.** Voltametría Cíclica del medio líquido de tiosulfato inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* (cepa LB151).

**Figura 11.** Voltametría Cíclica del medio líquido de tiosulfato + férrico sin ser inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* (cepa LB151).

**Figura 12.** Voltametría Cíclica del medio líquido de tiosulfato + férrico inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* (cepa LB151).

**Figura 13.** Cronoamperometría del medio líquido de tiosulfato.

**Figura 14.** Cronoamperometría del medio líquido tiosulfato + férrico.

**Figura 15.** Estandarización de las CCMs con *Escherichia coli* con electrodos de cobre recubiertos con plata.

**Figura 16.** Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

**Figura 17.** Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana control.

**Figura 18.** Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana inoculada con las cepas LB102 y LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio TK-Fe.

**Figura 19.** Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana inoculada con la cepa LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio líquido tiosulfato en anaerobiosis.

**Figura 20.** Gráfica del voltaje generado.

**Figura 21.** *At. ferrooxidans* cepa LB151 en la CCM 3 con medio líquido de Tiosulfato (cámara anaeróbica) y solución Férrica (cámara catódica)

**Figura 22.** Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el medio líquido de tiosulfato + ferroso (ánodo) y solución férrica (cátodo).

**Figura 23.** Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el medio líquido de tiosulfato (ánodo) y Cobre (cátodo).

**Figura 24.** Verificación de la Integridad del ADN.

**Figura 25.** Electroforesis de los productos de PCR de las cepas LB102 y LB151.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Caracterización Microscópica de las cepas LB102 y LB151.

**Tabla 2.** Resultados de la coloración de esporas por la técnica de verde malaquita.

**Tabla 3.** Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio líquido de tiosulfato.

**Tabla 4.** Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio TK/Fe.

**Tabla 5:** Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio FeO.

**Tabla 6.** Cálculos de la Densidad de Potencia (DP) y Energía Producida (EP) para la CCMs con electrodos de trabajo de cobre (Cu).

**Tabla 7.** Cálculos de la Densidad de Potencia (DP) y Energía Producida (EP) para la CCM de adaptación del cultivo de *At. ferrooxidans*.

## RESUMEN

Las bacterias acidófilas son predominantes en los ecosistemas de las aguas acidas de minas. El objetivo del estudio fue producir electricidad en las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) a partir del tiosulfato utilizando a *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Se emplearon 2 cultivos de *At. ferrooxidans* cepa LB102 y LB151, las cuales fueron caracterizadas morfológicamente y electroquímicamente e identificadas molecularmente. Las técnicas electroquímicas utilizadas fueron la cronoamperometría y la voltametría cíclica. Las voltametrías cíclicas (VC1 y VC2) mostraron picos de corriente de oxidación y reducción de los compuestos indicando que hay una interacción de la bacteria con la superficie del electrodo. Las cronoamperometrías (C1 y C2) mostraron que la bacteria era la productora de la electricidad al utilizar el tiosulfato solo y el tiosulfato con hierro. En la producción de electricidad tenemos que la CCM1 produjo una densidad de potencia promedio  $2.34 \text{ mW/M}^2$  en el rango de 23 -119 h, la CCM2 produjo una densidad de potencia promedio  $3.02 \text{ mW/m}^2$  en el rango de 23 -119 h, la CCM3 produjo  $29 \text{ mW/m}^2$  de densidad de potencia promedio en 7 h, la CCM4 produjo una densidad de potencia promedio de  $2.67 \text{ mW/m}^2$  en 7 h y la CCM5 produjo una densidad de potencia promedio de  $1.03 \text{ mW/m}^2$  en 5 h. Los controles de las 5 celdas produjeron una densidad de potencia promedio menor en comparación que las celdas inoculadas con las cepas. También se calculó la energía producida por las celdas, la CCM1 produjo 629.91 J, la CCM2 1610 J, la CCM3 0.7213 J, la CCM4 0.9648 J y la CCM5 0.04 J. Las pruebas moleculares identificaron a las 2 cepas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Estos resultados indican que con el compuesto inorgánico tiosulfato como sustrato produjo electricidad utilizando el cultivo de las 2 cepas de *At. ferrooxidans* en las Celdas de Combustible Microbianas.

**Palabras clave:** *At. ferrooxidans*, Tiosulfato, Celdas de Combustible Microbianas

## ABSTRACT

Acidophilic bacteria are predominant in the ecosystems of acid mine waters. The objective of the study was to produce electricity in the Microbial Fuel Cells (CCMs) from the thiosulfate using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Two cultures of *At. ferrooxidans* strain LB102 and LB151 were used, which were characterized morphologically, electrochemically and molecularly. The electrochemical techniques used were chronoamperometry and cyclic voltammetry. The cyclic voltammetry (VC1 and VC2) show current peaks of oxidation and reduction of the compounds indicating that there is an interaction of the bacteria with the surface of the electrode. The chronoamperometries (C1 and C2) showed that the bacteria was the producer of electricity when using thiosulfate alone and thiosulfate with iron. In the production of electricity, we have that the CCM1 produced an average power density of 2.34 mW /m<sup>2</sup> in the range of 23-119 h, the CCM2 produced an average power density of 3.02 mW /m<sup>2</sup> in the range of 23-119 h, the CCM3 produced 29 mW /m<sup>2</sup> of average power density in 7 h, CCM4 produced an average power density of 2.67 mW /m<sup>2</sup> in 7 h, and CCM5 produced an average power density of 1.03 mW /m<sup>2</sup> in 5 h. The controls of the 5 cells produced a lower average power density than the cells inoculated with the culture. The energy produced by the cells was also calculated, CCM1 produced 629.91 J, la CCM2 1610 J, la CCM3 0.7213 J, la CCM4 0.9648 J y la CCM5 0.04 J. The molecular tests identified the 2 strains as *Acidithiobacillus ferrooxidans*. These results indicate that with the inorganic compound thiosulfate as a substrate electricity was produced using the culture of 2 strains of *At. Ferrooxidans* in the Microbial Fuel Cells.

**Keywords:** *At. ferrooxidans*, Thiosulfate, Microbial Fuel Cells

## I. INTRODUCCIÓN

La electricidad generada en el mundo proviene principalmente de los combustibles fósiles (1). Sin embargo, su uso viene siendo muy discutido principalmente por la generación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el cual es el principal contribuyente de los gases de efecto invernadero (GEI), los cuales son los principales generadores del cambio climático.

En el Perú, la electricidad es manejada por centrales térmicas alimentadas por combustibles fósiles pertenecientes al Sistema Eléctrico Interconectado Nacional-SEIN (2) y otras empresas que no pertenecen a este sistema. La demanda nacional de electricidad en las últimas décadas se viene incrementando de forma exponencial, influenciado principalmente por el crecimiento económico y demográfico, las decisiones políticas, el desarrollo tecnológico y los hábitos de consumo o estilos de vida (3), esperándose que en un futuro no muy lejano no se pueda cubrir la demanda por lo que es necesario la búsqueda de nuevas tecnologías para cubrirla.

Por otro lado, nuestro país se encuentra dentro de puestos muy importantes a nivel latinoamericano y mundial por su desempeño en la minería. En Latinoamérica se encuentra dentro del primer lugar en la producción de zinc, plomo, estaño, plata y oro siendo solamente segundo lugar en la producción de cobre (4) y a nivel mundial ocupa el primer lugar en plata, tercer lugar en zinc, cobre y estaño; cuarto lugar en plomo y quinto lugar en oro (4). Asimismo, la minería es el segundo consumidor nacional de energía (31,4%) siendo solamente rebasado por el sector residencial, comercial y público (32,6%) (3) y es el principal responsable de la acumulación de sulfatos y metales disueltos en la hidrósfera, particularmente en aguas continentales superficiales y subterráneas pudiendo generar aguas ácidas de minas (5).

Teniendo en cuenta este contexto mundial y nacional, es de suma importancia la búsqueda de nuevas tecnologías limpias que ayuden con la generación de energía eléctrica utilizando especies químicas consideradas como contaminantes.

Dentro de esta búsqueda de nuevas tecnologías generadoras de electricidad, se encuentran las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs). Las CCMs son una tecnología emergente que en un futuro podría contribuir a solucionar dos de los problemas más críticos que afronta la sociedad actual: la crisis energética y la disponibilidad de agua no contaminada (6).

Una CCM es un dispositivo que utiliza microorganismos para convertir la energía química presente en un sustrato en energía eléctrica, esto es posible cuando bajo ciertas condiciones algunos microorganismos transfieren los electrones producidos en su actividad metabólica a un electrodo (ánodo) en lugar de un aceptor natural de electrones como el oxígeno (7). El mecanismo mediante el cual se transfieren electrones hacia el ánodo, puede ser mediante mediadores de electrones, es decir sustancias que facilitan el intercambio de electrones (p.ej. antraquinona), transferencia de electrones directa u otros mecanismos (8).

Una CCM típicamente puede ser construida en acrílico o vidrio (Fig.1) y está principalmente compuesta por dos cámaras, una anaeróbica y otra aeróbica (7,9) en medio de las cuales hay un separador. Asimismo, un electrodo de cobre, platino, grafito u otro material es colocado en cada una de las cámaras, siendo llamado ánodo en la cámara anaeróbica y cátodo en la cámara aeróbica. De igual forma, el separador es una membrana que impide el paso de electrones de la cámara anaeróbica a la aeróbica dejando pasar solamente los protones (7) para reducir compuestos orgánicos, inorgánicos y aire. El circuito es cerrado

mediante la adherencia de una resistencia para el pase de los electrones de la cámara anaeróbica a la cámara aeróbica.

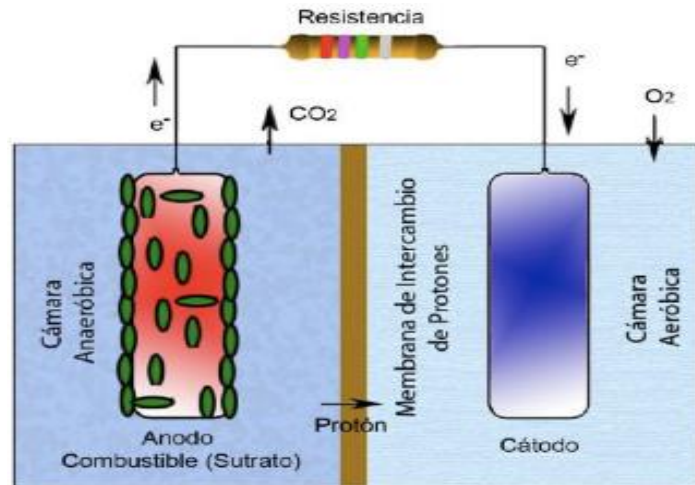


Fig.1: Configuración típica de una Celda de Combustible Microbiana. Tomado de Revelo, Hurtado y Ruiz, 2012 (7).

Las CCMs son utilizadas en la producción de hidrógeno, en la biorremediación de Uranio (VI), en el tratamiento de aguas residuales y como biosensores (6).

Mayormente en las CCMs se ha investigado sustratos orgánicos para producir electricidad (10,11); sin embargo, ya se ha comenzado la investigación con sustratos inorgánicos como azufre (13), sulfato (14), sulfuro (12, 14,15) y tetrionato (16, 17).

Por todo lo anteriormente mencionado, este trabajo busca producir electricidad a partir de tiosulfato en CCMs utilizando 2 cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, siendo las variables a evaluar energía (E), densidad de potencia promedio (DP) y voltaje (V).

## **II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Nuestro país es reconocido mundialmente por la producción de cobre (Cu), estaño (Sn), plomo (Pb), oro (Au) y Zinc (Zn) (4); pero a la misma vez, genera el acopio de sulfatos y metales disueltos en las aguas continentales superficiales (lagos, ríos, lagunas, etc.) y subterráneas, incrementando las aguas ácidas provenientes de las minas (5). Las aguas ácidas son aguas producidas como resultado de una oxidación química y biológica de sulfuros metálicos, especialmente la pirita, presentes en los relaves mineros (18) y rocas mineras litadas expuestas a la intemperie.

La industria minera genera grandes recursos para el Estado, y al mismo tiempo contamina los diversos ecosistemas. El consumo de energía y la contaminación podrían ser resueltos mediante la utilización de tecnologías eco sostenibles como las celdas de combustible microbianas, las cuales pueden aprovechar los iones metálicos liberados en las aguas ácidas para producir energía.

## **2.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1. Azufre**

#### **2.2.1.1. Características Generales**

El azufre es el decimosexto elemento más abundante en la litósfera con una abundancia promedio (por peso) aproximadamente de 0.05% (19). Además, en la hidrósfera es encontrado en forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y solamente puede ser directamente incorporado en su metabolismo por las bacterias, plantas y hongos. El sulfato en ausencia de oxígeno es reducido a hidrógeno sulfurado ( $\text{H}_2\text{S}$ ) por bacterias sulfato –reductoras en lugares pantanosos y en las profundidades del océano. Durante este proceso se libera oxígeno, que es aprovechado por otros organismos para su respiración (20). Mediante un proceso foto o quimiosintético en lugares que contienen oxígeno, el  $\text{H}_2\text{S}$  formado se oxida de nuevo a  $\text{SO}_4^{2-}$  o es combinado con el hierro precipitando en forma de pirita ( $\text{FeS}$ ). El ciclo se cierra cuando el  $\text{H}_2\text{S}$  se oxida formando ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en la atmosfera y es devuelto por las lluvias al mar o a la tierra (19). En la naturaleza, el azufre se puede encontrar mayormente en ambiente ácidos y extremadamente ácidos (pH: 1-3) y puede presentar diferentes estados de oxidación.

#### **2.2.1.2. Tiosulfato**

En las aguas termales existe la presencia de azufre en forma de tiosulfato que se origina como resultado de una oxidación incompleta del sulfuro disuelto (21). Asimismo, en soluciones ácidas la formación del tiosulfato se da durante las etapas iniciales de la hidrólisis del azufre (22).

En las aguas acidas de las minas ocurre la formación de tiosulfato, politionatos y sulfitos durante la oxidación de la pirita, únicamente cuando el oxígeno es el oxidante (23). Su descomposición ácida genera la formación de azufre elemental, politionatos y sulfitos (24) que son oxidados hasta sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) por el intermedio de procariontas acidófilas oxidantes del azufre (19).

## **2.2.2. Microorganismos Acidófilos**

Las bacterias, archaeas y eucariotas que tiene la capacidad de vivir en ambientes ácidos extremos son llamados microorganismos acidófilos.

### **2.2.2.1. Bacteria**

Uno de estos ambientes extremos son los drenajes de aguas ácidas por parte de la minería o rocas intemperizadas, donde podemos encontrar predominantemente bacterias pertenecientes a los filos proteobacteria, nitrospira, firmicutes, acidobacteria y actinobacteria (25,26).

El género bacteriano más común encontrado en los drenajes de aguas acidas es *Acidithiobacillus spp.* (26), son acidófilos obligados ( $\text{pH} \leq 4$ ) con crecimiento mesófilo. Además, son bacilos GRAM negativos ( $0.4 \times 2.0 \mu\text{m}$ ), motiles por uno o más flagelos (27). Asimismo, presentan un metabolismo quimiolitotrófico, teniendo la capacidad de oxidar  $\text{Fe}^{+2}$  y compuestos de azufre (*At. ferrooxidans*, *At. ferridurans* y *At. ferrivorans*) (26) y degradan el tiosulfato por la vía del tetraionato hasta óxido de azufre, azufre elemental y sulfatos mediante la utilización de dos enzimas: tiosulfato quinonaoxidoreductasa (TQO) y tetraionato hidrolasa (TetH), que parecen ser comunes para bacterias que habitan ambientes extremos (28).

También, encontramos en los drenajes de aguas ácidas a *Thiomonas sp.*, *Acidiphilum sp.*, *Acidiphilum cryptum*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Ferromicrobium acidophilus*, *Sulfobacillus spp.* y *Acidobacterium capsulatum* (25), encontrándose en simbiosis entre todos para poder subsistir en este ambiente.

#### **2.2.2.2. Archaeas**

Las arqueas encontradas en los drenajes de agua ácida están restringido al orden Thermoplasmatales y Sulfobales (25). Dentro del orden Thermoplasmatales, el género más común es *Ferroplasma sp.*, comprende arqueas hiperacidófilas oxidantes de hierro con un crecimiento óptimo a 1.2-1.7 pH y a 40 °C de temperatura (26) y dentro del orden Sulfobales. El género *Sulfolobus sp.* y *Acidianus sp.* han sido aislados de ambientes ácidos geotérmicos. Asimismo, todavía existe una diversidad de arqueas que no han podido ser cultivadas y que por medio de métodos moleculares han sido detectadas.

#### **2.2.2.3. Eucariotas**

En reportes antiguos sobre eucariotas encontradas en drenajes de aguas ácidas de minas, mencionaban al género *Cinetochilium* perteneciente al filo de los flagelados, una ameba relacionada con el género *Vahlkakampfia sp.* perteneciente al filo percolozoa (heterolobosea) y ciertas algas con capacidad para crecer en este tipo de ambiente. Sin embargo, con las técnicas moleculares y cultivos se ha podido determinar que principalmente se encuentra los taxas Archaeplastida, Stramenofilos, Alveolados, Rhizaria, Excavata y Ophistokonta (26).



Dentro de estos métodos electroquímicos se encuentran la cronoamperometría y la voltametría cíclica. La cronoamperometría mide la intensidad de corriente que fluye por un electrodo de trabajo estacionario sumergido en una disolución en función del tiempo teniendo un potencial constante (31) y la voltametría cíclica mide la intensidad de corriente que fluye por el electrodo de trabajo estacionario sumergido en una disolución en función del rango de potencial aplicado.

### 2.2.3.2. Celdas Galvánicas

Las celdas galvánicas son celdas donde reacciones de óxido-reducción se dan espontáneamente para obtener energía eléctrica. Están formadas por dos semiceldas, produciéndose en una de ellas una reacción de oxidación y en la otra una reacción de reducción (32).

Las semicelda está compuesta por una barra o lámina de metal M, llamada electrodo que se encuentra sumergido en una disolución acuosa con iones del propio metal  $M^{n+}$ , que provienen de una sal (32). Ambas semiceldas están conectadas con un puente salino para el paso de cationes y con un multímetro para medir el voltaje generado (Fig.3).

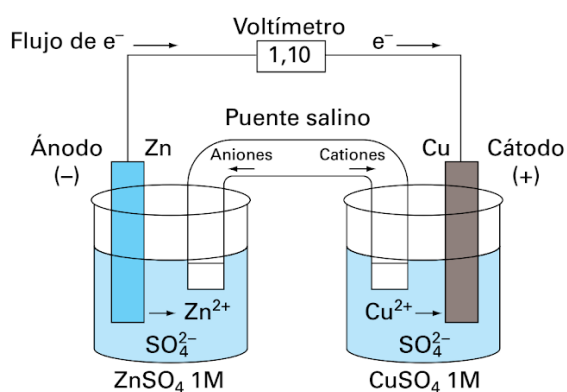


Fig.3: Celda Galvánica o Voltaica (Pila de Daniel). Tomado de Cabildo *et al*, 2013 (32).

Este modelo de celda galvánica puede ser utilizado para producir electricidad empleando microorganismos teniendo en cuenta su metabolismo, esta celda con microorganismos es llamada Celda de Combustible Microbiana (CCM).

### **2.2.3.2.1. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs)**

#### **2.2.3.2.1.1. Características Generales**

El concepto temprano de una Celda de Combustible Microbiana (CCM) fue demostrado por Potter en 1910 (10). Él produjo electricidad empleando cultivos vivos de *Escherichia coli* y *Saccharomyces* con electrodos de platino (33), que por su pequeña magnitud, pasaron inadvertidas para la comunidad científica. Recién se despertó un interés en la década de los ochenta, cuando se descubrió que se podía mejorar la producción de corriente y la potencia de estos sistemas mediante la utilización de mediadores redox solubles (34).

Las CCMs son dispositivos que utilizan microorganismos para convertir la energía química presente en un sustrato en energía eléctrica, esto es posible cuando bajo ciertas condiciones algunos microorganismos transfieren los electrones producidos en su actividad metabólica a un electrodo (ánodo) en lugar de un aceptor natural de electrones como el oxígeno (7, 35).

Las CCMs se diferencian de otros sistemas que generan energía porque operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a bajas temperaturas, producen una menor cantidad de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que cualquier otra tecnología actual que utilice combustibles fósiles para generar energía, por lo que las pocas emisiones de este gas no requieren ningún tipo de tratamiento,

tampoco necesitan aporte de energía siempre que el cátodo abiótico sea aireado pasivamente o sea un biocátodo (7).

La estructura básica de una CCM para la producción de electricidad consta de dos cámaras, una aeróbica y una anaeróbica separada por una membrana de intercambio de protones-MIP (6) y con electrodos de diferentes materiales como cobre (Cu), platino (Pt), fieltro de grafito, carbón, etc.

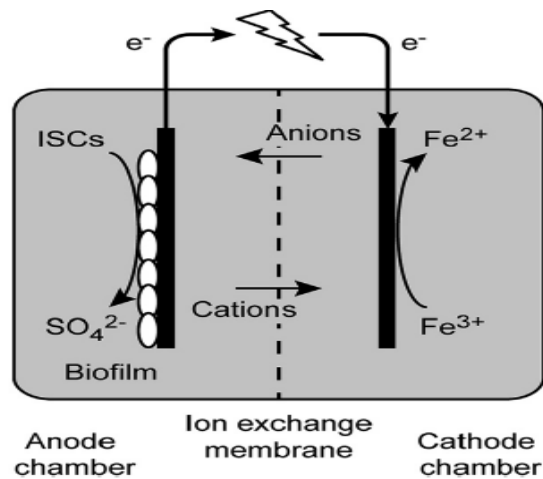


Fig.4: Diagrama esquemático de una CCM mostrando oxidación de compuestos inorgánicos de azufre (ISCs) en el ánodo, reducción de férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en el cátodo. Tomado de Ni *et al*, 2016 (17).

Hay diferentes tipos de CCMs, una forma muy utilizada es la H (Fig.2) que es aceptable para la investigación de parámetros básicos (36) como: evaluar la producción de electricidad usando nuevos materiales, o comunidades microbianas que surgen durante la degradación de componentes específicos.

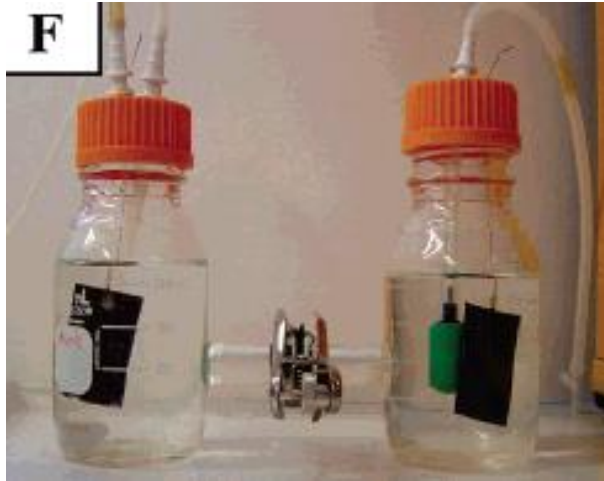


Fig. 5: Celda de Combustible en forma de H.  
Tomado de Logan *et al*, 2006 (36).

#### 2.2.3.2.1.2. Transferencia de Electrones

Para que se pueda generar electricidad se necesita que los microorganismos transfieran sus electrones al electrodo en la cámara anaeróbica, esta transferencia de electrones se da por varios mecanismos como la transferencia directa vía citocromos tipo c de la membrana externa, la transferencia mediante nanocables bacterianos, y los transportadores solubles (37).

Los estudios vinculados con la transferencia directa de electrones fueron realizados con *Geobacter sulfurreducens* debido que al estudiar su genoma secuenciado encontraron gran cantidad de citocromos tipo c. La forma en que esta bacteria transfiere los electrones al electrodo, es a través de estos (más de 100 citocromos tipo c codificados en su genoma), asociados a la membrana interna, periplasma y membrana externa (6,7,37). Otra bacteria de gran importancia es *Rhodospirillum rubrum*, esta bacteria oxida azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa a CO<sub>2</sub> y permite la recuperación del 80% de electrones transferidos en forma de electricidad (38), siendo esto atribuido a la

cantidad de células adheridas a la superficie del electrodo, siendo un gran candidato a ser utilizado en las celdas de combustible microbianas (10).

La presencia de nanocables o pili en algunos microorganismos como: *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*, son necesarios para el crecimiento de estas bacterias. Siendo estos pili los encargados de realizar la conexión eléctrica entre la célula y los óxidos de Fe (III) teniendo contacto directo con el ánodo de una Celda de Combustible Microbiana o formando una red entre las células para facilitar la transferencia de electrones a través de la biopelícula lo mejor posible, pues se sabe que *Geobacter* crece en monocapas y los pili proveen soporte estructural en la formación de dicha biopelícula siendo esenciales en la generación de la corriente (6).

Los microorganismos que no pueden transferir electrones al ánodo debido a la naturaleza no conductiva de su membrana necesitan de mediadores. Los mediadores son compuestos que tienen como finalidad entrar a la célula, aceptar electrones de varios acarreadores celulares, salir de la célula en estado reducido y entonces donar los electrones al ánodo (6). Algunos microorganismos como es el caso de *Shewanella oneidensis* liberan mediadores al medio para poder transportar electrones de la superficie celular hacia el electrodo (ánodo), otras bacterias necesitan de mediadores exógenos para realizar este proceso (7).

#### **2.2.3.2.1.3. Aplicaciones de las CCMs**

Las CCMs se encuentran siendo muy investigadas a nivel mundial, esto ha generado grandes progresos en su desarrollo y posibles aplicaciones alternativas para este tipo de tecnología, ya que podrían utilizarse para resolver problemas de gran envergadura. Estos dispositivos han sido utilizados para

producir hidrógeno, producir de bioetanol, tratar aguas residuales, biorremediar contaminantes y biosensores.

#### **2.2.3.2.1.4. Trabajos previos**

En el siglo XXI, se realizaron experimentos con la finalidad de evaluar la producción de electricidad en una Celda de Combustible Microbiana (CCM) con Membrana intercambiadora de Protones (MIP). Min *et al.* (2005) comparó el rendimiento de una CCM tipo MIP y una CCM con puente salino inoculados con *Geobacter metallireducens* siendo la potencia de salida de la CCM con puente salino de 2.2 mW/m<sup>2</sup>, que fue de menor magnitud que lo alcanzado por la CCM con la membrana intercambiadora de protones –Nafion- (39).

En el mismo año, Logan y colaboradores generaron electricidad a partir de la cisteína en Celdas de Combustible Microbianas con una MIP (Nafion), inoculando bacterias del sedimento de TorryBay, Escocia. La densidad de potencia generada fue de 19 mW/m<sup>2</sup>, la cual se incrementó hasta 33 mW/m<sup>2</sup> cuando la cisteína fue incrementada en el medio hasta 770 mg/L (40).

Gaviria y sus colaboradores (2008) emplearon una celda de combustible microbiana tipo MIP a escala de laboratorio para la generación de electricidad a partir de bacterias obtenidas de un inóculo mixto anaerobio de tipo entérico, obteniendo densidades de potencia de 640 y 336 mW/m<sup>2</sup> empleando resistencias de 640 Ω y 1000 Ω, respectivamente (41).

En el 2011, Buitrón y Pérez evaluaron la influencia de la separación de electrodos sobre la producción de electricidad y la eliminación de materia orgánica en CCM usando agua residual, obteniendo una densidad de potencia de 265±7 mW/m<sup>2</sup> para la CCM que presentaba una separación de 2.8 cm,

271±5 mW/m<sup>2</sup> para la CCM que presentaba una separación de 5.5 cm y 392±5 mW/m<sup>2</sup> para la CCM que presentaba una separación de 8.2 cm, evidenciándose que a mayor separación de los electrodos, se genera mayor densidad de potencia (42) y pudiendo remover hasta el 70 % del carbono presente en el agua.

En la actualidad, se han realizado investigaciones de producción de electricidad con *Acidithiobacillus ferroxidans* a partir de sales basales, sulfato de hierro y elementos traza (43) y con *Acidiphilium sp.* teniendo como sustrato a la glucosa (24), obteniendo buenos resultados en cuanto a parámetros básicos como densidad de potencia (DP) y voltaje (V). Además, *Acidithiobacillus ferroxidans* ha sido utilizado para estudiar el diseño y la construcción de una celda de combustible microbiológica a escala de laboratorio teniendo como sustrato inorgánico al azufre elemental (5).

También, se ha empezado a utilizar derivados del azufre como combustible de las CCMs, para ello emplearon cultivos mixtos aislados de aguas de industrias hidrometalúrgicas y los inocularon en las cámaras anódicas que contenían tetraionato o tetracionato + tiosulfato (16,17) y en las cámaras catódicas emplearon férrico (Fe<sup>+3</sup>), pudiendo generar electricidad.

### 2.3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, hay una vasta información sobre los diferentes microorganismos empleados en las CCMs para producir electricidad. Uno de estos microorganismos pertenece al grupo de las bacterias oxidantes de hierro y azufre, cuya función principal y específica es la oxidación de ambos compuestos para obtener la energía requerida para realizar sus funciones metabólicas.

Dentro de las bacterias oxidantes de hierro y azufre se encuentra *Acidithiobacillus ferrooxidans*, capaz de oxidar derivados del azufre (tiosulfato, tetratioato, etc.) y hierro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) para conseguir la energía necesaria para crecer y fijar  $\text{CO}_2$ . Además, es muy utilizada en procesos de lixiviación de minerales debido a su capacidad de oxidar sulfuros metálicos a sulfatos solubles.

La presente investigación se justifica porque a) es importante probar compuestos inorgánicos (tiosulfato) en las celdas de combustible microbianas para producir electricidad, b) es necesario conocer la producción de electricidad (voltaje) por parte de diferentes cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* teniendo como sustrato al tiosulfato y c) hay pocos trabajos con compuestos inorgánicos en celdas de combustibles microbianas.

Finalmente, esta investigación como otras similares aumenta el conocimiento científico sobre este microorganismo que es muy utilizado en el campo de la biotecnología dentro del sector minero para la biorremediación de aguas ácidas.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

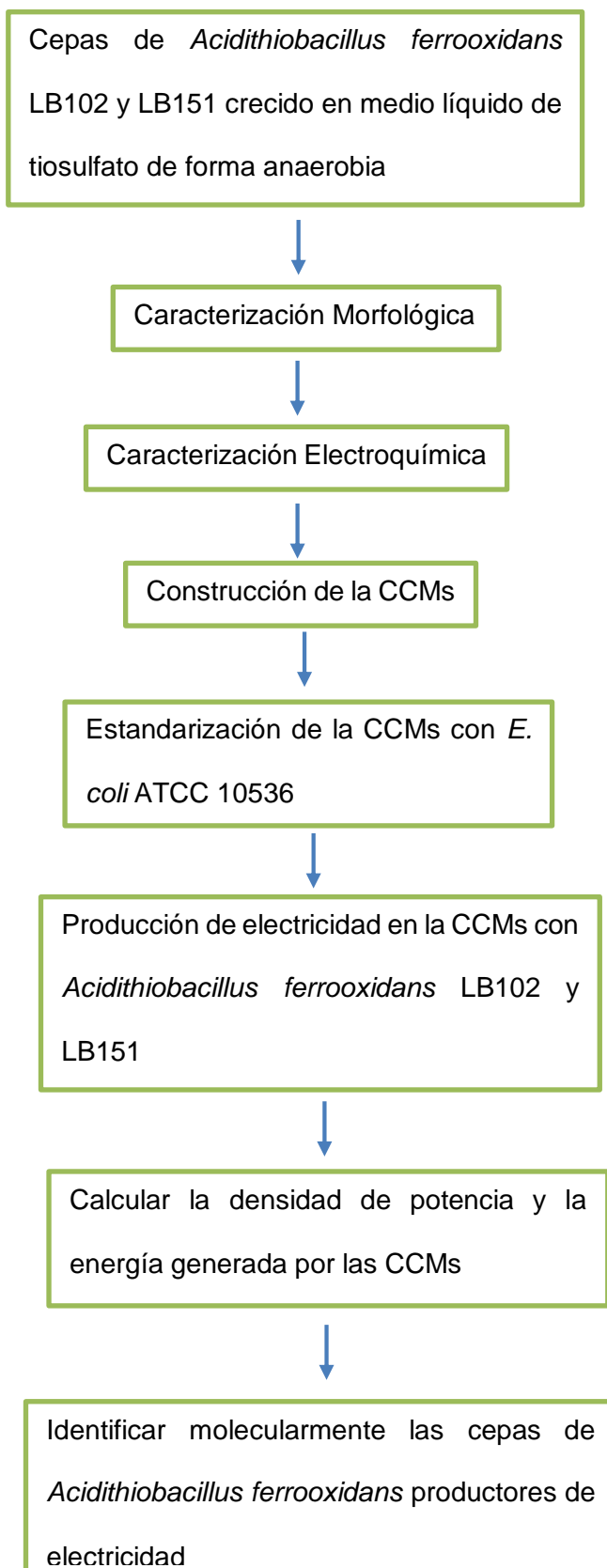
Producir electricidad a partir del tiosulfato con la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que pertenece al grupo de los microorganismos acidófilos, mediante su inoculación en las Celdas de Combustible Microbianas.

### **IV. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Caracterizar morfológicamente y molecularmente las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB102 y LB151 capaces de crecer en tiosulfato en condiciones anaeróbicas y aeróbicas
- Caracterizar electroquímicamente las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB102 y LB151 capaces de crecer en tiosulfato en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.
- Producir electricidad en las Celdas de Combustible Microbianas con las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB102 y LB151
- Calcular la densidad de potencia (DP) y la energía producida por cada Celda de Combustible Microbiana.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Flujograma del Proceso



## **5.2. Material Biológico**

Para el presente trabajo, se utilizaron 2 cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* que fueron aislados a partir de minerales y 1 cepa de *Escherichia coli* del banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología Ambiental del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach”) de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las cepas fueron *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 y *Escherichia coli* ATCC 10536

## **5.3. Medios Empleados**

### **5.3.1. Medios Líquidos**

Se emplearon los siguientes medios líquidos: el medio líquido de tiosulfato modificado de Tuovinen & Kelly (44, anexo 1), el medio líquido de tiosulfato-ferroso modificado de Tuovinen & Kelly (44, anexo 1) el medio líquido de tiosulfato-férrico modificado de Pronk, De Bruyn, Bos & Kuenen (45, anexo 1), el medio líquido FeO modificado de Johnson (46, anexo 1), el medio líquido TK/Fe (44, anexo 1) y el medio líquido Trypticase Soy Broth-TSB (anexo 1).

### **5.3.2. Medio Sólidos**

Se emplearon los siguientes medios sólidos: FeTio modificado de Johnson (46, anexo 1) y FeO modificado de Johnson (46, anexo 1).

### **5.3.3. Soluciones**

Se emplearon las siguientes soluciones Buffer fosfato ácido (anexo 1), Buffer fosfato neutro (anexo 1), solución de férrico (anexo 1), solución de cobre (anexo 1), solución de glucosa (anexo 1), solución de elementos traza (anexo 1), solución prestock (anexo 1), solución de sales basales 10x, solución de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 4% (w:v) (anexo 1), solución de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_2$ ) al 2% (w:v) (anexo 1) y solución de albumina de suero bovino 0.2 mg/mL (anexo 1), solución de Lowry A (anexo 1) y solución de Lowry B (anexo 1).

## **5.4. Caracterización de las cepas para inoculación en las Celdas de Combustible Microbianas**

### **5.4.1. Caracterización Microscópica**

#### **5.4.1.1. Coloración GRAM**

La coloración GRAM se utilizó con la finalidad de determinar si los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* eran Gram negativos y para observar su forma de bacilos (47). Esto fue observado con un microscopio compuesto en un aumento de 100X. La coloración GRAM fue realizado tanto para los medios sólidos FeTio y FeO como para medios líquidos de tiosulfato, FeO y TK/Fe.

#### **5.4.1.2. Coloración de Esporas**

La coloración de esporas fue realizada con el propósito de observar si se encontraban presentes en las muestras. Para lo cual, se utilizó la técnica de tinción de

esporas con verde de malaquita, esta consistió en cubrir la muestra con el colorante (verde de malaquita) y calentarlo en un mechero por 3 minutos hasta ver que la muestra emita vapores. Luego, se lavó con agua de caño y se cubrió con safranina (colorante de contraste) durante un minuto. Finalmente, se enjuagó con agua de caño y se secó con el calor del mechero.

#### **5.4.1.3. Motilidad**

La observación de motilidad de los cultivos de *At. ferrooxidans* fue realizada por la técnica de visualización en un Microscopio de Campo Oscuro HPM 5530. Esta técnica consistió en colocar una gota de la muestra de cada cepa en un portaobjeto cerca al mechero y cubrirla con un cubreobjeto. Finalmente, fue observado a 400 X en un Microscopio de Campo Oscuro para poder ver el tipo de movimiento del microorganismo.

#### **5.4.2. Crecimiento en medios líquidos**

Las 2 cepas de *At. ferrooxidans* fueron sembradas en tubos con medio líquido tiosulfato e incubados a  $28 \pm 2$  °C en anaerobiosis por un periodo de 7 hasta 30 días, siendo chequeadas periódicamente. La anaerobiosis fue obtenida mediante la incubación de los tubos dentro de una jarra de anaerobiosis (Anexo 2, Fig.1) conteniendo un sobre de anaerobiosis (Oxoid™ Anaerogen™, Thermo Fisher Scientific) y con su indicador de anaerobiosis- resazurina (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific). De igual forma, fueron sembradas en tubos con medio líquido TK-Fe y medio líquido FeO e incubados a  $28 \pm 2$  °C en aerobiosis por un periodo de 7 hasta 30 días, siendo chequeadas periódicamente.

El crecimiento fue determinado por la observación visual de los tubos durante el periodo de incubación.

### **5.4.3. Crecimiento en medios sólidos**

Con la finalidad de observar las características de las colonias, estas fueron sembradas por agotamiento en medio sólido FeTio y FeO, suplementados con voriconazol, al ser un antifúngico de amplio espectro (48). Las cepas que presentaron crecimiento en el medio sólido FeTio y FeO fueron repicadas.

El repique de las colonias crecidas en el medio sólido FeTio y FeO consistió en retirar una parte de la colonia de la placa y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 mL con agua ácida estéril (pH 1,8) siendo agitado en un vortex; después, se retiró 0.5 mL con una pipeta estéril y se inóculo a nuevas placas de FeTio esparciéndose con un asa de Drigalski por toda la placa. Luego, las placas fueron incubadas a  $28 \pm 2$  °C en anaerobiosis por un período de 7 hasta 30 días y revisadas periódicamente. La anaerobiosis fue realizada mediante la incubación de las placas como ya se indicó anteriormente (anexo 2, Fig.2) y las placas de FeO fueron incubadas a  $28 \pm 2$  °C en aerobiosis por un período de 7 hasta 30 días y revisadas periódicamente.

Se observaron las características macroscópicas de cada una de las cepas crecidas mediante un estereoscopio, teniendo en cuenta el borde, el color, la forma, tamaño y la superficie de la colonia.

## **5.5. Preparación de Inóculos**

### **5.5.1. Preparación del inóculo de *Escherichia coli* ATCC 10536**

La cepa fue caracterizada mediante la siembra por agotamiento en el medio EMB (Eosyn Methylene Blue Agar) produciendo colonias de color verde metálicas

(anexo 2, Fig. 3) y realizándole las pruebas bioquímicas de citrato, SIM, TSI, LIA, Voges Proskauer (VP) y rojo de metilo (RM): citrato -, SIM: Motilidad +, H<sub>2</sub>S- e indol +, TSI: A/A, H<sub>2</sub>S -, Gas +, LIA: K/K, H<sub>2</sub>S - (anexo 2, Fig.4 y 5), VP - y RM + (anexo 2, Fig. 6) para cerciorar que fuera un cultivo de *Escherichia coli*.

Luego, se tomaron 3 asadas de la cepa y se sembró en tubos con medio líquido TSB y se incubaron toda la noche a 37 °C.

### **5.5.2. Preparación del inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB102 y LB151**

Se prepararon inóculos para la caracterización electroquímica y para la producción de electricidad en las celdas de combustible microbianas. Las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB102 y LB151 fueron preparados por centrifugación. Para este fin se tomó 5 mL de cada una colocándose en 4 tubos eppendorf de 1.5 mL. Estos fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos (49) siendo descartado el sobrenadante y completando con agua ácida estéril (pH 3,5), los eppendorf fueron nuevamente centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. Este procedimiento fue realizado 3 veces, al acabar el procedimiento se descartó el sobrenadante y se les completo con medio fresco estéril dependiendo del experimento a realizar.

### **5.6. Caracterización Electroquímica**

La caracterización electroquímica de los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue determinado por medio de dos técnicas electroquímicas: 1. Voltametría Cíclica. 2. Cronoamperometría.

### 5.6.1. Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica fue realizada en una celda electrolítica estéril utilizando las siguientes variables:

1. VC1: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito y medio líquido de tiosulfato en la celda.
2. VC2: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito y medio líquido de tiosulfato + férrico en la celda.

#### 5.6.1.1. Estandarización del sistema de voltametría con Ferricianuro de potasio ( $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ ) /Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

La estandarización de la Voltametría Cíclica fue llevada a cabo en una celda electrolítica estéril con una configuración para 3 electrodos. El electrodo de trabajo (WE) y el contra electrodo (CE) fueron de fieltro de grafito teniendo un área de  $1 \text{ cm}^2$ , el cual fue activado mediante una inmersión en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.5 M) y enjuagado con agua destilada, ambos fueron sujetados con un alambre de cobre de 28 mm para ser colocados dentro de la celda. El electrodo de referencia fue de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Esta celda fue conectada al potencióstato (Potentiostat 466 system Model ER466-eDAQ, anexo 2, Fig.7) para aplicar una rampa de voltaje al electrodo de trabajo.

La solución de estandarización fue Ferricianuro de potasio ( $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ ) /Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de 0.1 M. La celda fue llenada con 40 mL de la solución de estandarización, la cual fue vertida en la celda con los 3 electrodos en su interior y conectados a un potencióstato, el cual aplico una rampa de voltaje desde -500 mV a 500 mV.

### **5.6.1.2. VC1: Prueba con medio líquido de Tiosulfato**

La voltametría cíclica al medio líquido de tiosulfato (5 g/L de tiosulfato) fue realizada en una celda electrolítica estéril con una configuración de 3 electrodos (descrito en la estandarización), colocando 40 mL del medio en su interior y siendo burbujeada con la mezcla de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% y 20%, respectivamente) durante 10 minutos y sellada con parafilm. A esta celda control se le aplicó una ventana de potencial de -1 V a 1 V con una velocidad de 100 mV/s con el potencióstato realizándolo cada hora para evaluar la estabilidad del sistema por un periodo de 3 días.

Después, la celda se esterilizó a 121 °C por 15 minutos en una autoclave y se llenó con 36 ml del medio líquido de tiosulfato y 4 ml del inóculo de *Acidithiobacillus ferroxidans* LB151, teniendo el mismo procedimiento de la celda control.

### **5.6.1.3. VC2: Prueba con medio líquido de Tiosulfato + Férrico**

La voltametría cíclica al medio tiosulfato (tiosulfato 5g/L) + férrico (Sulfato férrico 10g/L) fue realizada en una celda electrolítica estéril con una configuración de 3 electrodos (descritos en la estandarización), colocando 40 ml del medio en su interior y siendo burbujeada por la mezcla de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% y 20%, respectivamente) durante 10 minutos para generar anaerobiosis y sellada con parafilm. A esta celda control se le aplicó una ventana de potencial de -1 V a 1 V con una velocidad de 100 mV/s con el potencióstato realizándolo cada hora para evaluar la estabilidad del sistema por un periodo de 3 horas.

Luego, la celda fue esterilizada a 121 °C por 15 minutos en una autoclave y fue llenada con 36 ml del medio tiosulfato + férrico y 4 ml del inóculo de *Acidithiobacillus ferroxidans* LB151, después se realizó el mismo procedimiento que la celda control.

## 5.6.2. Cronoamperometría

La cronoamperometría fue realizada en una celda electrolítica estéril utilizando las siguientes variables:

1. C1: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unido al fieltro de grafito y medio líquido de tiosulfato en la celda.
2. C2: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unido al fieltro de grafito y medio líquido de tiosulfato + férrico en la celda.

### 5.6.2.1. C1: Prueba con medio líquido de Tiosulfato

La cronoamperometría fue realizada en una celda electrolítica estéril con la configuración de 3 electrodos (descritos en la estandarización), después fue llenada con 40 ml del medio líquido de tiosulfato siendo burbujeada con la mezcla de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% y 20%, respectivamente) durante 10 minutos y sellada con parafilm. A esta celda control se le aplicó con el potencióstato (Model 273A Potentiostat/Galvanostat - Princeton Applied Research, Anexo 2, Fig.8) un voltaje constante de 142 mV durante 1 hora.

Luego, la celda electrolítica fue esterilizada a 121 °C por 15 minutos en una autoclave y se le ingresó 36 ml del medio líquido tiosulfato y 4 ml del inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB151, para ser burbujeado con la mezcla de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% y 20%, respectivamente) durante 10 minutos y fue sellada con plastifilm. A continuación, se le aplicó con el potencióstato un voltaje constante de 142 mV durante 1 hora.

### **5.6.2.2. C2: Prueba con medio líquido de Tiosulfato + Férrico**

La cronoamperometría fue realizada en una celda electrolítica estéril con la configuración de 3 electrodos (descritos en la estandarización), colocando 40 ml del medio líquido de tiosulfato (Tiosulfato 5g/L) + férrico (Sulfato ferrico 10g/L) en su interior y burbujeada con la mezcla de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (80% y 20%, respectivamente) durante 10 minutos y sellada con parafilm. A esta celda control se le aplicó un voltaje constante de 440 mV con el potencióstato durante 1 hora.

Luego, la celda fue esterilizada a 121 °C por 15 minutos en una autoclave y se le ingresó 36 ml de tiosulfato + férrico y 4 ml del inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB151. Después, se siguió el mismo procedimiento que la celda electrolítica control.

## **5.7. Producción de electricidad en las Celdas de Combustible Microbianas (CCM)**

### **5.7.1. Construcción de las Celdas de Combustible Microbiana**

#### **5.7.1.1. Estructura de la Celda de Combustible Microbiana**

La Celda de Combustible Microbiana fue construida con el polímero metilmetacrilato (PMMA) comúnmente llamado acrílico. Para esto, una lámina de 4 mm de espesor fue cortada en cuadrados de 35 x 35 mm (caras laterales), rectángulos de 35 x 38 mm (paredes posteriores), 38 x 80 mm (bases) y 38 x 39 mm (pared superior). De igual forma, una lámina adicional de 10 mm de espesor fue utilizada para crear los sujetadores (rectángulos de 60 x 38 mm), esta fue utilizada para sujetar las

dos semiceldas y evitar derrames (anexo 2, Fig.9). Todos los cortes fueron realizados mediante una cortadora láser dejando los bordes lisos y así evitando que las rugosidades puedan impedir la unión total de las piezas. Además, a las paredes superiores se le realizaron tres orificios: dos orificios con un diámetro de 5.5 mm y uno en el centro con un diámetro de 1 mm.

#### 5.7.1.2. Activación de la Membrana Intercambiadora de Protones (MIP)

La activación de la Membrana Intercambiadora de Protones (Nafion<sup>®</sup> 117) fue realizada por inmersión secuencial, primero en agua destilada durante 1 hora a 80 °C, segundo en una solución al 3% de peróxido de Hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 1 hora a 80 °C y tercero en ácido sulfúrico 0.5 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 1 hora a 80 °C (51).

#### 5.7.1.3. Preparación de los electrodos de trabajo

Inicialmente se realizaron pruebas usando alambres de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito y posteriormente se utilizó alambres de platino (Pt).

##### 5.7.1.3.1. Alambres de Cobre (Cu)

Los electrodos a base de fieltro de grafito fueron cortados con una tijera en cuadrados de 10 x 10 mm. Seguidamente, fueron limpiados con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y autoclavados a 120 °C a 1 atm por 30 minutos (24). Asimismo, para la conducción de la energía eléctrica fueron seleccionados alambres de cobre n° 33, presentando un diámetro de 0.1798 mm con una cubierta esmaltada. Luego, fueron cortados con una longitud de 30 mm y el esmalte fue quemado con el mechero siendo los restos lijados con una lija de agua. Después, fueron cubiertos con poliuretano y secados en un horno durante 30 minutos a 40 °C. Finalmente, los cables fueron insertados a los electrodos

y pegados con tinta de plata (líquida) para ser secados a 110 °C por una hora (anexo 2, Fig. 10).

#### 5.7.1.3.2. Alambres de Platino (Pt)

Los electrodos a base de fieltro de grafito fueron cortados con una tijera en cuadrados de 10 x 10 mm. Seguidamente, fueron limpiados con el mismo protocolo que fue utilizado para los electrodos de trabajo de cobre (24). Para la conducción de la energía eléctrica fueron utilizados alambres de platino, presentando un diámetro de 2.5 mm, los cuales fueron cortados con una longitud de 30 mm. Después, fueron cubiertos con poliuretano y secados en un horno durante 30 minutos a 40 °C. Finalmente, los cables fueron insertados a los electrodos de trabajo (anexo 2 Fig. 11).

#### 5.7.1.4. Ensamblaje de la Celda de Combustible Microbiana

Las piezas de acrílico cortadas fueron utilizadas para armar 2 semiceldas, pegando con cianoacrilato (superglue) una base con tres paredes laterales y una pared superior formando un semi cubo y se insertaron los electrodos de trabajo por el orificio en el medio de la pared superior que tenía diámetro: 1 mm y una distancia a la membrana de 4 mm. La impermeabilidad fue asegurada sellando los bordes de las semiceldas con silicona acética y pegamento soldimix. Además, se colocaron 2 marcos de caucho en el medio de la celda, los cuales fueron fijados con superglue. Luego, la membrana intercambiadora de protones (Nafion<sup>®</sup>117) fue insertada en el medio de las 2 semiceldas. Finalmente, fueron presionadas por los sujetadores, utilizando 2 pernos de 130 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro (anexo 2, Fig.12). Una semicelda fue utilizada como cámara anódica y la otra como cámara catódica.

El circuito eléctrico de ambas semiceldas fue cerrado mediante la fijación de una resistencia de 5.6 K $\Omega$  en los electrodos de trabajo.

Las semiceldas fueron ensambladas en una cabina de bioseguridad y esterilizadas mediante luz UV (52) por 30 minutos. Acabado el tiempo de esterilización, las celdas fueron retiradas en bolsas plásticas estériles siendo trasladadas a la mesa de trabajo.

### **5.7.2. Estandarización de la Celda de Combustible Microbiana con *Escherichia coli* ATCC10536**

La estandarización de la celda de combustible microbiana prototipo fue llevado a cabo con el fin de demostrar la capacidad del sistema para producir electricidad.

La inoculación de la *Escherichia coli* ATCC10536 fue llevada a cabo mediante una jeringa estéril de 20 mL conectada a un adaptador estándar y fijada con silicona en el primer orificio del techo con un diámetro de 5.5 mm. Luego, de la inoculación el orificio fue sellado con silicona.

El ingreso del gas (80% N y 20% CO<sub>2</sub>) en la cámara anódica para generar anaerobiosis fue realizado por medio de un regulador de suero con una jeringa estéril fijada en el segundo orificio con un diámetro de 5.5 mm. El gas fue ingresado durante 10 minutos generando un burbujeo constante en el medio inoculado con *Escherichia coli* y siendo sellado con silicona al finalizar el tiempo.

Los electrodos de cobre se encontraban introducidos en el tercer orificio de la pared superior teniendo 1 mm de diámetro y con una distancia de la membrana de 4 mm.

Las celdas fueron monitoreadas utilizando un multímetro (Fluke 289) conectado a la resistencia del circuito eléctrico de ambas semiceldas de la Celda de

Combustible Microbiana prototipo. Los datos fueron tomados manualmente cada 2 horas y anotados en el cuaderno de trabajo.

### 5.7.3. Inoculación de la Celdas de Combustible Microbianas

Los experimentos fueron realizados en Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) utilizando las siguientes variables:

1. CCM1: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unido al fieltro de grafito, medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica, buffer fosfato ácido en la cámara catódica y como inóculo las cepas LB102 + LB151 de *At. ferrooxidans* crecidas en el medio líquido TK/Fe en aerobiosis.
2. CCM2: Electrodo de alambre de cobre (Cu) unido al fieltro de grafito, medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica, buffer fosfato ácido en la cámara catódica y como inóculo *At. ferrooxidans* LB151 crecidas en el medio líquido tiosulfato en anaerobiosis.
3. CCM3: Electrodo de alambre de platino (Pt) unido al fieltro de grafito, medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica, solución férrica en la cámara catódica y como inóculo *At. ferrooxidans* LB151 crecidas en el medio líquido tiosulfato en anaerobiosis.
4. CCM4: Electrodo de alambre de platino (Pt) unido al fieltro de grafito, medio líquido de tiosulfato + ferroso en la cámara anódica, solución férrica en la cámara catódica y como inóculo *At. ferrooxidans* LB151 crecidas en el medio líquido tiosulfato en anaerobiosis.
5. CCM5: Electrodo de alambre de platino (Pt) unido al fieltro de grafito, medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica, solución de cobre en la cámara catódica y como inóculo *At. ferrooxidans* crecidas LB151 en el medio líquido tiosulfato en anaerobiosis.

### **5.7.3.1. Electroodos de trabajo de alambre de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito**

#### **5.7.3.1.1. CCM1 y CCM2 con medio líquido de Tiosulfato (ánodo) y buffer fosfato ácido (cátodo)**

Las Celdas de Combustible Microbianas contenían 5 mL del medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica y 10 mL de buffer fosfato ácido (pH 3,5) en la cámara catódica, siendo ingresado 5 mL del inóculo de *At. ferrooxidans* LB151+LB102 provenientes del medio líquido de TK/Fe a la cámara anódica. Otro inóculo de *At. ferrooxidans* (cepa LB151) proveniente del medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis fue ingresado en otra cámara anódica de otra celda y presentado 10 mL de buffer fosfato ácido (pH 3,5) en la cámara catódica. Después, se procedió a burbujear durante 10 minutos la cámara anódica con la mezcla gaseosa compuesta de un 80% nitrógeno y un 20% de dióxido de carbono para generar la anaerobiosis. Finalmente, se sellaron todos los orificios con silicona para mantener las características anaerobias en la cámara anódica inoculada.

Además, una celda de combustible microbiana no fue inoculada conteniendo solamente 10 mL del medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica y 10 mL de buffer fosfato ácido (pH 3,5) en la cámara catódica, siendo utilizada como control del experimento.

Asimismo, fueron monitoreadas con un multímetro (Fluke 289) conectado a la resistencia del circuito eléctrico de ambas semiceldas, tomando los datos manualmente cada 2 horas y anotándolos en el cuaderno de trabajo.

### **5.7.3.2. Electroodos de trabajo de alambre de platino (Pt) unidos al fieltro de grafito**

#### **5.7.3.2.1. CCM3 con medio líquido de Tiosulfato (ánodo) y solución Férrica (cátodo)**

Una Celda de Combustible Microbiana contenía 5 mL del medio de cultivo líquido de tiosulfato y 5 mL del inóculo *de At. ferrooxidans* LB151 proveniente del medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias en la cámara anódica y la cámara catódica contenía 10 mL de solución férrica (pH 3,5). Después, se procedió a burbujear durante 10 minutos con la mezcla gaseosa compuesta de un 80% de nitrógeno y un 20% de dióxido de carbono para generar la anaerobiosis. Finalmente, se sellaron todos los orificios con silicona para mantener las características anaerobias en la cámara anódica inoculada. Asimismo, la celda presentó un control, el cual presentaba 10 mL del medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica y 10 mL de solución férrica (pH 3,5) en la cámara catódica. Ambas celdas fueron monitoreadas con un multímetro periódicamente y anotando los datos en el cuaderno de trabajo.

#### **5.7.3.2.2. CCM4 con medio líquido de Tiosulfato + Ferroso (ánodo) y solución Férrica (cátodo)**

Una Celda de Combustible Microbiana contenía 5 mL del medio líquido de tiosulfato + ferroso y 5 mL del inóculo *de At. ferrooxidans* LB151 proveniente del medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias en la cámara anódica y la cámara catódica contenía 10 mL de solución férrica (pH 3,5). Seguidamente, se procedió a burbujear durante 10 minutos con la mezcla gaseosa (80% N y un 20% de CO<sub>2</sub>) para generar la anaerobiosis. Finalmente, se sellaron todos los orificios con silicona para mantener las características anaerobias en la cámara anódica inoculada.

De igual forma que el experimento anterior, se realizó una celda control compuesta por 10 mL del medio líquido de tiosulfato + ferroso en la cámara anódica y 10 mL de solución férrica (pH 3,5) en la cámara catódica siendo monitoreadas con un multímetro periódicamente y anotando los datos en el cuaderno de trabajo.

#### **5.7.3.2.3. CCM5 con medio líquido de Tiosulfato (ánodo) y solución de cobre (cátodo)**

Una Celda de Combustible Microbiana contenía 5 mL del medio líquido de tiosulfato y 5 mL del inóculo *de At. ferrooxidans* LB151 proveniente del medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias en la cámara anódica y la cámara catódica contenía 10 mL de solución de cobre (pH 3,5).

De la misma forma que los experimentos anteriores se realizó la anaerobiosis y se sellaron todos los orificios con silicona. Además, se creó una celda control que contenía 10 mL del medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica y 10 mL de solución de cobre (pH 3,5) en la cámara catódica, las cuales fueron monitoreadas con un multímetro periódicamente y anotando los datos en el cuaderno de trabajo.

#### **5.7.4. Calculo de la densidad de potencia y la energía producida por cada Celda de Combustible Microbiana**

##### **5.7.4.1. Calculo del Voltaje Generado (mV)**

Para realizar el cálculo del voltaje generado por cada celda se aplicó la siguiente resta: Voltaje Generado = Voltaje de la Celda Inoculada – Voltaje de la Celda Control.

#### 5.7.4.2. Cálculo de la Densidad de Potencia (mW/m<sup>2</sup>)

La densidad de potencia (DP) fue calculado con la siguiente ecuación (36):

$$DP = \frac{(V_{Gen})^2}{R * A}$$

Donde:

DP = Densidad de Potencia (mW/m<sup>2</sup>)

V\_Gen = Voltaje generado en (mV)

R = Resistencia externa ( $\Omega$ ), siendo la escogida 5.6 k $\Omega$

A = Área del electrodo (m<sup>2</sup>), teniendo cada uno de estos 1 cm<sup>2</sup>

#### 5.7.4.3. Cálculo de la Energía Producida (J)

Para calcular la energía producida se utilizó el programa MatLab, el cual gráfico la curva de la densidad de potencia (mW/m<sup>2</sup>) versus el tiempo (H) por cada celda de combustible microbiana. El programa calculó el área bajo la curva de la gráfica antes mencionada con un procedimiento que convirtió las secciones entre puntos en trapezoides. Esto nos dio como resultado el total de energía generada. Asimismo, este resultado fue multiplicado por un factor de conversión: 1 mW\*H/m<sup>2</sup> = 3600/10<sup>7</sup> J para poder convertir las unidades en Joules (J).

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

## **5.8. Identificación Molecular de los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* productores de electricidad**

La identificación molecular se llevó a cabo mediante la amplificación del gen 16S rRNA de cada uno de los cultivos de *At. ferrooxidans* productores de electricidad y su posterior análisis en blast con la base de datos del GenBank. Para tal propósito, esta prueba se basó en las metodologías planteadas por Goldenberger, Perschil, Ritzler & Altwegg (53) y Quintana (54).

### **5.8.1. Extracción de ADN**

Para efectuar la extracción de ADN, los dos cultivos de *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 fueron cultivadas en el medio líquido TK/Fe de forma aerobia y en el medio líquido de tiosulfato de forma anaerobia e incubadas por 7 a 14 días a 28 °C. Previa a la extracción de ADN, se realizó coloración GRAM a cada una de las muestras para observar la presencia de bacterias y/o contaminantes.

Las cepas crecidas en el medio TK/Fe fueron concentradas por filtración debido a la presencia de hierro en las muestras, para ello se filtró 100 mL de cada cepa con una membrana de 0.22 µm (Durapore). A continuación, se le realizó un lavado a cada membrana con 20 mL de agua ácida estéril (pH 1,8) y este fue colectado en un tubo cónico estéril de 50 mL (Corning). Se dejó en reposo al menos 10 minutos para precipitar los compuestos férricos para luego colectar el sobrenadante y transferirlo nuevamente a un tubo cónico estéril de 50 mL. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente siendo el sobrenadante transferido a un nuevo tubo cónico estéril de 50 mL y el pellet fue resuspendido en 2 mL de Buffer A (Tris-HCl pH 8, NaCl 5M, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>O milli-Q, ajustado a pH 8 y autoclavado por 15 minutos a 121 °C).

Las cepas crecidas en el medio líquido de tiosulfato fueron concentradas mediante centrifugación, para este fin se tomó 50 ml de cada cepa y se colocaron en tubos cónicos estériles de 50 mL. Estos fueron centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos siendo descartado el sobrenadante y el pellet fue centrifugado a 12500 rpm por 20 minutos y nuevamente el sobrenadante fue descartado.

Los pellets de cada muestra (100µl) fueron colocados en tubos de 1.5mL con beads de 2mm y se les adiciono 400 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH 8). Luego, los volúmenes resuspendidos fueron trasladado a una matriz de lisis FastPrep® Lysis Beads- Matrix F (MP Biomedicals® CA, USA), los cuales fueron sometidos a 3 ciclos de 20 segundos. Una vez terminado el procedimiento, se les adiciono 75 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa K (20mg/mL) siendo mezclado el volumen total en un MaxiMix™ I Vortex Mixer (Thermo Scientific™ MA, USA) por 5 segundos e incubándose por 1 hora a 65 °C en baño maría, homogenizando en vortex cada media hora durante 1 minuto.

Posteriormente, se les añadió 100 µl de NaCl (5 M) y 100 µl de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65 °C) siendo el volumen total vortexeado en un MaxiMix™ I Vortex Mixer por 3 segundos e incubándose por 10 minutos a 65 °C en baño maría. Luego, se les adicionó 750 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se vortexearon para después ser centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Entonces, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5mL e inmediatamente se les adicionó 750 µl de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1) y nuevamente fueron vortexeados y centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos.

De manera inmediata, los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos eppendorf y se le añadió 1 mL de alcohol absoluto frío y fueron colocado a -70 °C por 20 minutos. Después, se centrifugaron a 10000 rpm por 8 minutos y fueron descartados los sobrenadantes. A los pellets obtenidos se les añadió 1 mL de etanol

al 70% y nuevamente fueron centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos, los pellets de ADN se pudieron visibilizar pegados al fondo de los tubos eppendorf.

Finalmente, se descartaron los sobrenadantes y los tubos se pusieron a secar a temperatura ambiente hasta que el etanol se haya evaporado completamente. Los pellets fueron resuspendidos en 50  $\mu$ l de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH 8) y guardados a -20 °C.

### **5.8.2. Verificación de la Integridad del ADN genómico**

Para verificar la integridad de cada ADN genómico se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se preparó un gel de agarosa al 1% en 100 ml de buffer TAE 1X (Tris base 40 mM, CH<sub>3</sub>COOH 20 Mm, 1 mM EDTA, pH 8.5). Adicionalmente se preparó dos diluciones del ADN extraído (1:10 y 1:2 v/v) (las diluciones se realizaron con agua libre de nucleasas) siendo evaluadas paralelamente con el ADN sin diluir.

La carga para cada carril estuvo compuesta por, 1  $\mu$ l de buffer de carga ADN Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific™ MA, USA) y 5  $\mu$ l de la muestra. Asimismo, fueron consideradas las muestras de ADN y sus respectivas diluciones. Finalmente, el gel se corrió a 80 V por 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal Sub-Cell® Model 96 (BioRad® Laboratories, CA, USA), fue utilizado bromuro de etidio para visualizar las bandas y revelado en un transiluminador con luz UV MS04 Smartview Transilluminator (Major Science® Inc. CA, USA).

### **5.8.3. Amplificación del Gen Ribosomal 16S por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la amplificación del gen Ribosomal 16S se empleó la técnica comúnmente llamada PCR. Para realizarlo, estuvo compuesto por agua PCR libre de nucleasas, primer 8F (40  $\mu$ M), primer 1492 R (40  $\mu$ M), Master mix Phusion High Fidelity. Los primers 8F y 1492 R son primers universales que amplifican el gen Ribosomal 16S obteniendo un producto de PCR de aproximadamente 1490 pb.

El PCR fue desarrollado en un termociclador LigthCycler® 480II (Roche© WI, USA) con el siguiente protocolo: pre incubación de 98°C 30seg, 98°C 1seg, 55°C 5 seg, 72°C 23 seg (30 ciclos), extensión final 72°C 1 min. Los productos que fueron generados se guardaron a 4 °C y luego fueron evaluados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **5.8.4. Secuenciamiento de los Productos de PCR**

Los productos del PCR de cada muestra fueron secuenciados por un servicio de terceros (Macrogen© MD, USA). Para esto se prepararon alícuotas de por los menos 50 ul de cada muestra (no se cuantificaron porque no fueron purificados). Los primers universales 8F( 5-AGA GTT TGA TMC TGG CTC AG), 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), 337F (5'-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG3'), 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3'), 785F (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') y 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') fueron seleccionados para el secuenciamiento siendo alicuotados y enviados en una concentración de 10  $\mu$ M con un volumen de 10  $\mu$ L para cada caso. Los resultados obtenidos del secuenciamiento fueron evaluados por BLASTn (NCBI).

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Caracterización de las cepas para inoculación en las Celdas de Combustible Microbianas

#### 6.1.1. Caracterización Microscópica

Las 2 cepas fueron caracterizadas microscópicamente permitiéndonos visualizar sus características morfológicas a un nivel micro. Las 2 cepas fueron identificadas como GRAM negativos con forma de bacilos cortos y presentando una motilidad positiva pudiendo observar dos tipos de movimiento: Swimming (55) y Browniano. (Tabla N°1).

Tabla N° 1: Caracterización Microscópica de las cepas 102 y 151.

<b>Cepa</b>	<b>Coloración GRAM</b>	<b>Concentración de bacilos</b>	<b>Motilidad</b>	<b>Tipo de Movimiento</b>
LB102	Bacilos cortos GRAM Negativos	Pocos	Positiva	Swimming
LB151	Bacilos cortos GRAM Negativos	Muchos	Positiva	Swimming y Browniano

Asimismo, en las 2 cepas de *At. ferrooxidans* no se observó presencia de esporas (Tabla N°2).

Tabla N°2: Resultados de la coloración de esporas por la técnica de verde malaquita.

<b>Cepa</b>	<b>Coloración GRAM</b>	<b>Esporas</b>
LB102	Bacilos cortos GRAM Negativos	Negativo
LB151	Bacilos cortos GRAM Negativos	Negativo

### 6.1.2. Crecimiento en medios líquidos

En el medio líquido de tiosulfato, el tubo de *At. ferrooxidans* LB151 presentó mucha turbidez, en la coloración GRAM se observó bacilos cortos negativo. Por otro lado, el tubo de *A. ferrooxidans* LB 102 mostró poca turbidez y en su coloración GRAM se encontraron pocos bacilos cortos GRAM negativos. Por lo cual, solamente se seleccionó a la cepa LB151 crecida en este medio (Tabla N°3) para ser inoculadas en los experimentos posteriores de producción de electricidad.

Tabla N°3: Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio líquido de tiosulfato

<b>Medio líquido de tiosulfato (Anaerobio)</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Turbidez</b>
LB102	+
LB151	+++

Leyenda: + = Poco turbio  
++ = Turbio  
+++ = Muy turbio

Por otra parte, ambas cepas crecieron muy bien en el medio líquido TK/Fe y en el medio líquido FeO presentando bacilos cortos GRAM negativos y oxidación del hierro produciendo un color naranja en los tubos (Tabla N°4 y Tabla N°5). Por lo que, se seleccionaron las dos cepas para ser inoculadas en los experimentos posteriores de producción de electricidad. Además, por crecer ambas cepas en este medio se optó por mezclarlas (v:v) para generar una mayor concentración de inóculo.

Tabla N°4: Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio TK/Fe.

<b>Medio líquido de TK-Fe (Aerobio)</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Oxidación de Fe</b>
LB102	++
LB151	++

Leyenda: - = No hay oxidación  
 + = Ligera oxidación  
 ++ = Buena oxidación

Tabla N°5: Crecimiento de las cepas LB102 y LB151 en el medio FeO.

Medio líquido de FeO (Aerobio)	
Cepa	Oxidación de Fe
LB102	++
LB151	++

Leyenda: - = No hay oxidación  
 + = Ligera oxidación  
 ++ = Buena oxidación

### 6.1.3. Crecimiento en Medios Sólidos

Las 2 cepas LB102 y LB151 fueron caracterizadas macroscópicamente hasta los 30 días en los medios FeTio y FeO debido a que presentaban un crecimiento lento y que no presentaban crecimiento en días anteriores. Al día 30 solo se pudo observar crecimiento de la cepa LB151 en el medio FeTio, presentando unas colonias de color amarillento en la placa con una forma irregular y con una superficie planoconvexa (Fig. 6). La coloración GRAM nos dio bacilos cortos GRAM negativos.



Fig. 6: A y B. Crecimiento en placa de FeTio de *At. ferrooxidans* LB151, C. Coloración GRAM de las colonias crecidas en la placa de FeTio.

Por otro lado, las 2 cepas crecieron en el medio sólido FeO durante el periodo de caracterización macroscópica. En las placas del medio FeO se pudo visualizar el crecimiento de colonias de color anaranjado con forma irregular, borde irregular,

elevación plana y superficie rugosa (Fig. 7). La coloración GRAM dio bacilos cortos  
GRAM negativos.

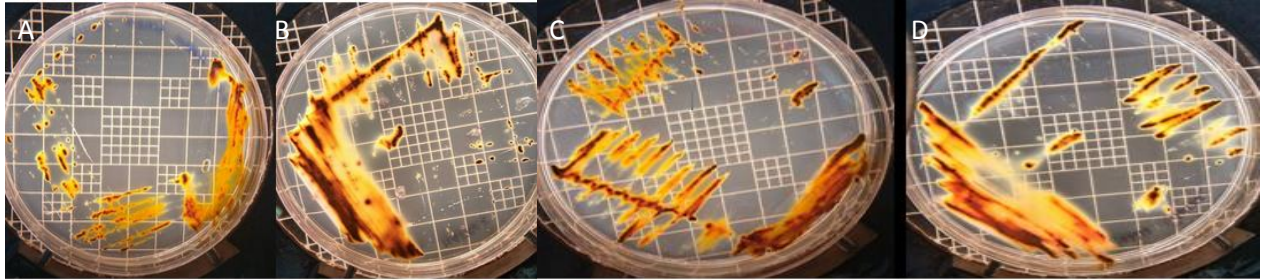


Fig. 7. Crecimiento en placa de Feo de *At. ferrooxidans*. A y B. Crecimiento de la cepa LB102 en el medio sólido Feo, C y D. Crecimiento de la cepa LB151 en el medio sólido Feo.

## 6.1.4. Caracterización Electroquímica

### 6.1.4.1. Estandarización de la Voltametría Cíclica con Ferricianuro de potasio ( $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ ) / Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

La Voltametría cíclica del medio nos muestra picos de corriente en -500 mV y 500 mV correspondientes a la oxidación y reducción de la solución de Ferricianuro de potasio/Ferrocianuro de potasio (Fig. 8)

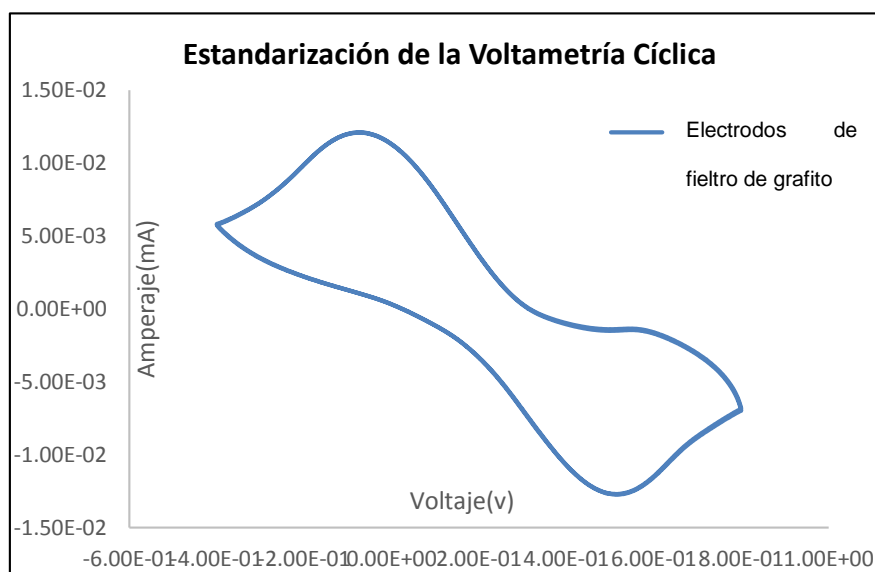


Fig. 8. Voltametría Cíclica del medio Ferricianuro de Potasio ( $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ ) / Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 6.1.4.2. Voltametría Cíclica del Medio líquido de Tiosulfato

La Voltametría cíclica del medio líquido de tiosulfato sin ser inoculado (control) nos muestra un ligero pico de corriente en 0.142 V (Fig. 9), este pico no es tan pronunciado como el pico de corriente producido al ser ingresado el inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* cepa LB151 (Fig.10), indicando algún tipo de interacción de la superficie del electrodo con la bacteria.

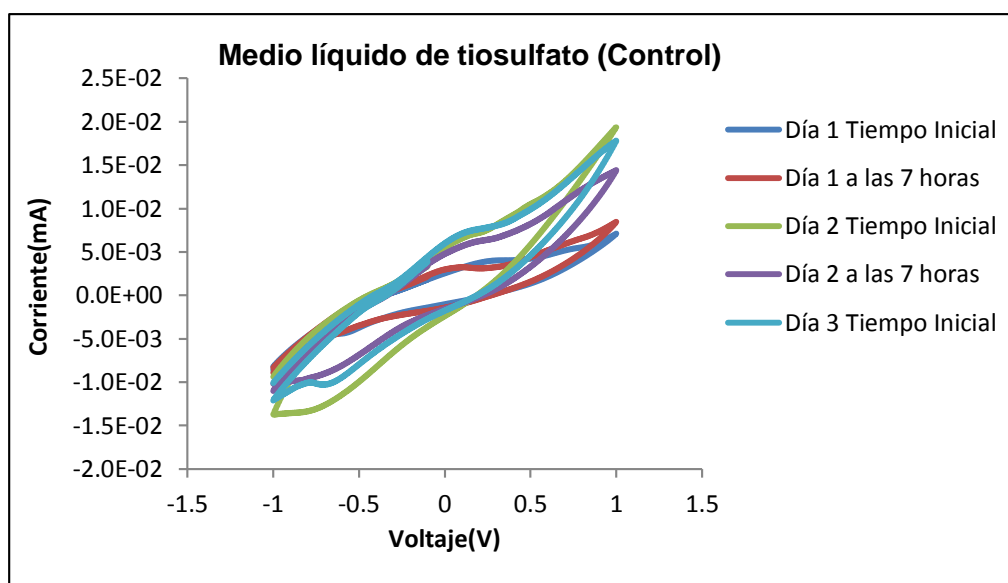


Figura N°9: Voltametría Cíclica del Medio Tiosulfato sin ser inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans*.

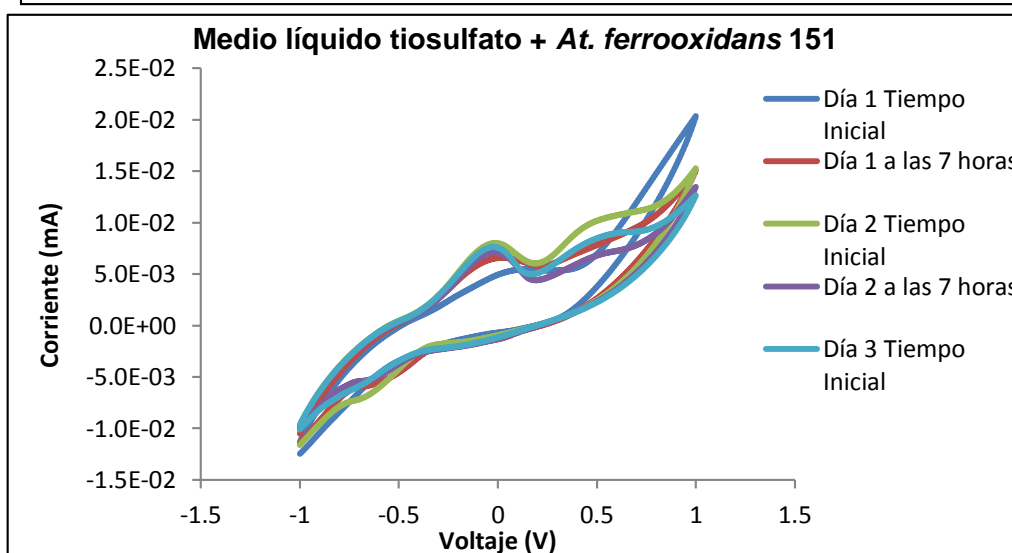


Figura N°10: Voltametría Cíclica del Medio Tiosulfato inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* (cepa LB151).

### 6.1.4.3. Voltametría Cíclica del medio líquido de Tiosulfato + solución Férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ )

La Voltametría cíclica del medio líquido de tiosulfato + solución férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) sin ser inoculado con *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB151 (Fig. 11), no muestra picos pronunciados de oxidación ni de reducción del tiosulfato o del hierro. Sin embargo, cuando se inóculo la bacteria *At. ferrooxidans* LB151, se puede observar picos pronunciados de oxidación y reducción del tiosulfato o del hierro (Fig.12).

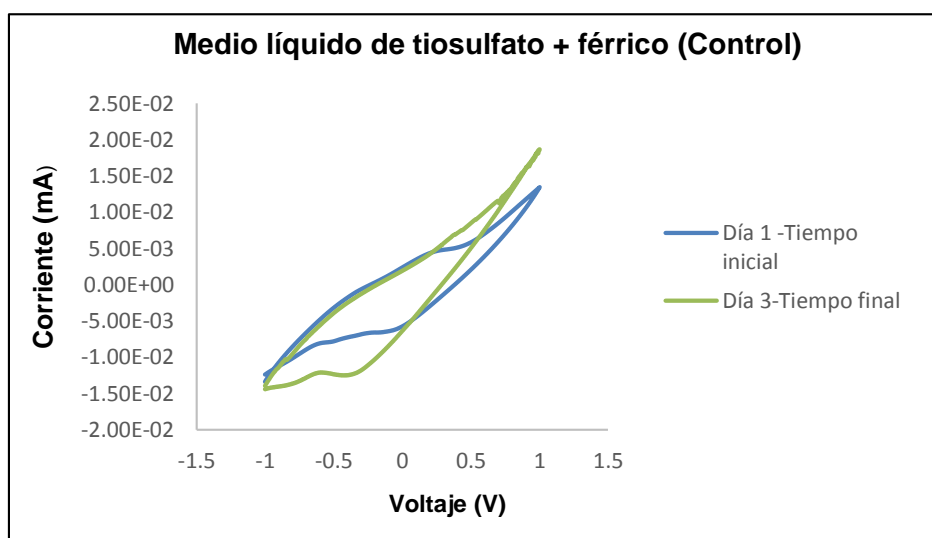


Figura N°11: Voltametría Cíclica del Medio Tiosulfato + solución férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) sin ser inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* cepa LB151.

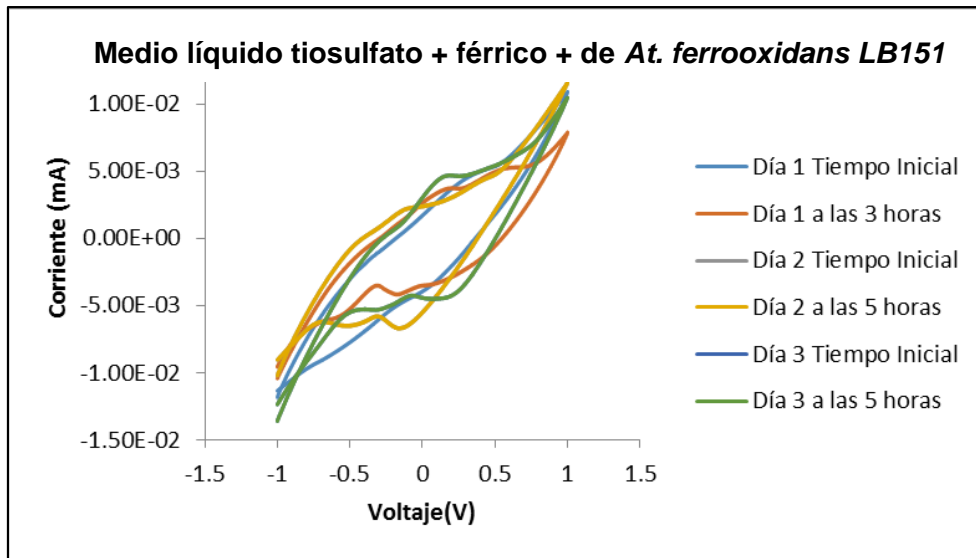


Figura N°12: Voltametría Cíclica del Medio Tiosulfato + solución férrica ( $Fe^{+3}$ ) inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* cepa LB151.

#### 6.1.4.4. Cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato

La cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato sin ser inoculado mostró una generación de corriente de  $-0.0015 \mu A$  que se mantuvo estable. Por el contrario, el medio inoculado con *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB151 generó mayor cantidad de corriente estable ( $-0,001 \mu A$ ), pudiendo observar que las bacterias son las productoras de la corriente (Fig. 13).

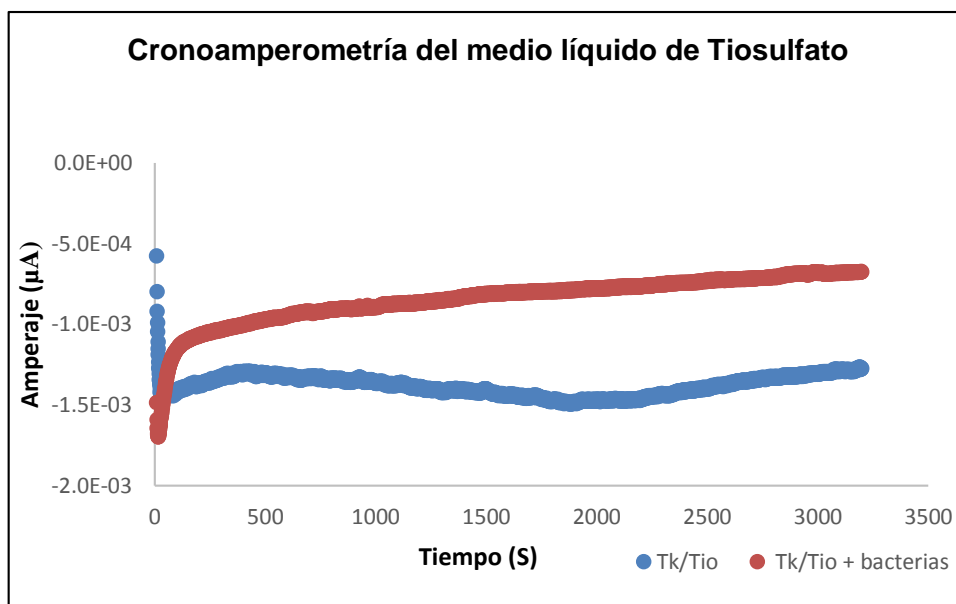


Figura N°13: Cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato. Azul: control y Rojo: con el inóculo de *At. ferrooxidans* LB151.

#### 6.1.4.5. Cronoamperometría del medio líquido de Tiosulfato + solución Férrica ( $Fe^{+3}$ )

La cronoamperometría del medio tiosulfato + solución férrica ( $Fe^{+3}$ ) inoculada con *Acidithiobacillus ferrooxidans* LB151 mostró una mayor generación de corriente estable que la cronoamperometría del medio sin ser inoculado. La corriente generada en el control se encuentra por debajo de 0 mientras que la corriente generada por las bacterias comienza desde 0.002 µA y sube hasta 0.005 µA donde se mantuvo estable (Fig. 14).

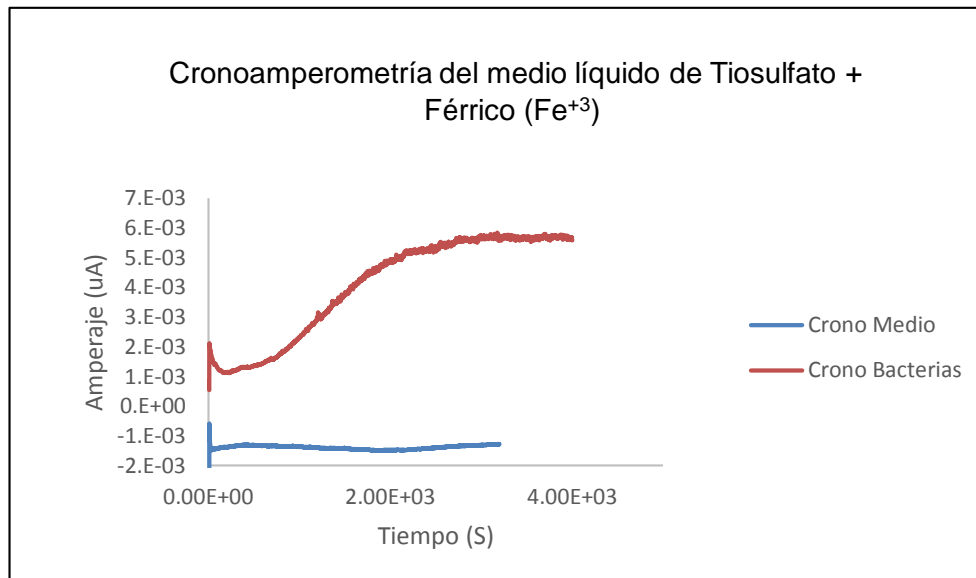


Figura N°14: Cronoamperometría del Medio T&K/Tio + Fe<sup>3+</sup>. Azul: medio tiosulfato + solución férrica (Fe<sup>3+</sup>) sin ser inoculado con la cepa LB151 (*At. ferrooxidans*) y Rojo: medio tiosulfato + solución férrica (Fe<sup>3+</sup>) inoculado con la cepa LB151 (*At.*

## 6.2. Producción de electricidad en las Celdas de Combustible Microbianas

### 6.2.1. Estandarización de las Celdas de Combustible Microbianas empleando

#### *Escherichia coli* ATCC 10536

La estandarización de CCM se llevó a cabo con *Escherichia coli* ATCC 10536 por ser una bacteria de crecimiento rápido y conocido. Para ello se utilizaron 2 celdas, una celda que presentaba los cables de cobre recubiertos con poliuretano y unidos con tinta de plata en el sitio de unión con el electrodo de trabajo y la otra con los cables de cobre que no se recubrieron ni fueron unidos con tinta de plata.

Las 2 celdas fueron monitoreadas durante un periodo de 124 horas pudiendo producir electricidad (mV) con la bacteria *E. coli*. Pasada las 73 horas se le agregó 3 mL de glucosa (2g/L) a ambas celdas (Fig. 15), y se observó un incremento en el voltaje

(mV), este fue atribuido al efecto de la glucosa adicionada y consumida por *E. coli* (38). Se encontró que la mejor producción de electricidad fue con los cables recubiertos con poliuretano y unidos al electrodo con tinta de plata.

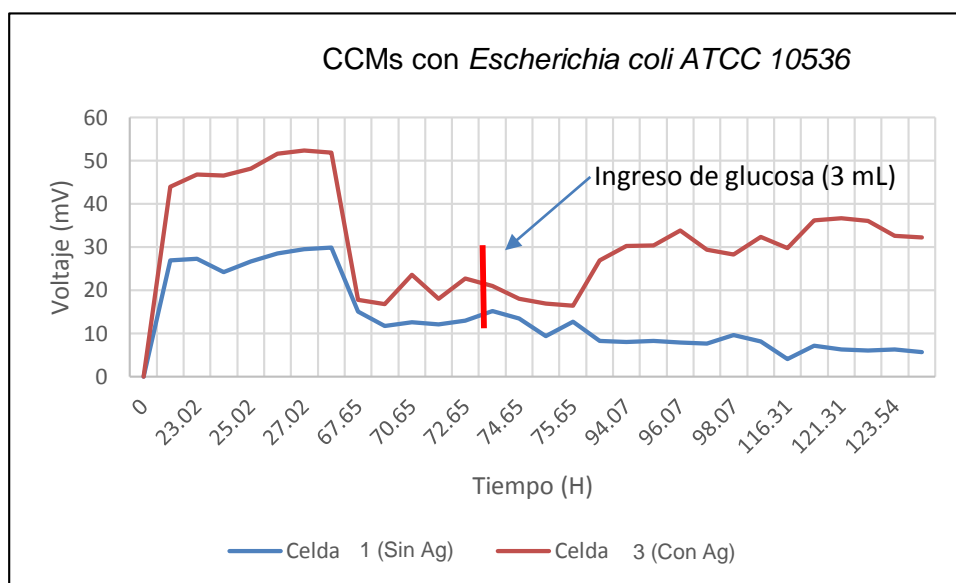


Fig.15: Estandarización de las CCMs con *Escherichia coli* con electrodos de cobre recubiertos con plata.

## 6.2.2. Inoculación de las Celdas de Combustible Microbianas

### 6.2.2.1. Electrodo de trabajo con alambre de cobre (Cu) unidos al fieltro de grafito

Para la producción de electricidad con electrodos de alambre de cobre unidos al fieltro de grafito se utilizó el medio líquido de tiosulfato en la cámara anódica y el buffer fosfato ácido (pH 3,5) en la cámara catódica. Para lo cual, 1 celda no fue inoculada (celda control), 1 celda que tenía como inóculo a *At. ferrooxidans* cepas LB102+LB151 provenientes del medio TK/Fe en aerobiosis y 1 celda que tenía como inóculo *At. ferrooxidans* cepa LB151 desarrollado en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias.

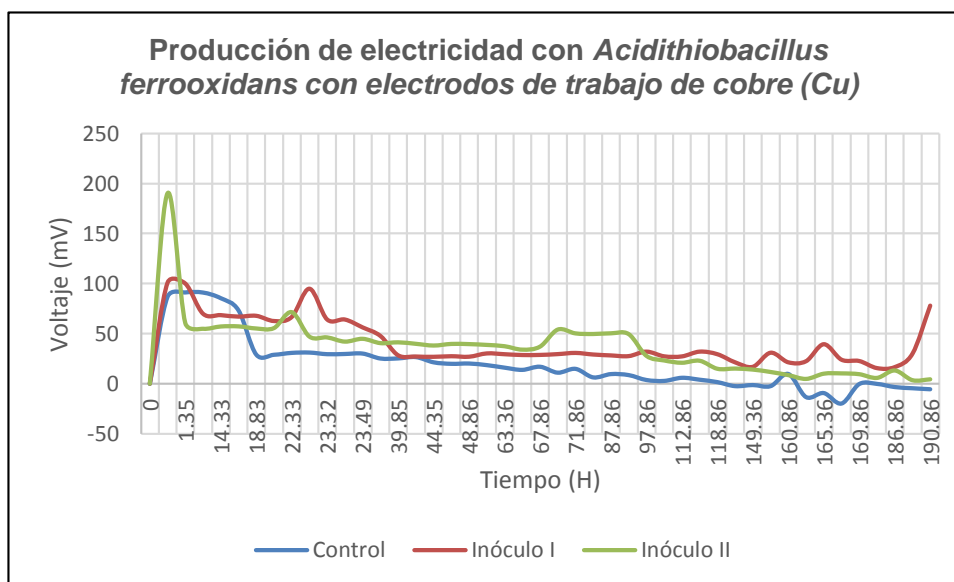


Fig.16: Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Inóculo I: Cepa LB102 + LB151 (*At. ferrooxidans*). Inóculo II: Cepa LB151 (*At.*

Las 3 celdas fueron monitoreadas por un periodo de 191 horas (Fig.16), observando que el voltaje de la celda control disminuía con el pasar de las horas mientras que las celdas conteniendo el inóculo de *At. ferrooxidans* desarrollados en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias y después inoculados en el medio líquido TK/Fe en aerobiosis (cepas LB102+LB151) y el inóculo *At. ferrooxidans* desarrollado en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias (cepa LB151) produjeron mayor voltaje que el control, evidenciándose el efecto de los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en las celdas de combustible microbianas.

Asimismo, con el programa Matlab se estimaron las curvas para cada experimento realizado (Figs.17, 18 y 19) para poder calcular el voltaje generado.

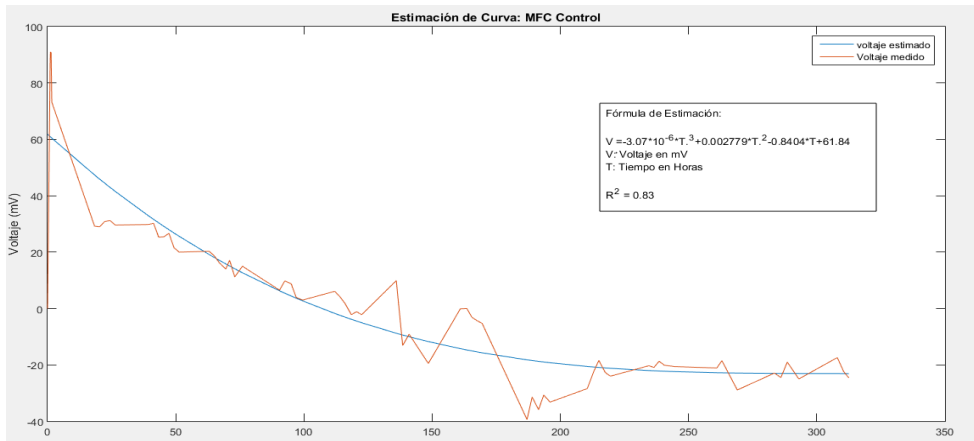


Fig.17: Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana control.

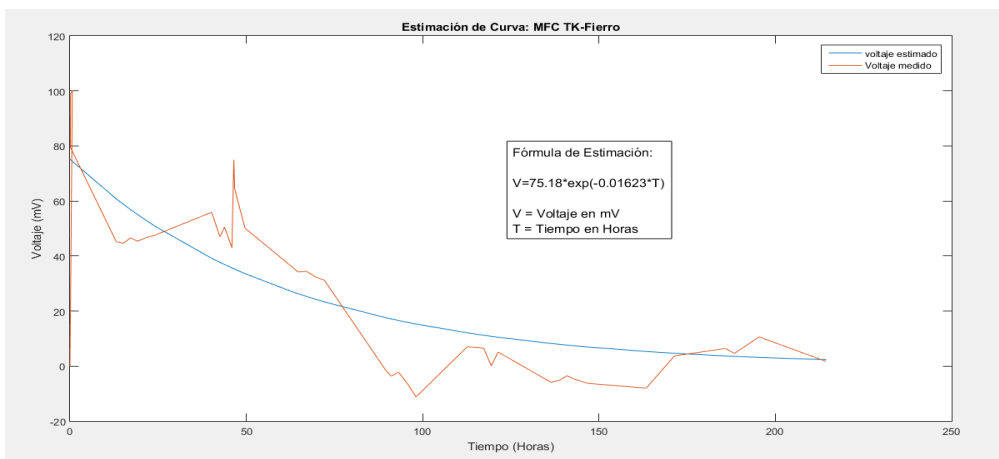


Fig.18: Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana inoculada con las cepas LB102 y LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio TK/Fe.

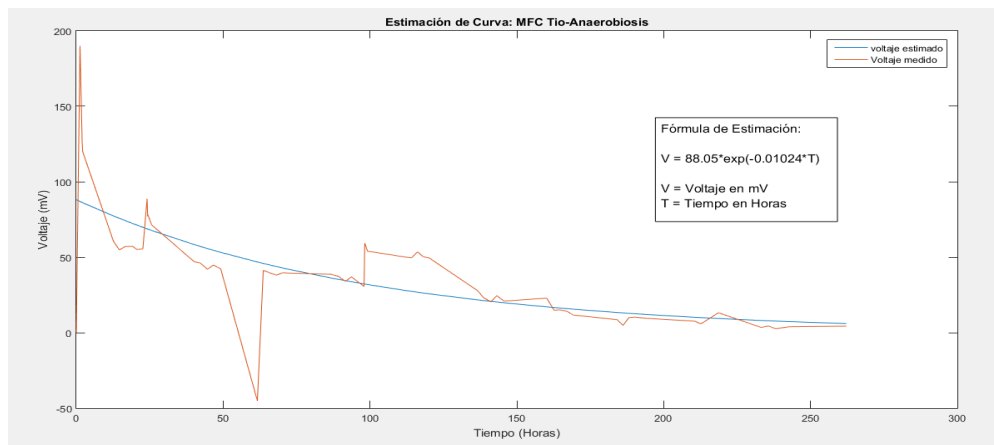


Fig.19: Estimación de la curva de la Celda de Combustible Microbiana inoculada con la cepa LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio líquido de tiosulfato

El voltaje generado fue calculado utilizando la fórmula de Voltaje generado (mV) es igual al voltaje de la celda con inóculo (I o II) menos el voltaje de la celda control (Fig.20).

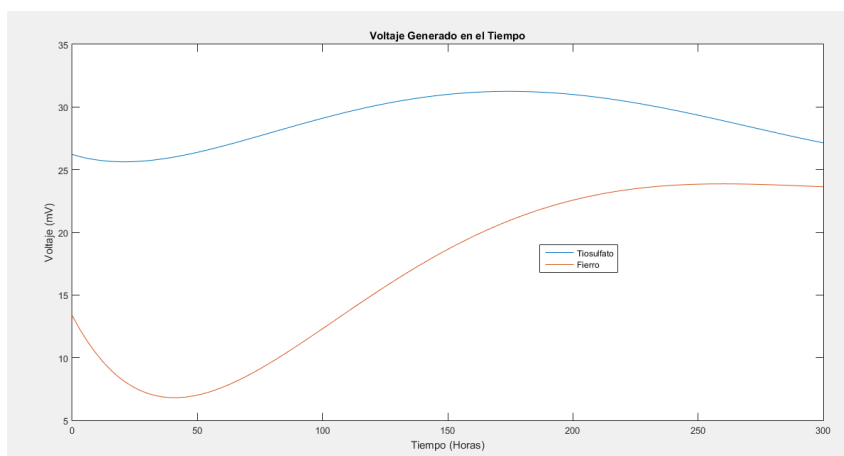


Fig.20: Gráfica del voltaje generado. Naranja: CCM inoculada con las cepas LB102 y LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio TK-Fe. Azul: CCM inoculada con la cepa LB151 (*At. ferrooxidans*) provenientes del medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis.

Con los valores obtenidos de voltaje generado se pudo calcular la densidad de potencia y la energía producida (Tabla n° 7).

Tabla N°6: Cálculos de la Densidad de Potencia (DP) y Energía Producida (EP) para la CCMs con electrodos de trabajo de cobre (Cu).

Cepas inoculadas	Medio de cultivo		DP (mW/n <sup>2</sup> )	EP (J)
	Ánodo	Cátodo		
LB102+LB151	Tiosulfato	Buffer fosfato ácido	2.34	629.91 J
LB151	Tiosulfato	Buffer fosfato ácido	3.02	1610 J

La celda que fue inoculada con el inóculo de *At. ferrooxidans* desarrollados en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias y después inoculados en el medio líquido TK/Fe en aerobiosis (cepas LB102+LB151) una densidad de potencia promedio de 2.34 mW/m<sup>2</sup> y 629.91 J de energía en el rango de 23-119 h, mientras que la celda inoculada con el inóculo de *At. ferrooxidans* desarrollado en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias (cepa LB151) produjo una densidad de potencia promedio de 3.02 mW/m<sup>2</sup> y de 1610 J de energía en el mismo rango siendo esta celda una mejor productora de electricidad.

### 6.2.2.2. Electrodo de trabajo con alambre de platino (Pt) unidos al fieltro de grafito

#### 6.2.2.2.1. CCM3 con medio líquido de Tiosulfato (cámara anaeróbica) y solución Férrica (cámara catódica)

Este experimento se utilizó el medio líquido de tiosulfato y el inóculo de *At. ferrooxidans* desarrollado en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias (cepa 151) en la cámara anódica y solución férrica (Fe<sup>+3</sup>) en vez de buffer fosfato ácido (pH 3,5) en la cámara catódica.

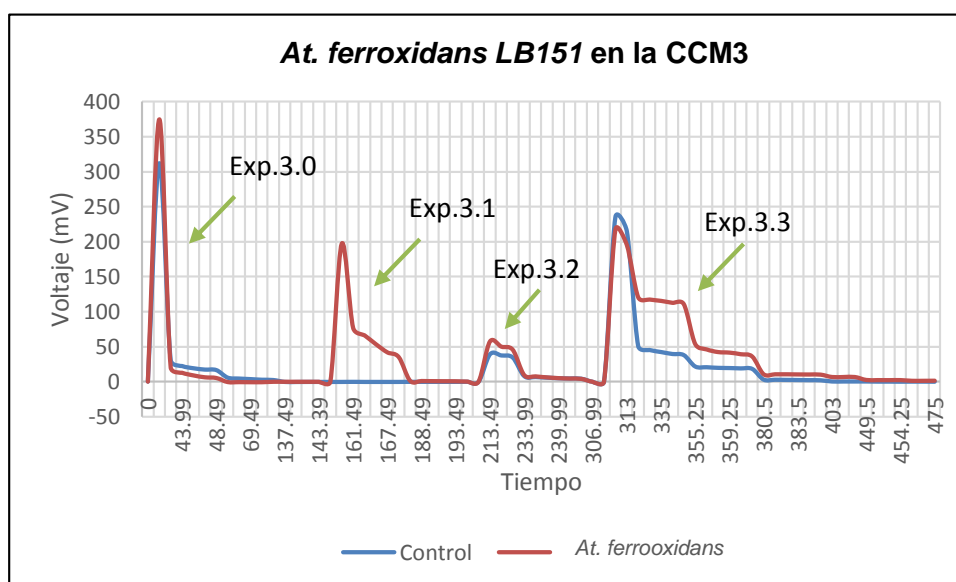


Fig.21: *At. ferrooxidans* cepa LB151 en la CCM 3 con medio líquido de Tiosulfato (cámara anaeróbica) y solución Férrica (cámara catódica).

Ambas celdas fueron monitoreadas por un periodo de 475 horas, produciendo picos mayores a 200 mV, después de las 307 horas se puede observar que la celda con el inóculo de *At. ferrooxidans* desarrollado en el medio líquido de tiosulfato en condiciones anaerobias (cepa LB151) produjo mayor voltaje (mV) en el tiempo que la celda control (Fig.21). De igual forma que el experimento anterior, se le calculo su densidad de potencia y su energía producida (Tabla N°6). No se calculó al exp. 3.0 y 3.1 al no ser monitoreado en el mismo tiempo que los experimentos posteriores.

Tabla N°7: Cálculos de la Densidad de Potencia (DP) y Energía Producida (EP) para la CCM de adaptación del cultivo de *At. ferrooxidans*.

Cepas inoculadas	Medio de cultivo		DP (mW/m <sup>2</sup> )	EP (J)
	Ánodo	Cátodo		
LB151 (exp. 3.2)	Tiosulfato	Férrico	4.77	0.00113 J
LB151 (exp. 3.3)	Tiosulfato	Férrico	24.23	0.071 J
Total			29	0.07213 J

La adaptación la cepa de *At. ferrooxidans* LB151 produjo 29 mW/m<sup>2</sup> de densidad de potencia promedio y 0.07213 J de energía en 7 h teniendo en cuenta solamente los experimentos 3.2 y 3.3.

#### 6.2.2.2.2. CCM4 con medio líquido de Tiosulfato + Ferroso (cámara anaeróbica) y solución Férrica (cámara catódica)

Por otra parte, se quería verificar el efecto del hierro (Fe) en la producción de la electricidad en la celda, para ello se adicionó hierro como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) en la cámara anaeróbica y se le inoculó *At. ferrooxidans* LB151 proveniente del medio líquido tiosulfato en anaerobiosis y solución Férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) en la cámara catódica (Fig. 22).

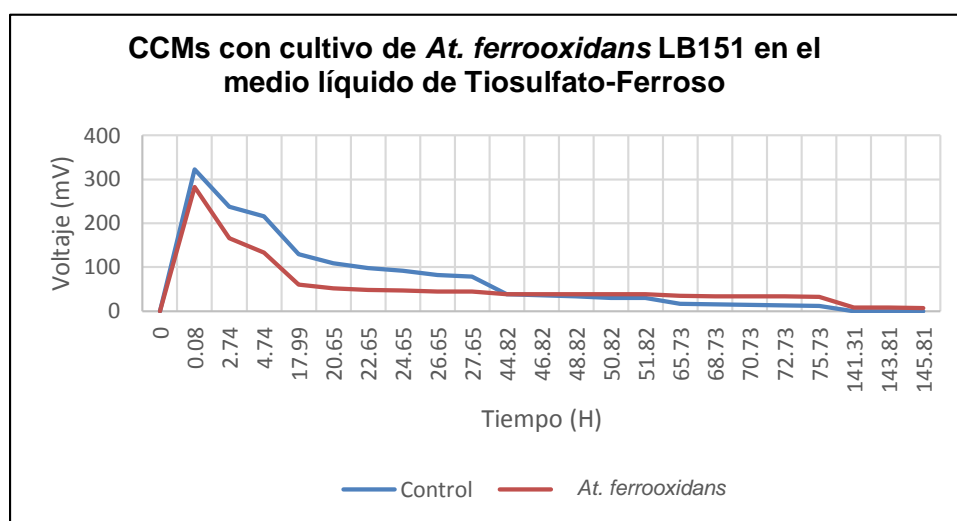


Fig.22: Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el medio líquido de tiosulfato ferroso.

Las dos celdas fueron monitoreadas por un periodo de 146 horas, pudiendo observarse que a partir de las 45 horas el voltaje generado por *At. ferrooxidans* LB151 es mayor que el de la celda control, produciendo una densidad de potencia promedio de  $2.67 \text{ mW/m}^2$  y  $0.09648 \text{ J}$  de energía en 7 h.

### 6.2.2.2.3. CCM5 con medio líquido de Tiosulfato (cámara anaeróbica) y solución de cobre (cámara catódica)

De igual forma, en esta ocasión se quiso comprobar la producción de electricidad (mV) cambiando el medio férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) de la cámara catódica por cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Para ello se utilizó nuevamente la cepa de *At. ferrooxidans* LB151 proveniente del medio líquido de tiosulfato en condiciones anaeróbicas con medio líquido de tiosulfato en la cámara anaeróbica y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en la cámara catódica (Fig.23).

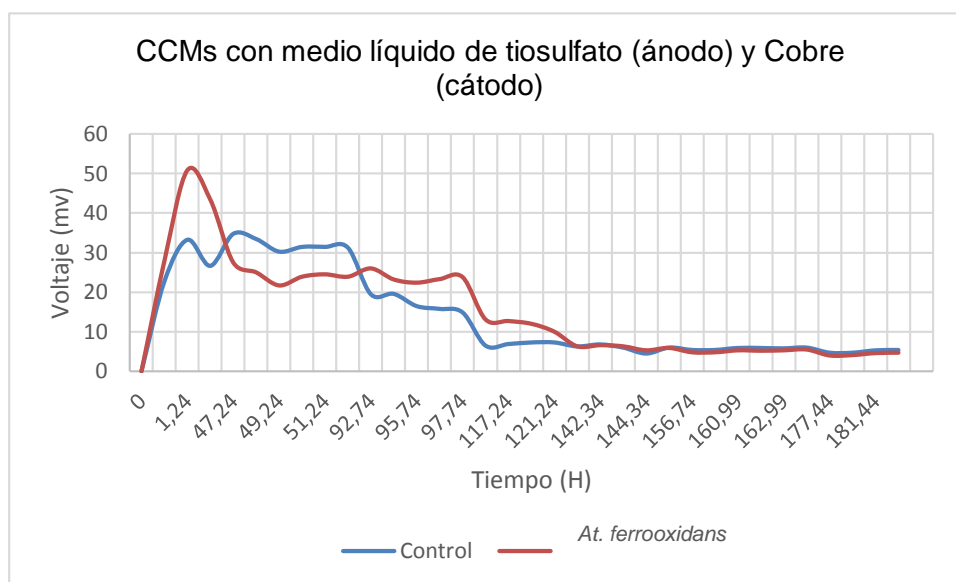


Fig.23: Producción de electricidad en CCMs con *Acidithiobacillus ferrooxidans* en el medio líquido de tiosulfato (ánodo) y solución de Cobre (cátodo).

La celda inoculada en el ánodo con *At. ferrooxidans* LB151 produjo una densidad de potencia promedio de  $1.03 \text{ mW/m}^2$  y  $0.004 \text{ mJ}$  de energía producida en 5 h.

### 6.3. Identificación molecular de los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* productores de electricidad

#### 6.3.1. Verificación de la Integridad del ADN extraído

Se extrajo ADN de 2 cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* seleccionados por su capacidad de crecer en tiosulfato en condiciones anaerobias y producir electricidad en las Celdas de Combustible Microbianas. Después, se realizó la verificación de la integridad de los ADNs extraídos mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%.

La extracción de ADN de los 2 cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* indico una ligera degradación visualizado por un smearing en el carril correspondiente (Fig. 24 A: carril 14 y 15. B: carril 6,9,10 y 11), a pesar de esto la cantidad de ADN fue suficiente para realizar la amplificación.

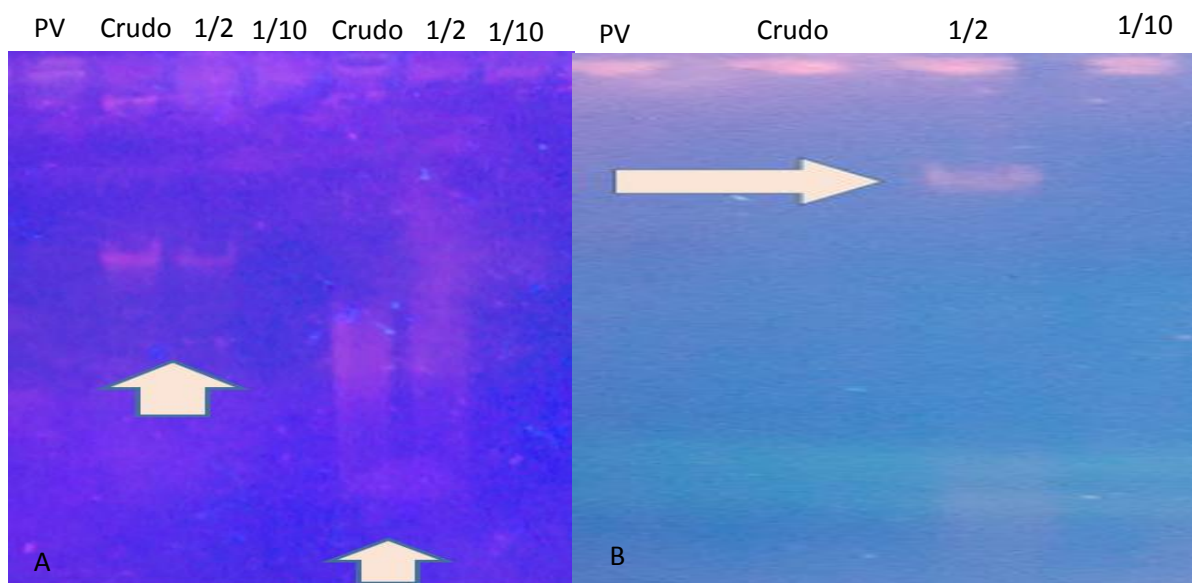


Fig.24: Verificación de la Integridad del ADN. Se visualizan los productos de extracción de las cepas LB151 (A) de tiosulfato y LB102 (B) de TK/Fe en una corrida electroforética de gel de Agarosa al 1%. PV = Pozo vacío

### 6.3.2. Amplificación del Gen 16 S rRNA por PCR

Después de extraer y verificar la integridad del ADN, se procedió a desarrollar el PCR. Los productos generados tuvieron un tamaño aproximado de 1500 pb de acuerdo a los que se esperaba, siendo evaluados en una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% (Fig. 25).



Fig.25: Electroforesis de los productos de PCR de las cepas LB102 de TK/Fe y LB151 de Tiosulfato. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% y enfrentados a un marcador de peso molecular (MW) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific CA, USA).

### 6.3.3. Secuenciamiento de los Productos de PCR

El secuenciamiento de las cepas fue proporcionado por la empresa Macrogen<sup>®</sup>, para ser posteriormente evaluadas con el programa BLASTn<sup>®</sup>. El contraste por BLASTn<sup>®</sup> arrojó un alto porcentaje de identidad ( $\geq 95$ ) a la región 16S de origen bacteriano. Tras el análisis se logró identificar a la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NCBI secuencia de referencia: NR\_074193.1) para la cepa LB102 proveniente del medio TK/Fe con un 98% de identidad y se identificó a la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NCBI secuencia de referencia: NR\_074193.1) para la cepa LB151 que creció en el medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis con un 95% de identidad.

## VII. DISCUSIÓN

El primer microorganismo acidófilo descrito como proteobacteria oxidante del azufre fue *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aislada por primera vez de drenajes ácidos de minas de carbón (56), presentando una distribución en diversos ambientes naturales como ríos, cuevas, minas, etc (19). En el presente estudio se emplearon dos cultivos de *At. ferrooxidans* (cepa 102 y 151) que tenían la capacidad de crecer anaeróbicamente en tiosulfato y que fueron sometidas a una caracterización morfológica y electroquímica para después utilizarlas en la producción de electricidad en las CCMs.

La caracterización microscópica permitió identificar a las cepas *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 como bacilos cortos Gram negativos y con motilidad positiva que son morfologías descritas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergeys (57) y en la reclasificación de algunas especies de *Thiobacillus* (27) para *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El cultivo de *At. ferrooxidans* LB151 en el medio sólido FeTio mostró colonias de color amarillento con forma irregular y con una superficie planoconvexa y los cultivos de *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 cultivados en el medio sólido FeO presentaron colonias de color anaranjado con forma irregular, borde irregular, elevación plana y una superficie rugosa, morfologías descritas por Johnson (46).

La identificación molecular de las cepas LB102 y LB151 fue realizada por la amplificación del gen 16S rRNA por PCR, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para identificar especies bacterianas, incluyendo bacterias que no pueden ser cultivadas, identificando a ambas cepas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Además, esta técnica y sus variantes han sido utilizadas para identificar cepas de *At. ferrooxidans* aisladas de biorreactores de biolixiviación de cobre (58), de drenajes de aguas ácidas de minas asociadas a Pb/Zn (59), sedimentos anaeróbicos del río Tinto (60), etc. Sin embargo, es necesario realizar un paso de filtración a los medios que presenten compuestos férricos debido que estos evitan una amplificación adecuada del ADN (61).

La estandarización de la voltametría cíclica fue llevada a cabo con la sal ferricianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_3$ ) /ferrocianuro de potasio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ). Ambos compuestos son utilizados en los laboratorios para demostrar y comprobar el funcionamiento de diversos potenciostatos, ya que el par redox Fe(III/II) es reversible en diversas condiciones de temperatura y de concentración de analitos y electrolitos de soporte (62). El voltagrama con la sal ferricianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_3$ ) /ferrocianuro de potasio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) con el electrodo de fieltro de grafito mostró el gráfico característico de estas sales, verificando que los electrodos de fieltro de grafito son conductores de la transferencia de electrones.

En el caso de la VC1 del medio líquido tiosulfato se pudo observar que el voltagrama del control presento un ligero pico de corriente, mientras que el voltagrama con el inóculo del cultivo de *At. ferrooxidans* LB151 presentó un pico de corriente bien marcado en 0.142 V, esto se explicaría por algún tipo de modificación e interacción de la superficie del electrodo con la bacteria, ligado al crecimiento de microorganismos adheridos (5). Esto también se observa en los voltagramas de la VC2 del medio líquido de tiosulfato + solución férrica inoculado con el cultivo de *At. ferrooxidans* 151, mientras que el medio sin ser inoculado (control) no presentó picos de corriente bien marcados.

La C1 del medio líquido tiosulfato mostró que el control generó  $-0.0015 \mu A$  por un periodo de 1 hora manteniéndose estable, cuando se le agregó el inóculo de *At. ferrooxidans* 151 la corriente aumentó a  $-0,001 \mu A$  y se mantuvo estable. Sin embargo, en la C2 al agregar solución férrica al medio líquido tiosulfato con el inóculo de *At. ferrooxidans* LB151 la corriente aumentó significativamente hasta  $0.005 \mu A$  atribuyéndole el efecto probablemente a la actividad de las bacterias sobre el hierro. Esto también ha sido observado en experimentos de cronoamperometría con biofilms de compost de jardines, en donde el control generó menor cantidad de corriente que el

medio inoculado con las bacterias (63), sustentando la idea que las bacterias son las generadoras de la electricidad.

La producción de electricidad fue realizada en celdas de combustible microbianas de doble cámara (16,17) separadas por una membrana intercambiadora de protones Nafion N°117 (41). Este tipo de celdas es muy utilizado para la evaluación de diferentes tipos de sustratos, nuevos materiales a probar y tipos de comunidades microbianas que surgen durante la degradación de un compuesto específico (36).

La mayor parte de reportes de producción de electricidad en celdas de combustible microbianas es en materia orgánica debido a que al ser compuestos puros se pueden degradar de manera más simple lo que permite una mayor generación de energía (7, 11), pudiendo ser evaluados fácilmente los parámetros funcionales de la celda como la eficiencia coulúmbica, densidad de potencia y la resistencia interna. En la actualidad, se están empleando compuestos inorgánicos en las celdas de combustible microbianas (6,16,17) para observar su producción de electricidad. A pesar de que ya se han comenzado a utilizar estos compuestos (tiosulfato, tetraionato), todavía no se le da la importancia correspondiente debido a su baja producción de energía.

Ni y sus colaboradores (17) emplearon tetracionato y tetracionato + tiosulfato como sustrato de las celdas pudiendo generar energía. En esta investigación se utilizó solamente tiosulfato como sustrato de la celda de combustible microbiana un derivado del azufre, que es encontrado en las aguas acidas de minas (23) como un importante nutriente para los microorganismos acidófilos, este compuesto inorgánico es oxidado por ellos a sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), entre otros compuestos. Ambos experimentos sustentan que los compuestos inorgánicos también pueden ser utilizados como un sustrato alternativo en las CCMs.

En las celdas se utilizaron cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* como *inóculos*, en la literatura encontramos que mayormente lo están empleando en cultivos mixtos de microorganismos acidófilos. La utilización de cultivos mixtos mejora la

producción de energía debido al metabolismo diferente de los diversos grupos microbianos que pueden generar otros subproductos permitiendo relaciones sintróficas (7). Sin embargo, la desventaja de los cultivos mixtos es que no se puede controlar el crecimiento de las poblaciones microbianas lo cual puede llevar a la disminución de la vida útil de la celda y la posible producción de subproductos inhibitorios para las propias poblaciones.

En esta investigación se emplearon los cultivos de *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 en aerobiosis porque crecieron bien en hierro (Fe) y tiosulfato (resultado no mostrado), mientras que en anaerobiosis solo se empleó el cultivo 151 porque fue el único que creció en grandes concentraciones. En un principio se empleó alambres de cobre unidos al fieltro de grafito, pero por la inestabilidad del sistema en condiciones ácidas fue cambiado por alambres de platino, lo cual permitió una mayor duración de los experimentos.

La producción de electricidad en la CCM1 que contenía en la cámara anódica el medio líquido de tiosulfato con el inóculo combinado de cultivos de *At. ferrooxidans* LB102 y LB151 crecidos en aerobiosis en el medio líquido TK/Fe y la cámara catódica contenía buffer fosfato ácido. Ambas cámaras presentaban electrodos hechos de fieltro de grafito unidos a alambres de cobre (Cu) generando una densidad de potencia promedio de  $2.34 \text{ mW/m}^2$  en el rango de 23 -119 H, en cambio la CCM2 inoculada solamente con el cultivo de *At. ferrooxidans* LB151 crecido en el medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis produjo una densidad de potencia promedio de  $3.02 \text{ mW/m}^2$  en el mismo rango y el control presentó una densidad promedio de  $0.61 \text{ mW/m}^2$ . Estos resultados indican que el cultivo 151 crecido en anaerobiosis genera mayor densidad de potencia que al utilizar la combinación de los cultivos crecidos en aerobiosis.

Asimismo, ambas densidades de potencia son similares a los de Ni y colaboradores (17) que utilizaron microorganismos acidófilos aislados de una mina en Suecia como inóculo llegando a producir una densidad de potencia de  $2.5 \text{ mW/m}^2$  teniendo como anolito aguas procesadas de flotación de minerales sulfurosos

suplementadas con tetrionato. También, son similares al experimento de Sulonen y colaboradores (16) donde utiliza un cultivo (En 1) aislado de aguas procesadas de una mina hidrometalúrgica produciendo una densidad de  $1.47 \text{ mW/m}^2$  teniendo como anolito una mezcla del medio de sales minerales (10% v/v), elementos traza y buffer fosfato (20 Mm) suplementados con tetrionato. Sin embargo, los tres trabajos difieren en la composición del anolito, catolito, la resistencia y la cantidad de compuesto inorgánico suplementado, los cuales pueden aumentar o disminuir la densidad de potencia de las celdas.

Después de realizar el primer y segundo experimento (CCM1 y CCM2), se cambió el buffer fosfato ácido que se ingresaba en la cámara catódica por la solución férrica (CCM3 y CCM4) debido a que el hierro se encuentra normalmente en la composición de las aguas ácidas de minas y a que se emplea cuando se utilizan microorganismos aislados de minas dentro de las celdas de combustible microbianas.

La CCM3 contenía en la cámara anódica el medio líquido de tiosulfato con el inóculo de *At. ferrooxidans* LB151 crecido en el medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis y la cámara catódica contenía solución férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Ambas cámaras presentaban electrodos hechos de fieltro de grafito unidos a alambres de platino (Pt) generando  $29 \text{ mW/m}^2$  de densidad de potencia promedio en 7 H y el control dio  $5.88 \text{ mW/m}^2$  en el mismo rango. Luego, se empleó el medio líquido tiosulfato-ferroso porque ambos compuestos se encuentran principalmente en las aguas ácidas y a que *At. ferrooxidans* oxida hierro y reduce férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) en condiciones anaeróbicas (45). La CCM4 contenía el medio líquido tiosulfato-ferroso y el inóculo de *At. ferrooxidans* LB151 crecido en el medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis en la cámara anaeróbica y solución férrica en la cámara catódica produciendo una densidad de potencia promedio de  $2.67 \text{ mW/m}^2$  en 7 H y el control dio  $2.04 \text{ mW/m}^2$  en el mismo rango.

La CCM4 produjo menor cantidad de densidad de potencia promedio que la CCM3 durante 7 H, por lo que la adición de hierro (Fe) en el medio líquido tiosulfato genera un efecto negativo en la producción de electricidad.

Finalmente, la solución férrica de la cámara catódica fue cambiada por la solución de cobre (Cu) debido a que se encuentra presente en las minas con el tiosulfato. La CCM5 contenía el medio líquido tiosulfato y el inóculo de *At. ferrooxidans* LB151 crecido en el medio líquido de tiosulfato en anaerobiosis en la cámara anaeróbica y solución de cobre en la cámara catódica produciendo 1.03 mW/M<sup>2</sup> de densidad de potencia promedio en 5 H y el control mostro una densidad promedio de 0.55 mW/M<sup>2</sup> en el mismo rango. Este resultado es muy parecido al de Heijne y colaboradores (64) que utilizaron también cobre como catolito produciendo una densidad de potencia de 0.80 mW/m<sup>2</sup>. No obstante, ambos trabajos difieren en los catolitos y anolitos empleados, el tipo de inóculo y la resistencia empleada que pueden aumentar o disminuir la densidad de la celda.

Se ha encontrado la producción de energía de las celdas de combustible microbianas. La CCM1 produjo 629.91 J, la CCM2 produjo 1610 J, la CCM3 produjo 0.07213 J, la CCM4 produjo 0.09648 J y la CCM5 produjo 0.004 J, esto resultados no pueden ser comparados debido a que los 5 experimentos tuvieron diferentes tiempos de duración, haciendo que la producción de energía aumente o disminuya.

La presencia de compuestos inorgánicos en los ambientes mineros podría ser tratados con esta tecnología, como el fierro (II) que puede ser removido de las aguas ácidas de minas mediante su oxidación a fierro (III) formando un precipitado (65), en el cobre (II) este puede ser recuperado de las aguas acidas de minas en forma de cristales puros (64) y los sulfuros estos pueden ser removidos mediante su oxidación a azufre elemental (12). Estos tres procesos generan electricidad que podrían ser utilizados por las mineras o las poblaciones aledañas.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron a las cepas LB102 y LB151 como *Acidithiobacillus ferrooxidans* por sus características morfológicas y la identificación molecular.
- La cepa LB151 es un microorganismo electrogénico debido a su capacidad de producir electricidad en la cronoamperometría y en las CCMs.
- Se ha demostrado que a partir de tiosulfato que es un compuesto presente en las aguas ácidas de minas se puede generar electricidad y a la vez reducir el Fe (III).
- Se ha podido calcular la energía de cada CCM, teniendo como 1610 J como la mayor energía producida.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- Realizar curvas de polarización para determinar la máxima densidad de potencia de la CCM.
- Estudiar detalladamente el mecanismo de transferencia de electrones hacia el electrodo que presenta *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- Determinar los compuestos inorgánicos que se están formando dentro de la CCM durante el desarrollo del experimento.
- Utilizar cámaras incubadoras para controlar la temperatura, humedad y condiciones anaerobias de la CCM.

## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Chambers, A.; Nakicenovic, N. World Energy Outlook 2008; IEA/OECD: Paris, France, 2008; ISBN: 978-92-64-04560-6.
2. Ruiz, M. & Vera Tudela, R. Sector Eléctrico: Balance Oferta-Demanda (2013-2018). Rev. Moneda 155. Banco Central de Reserva del Perú. 2013.
3. Lazo, O & Rojas, J. L. Proyección del consumo de energía residencial en el Perú (2005-2030) mediante el software MAED-D. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial, UNMSM, 2009. Vol. 12(2): pp. 50-60.
4. Dammert, A. & Molinelli, F. Panorama de la Minería en el Perú. Lima: OSINERGMIN. 2007.
5. Saavedra Salas, I.M. "Diseño de una Celda de Combustible Microbiológica con Uso de Bacterias Oxidantes de Azufre y Hierro," (Tesis de Pregrado). Universidad de Chile. Santiago de Chile. Chile. 2012.
6. Falcón, A., Lozano, E., & Juárez, K. Bioelectricidad. Biotecnología, Año 2009, Vol. 13 N°3.
7. Revelo, D., Hurtado, N., & Ruiz, J. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. Información Tecnológica Vol.24 N°6-2013.
8. Vélez Álvarez, J.E. "Modelo de ánodo y validación experimental para una Celda de Combustible Microbiológica," (Tesis de Maestría). Bogotá: Repositorio Institucional. Universidad Nacional de Colombia. 2014.
9. Min, B. Cheng, S y Logan, B. "Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells." Water research. 2005. Pp. 1675-1686.

10. Du, Z., Li, H. & Gu, T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. Vol 25. pp 464-482.2007.
11. Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L. & Vanbroekhoven, K. A review of the substrates used in Microbial Fuel Cell (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* 101. 2010.
12. Rabaey K, Van De Sompel K, Maignien L, Boon N, Aelterman P, Clauwaert P, *et al.* Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environ Sci Technology*; 40: pp. 5218–24.2006.
13. Zhao, F., Rahunen, N., Varcoe, J.R., Roberts, A.J., Avignone-Rossa, C., Thumser, A.E., Slade, R.C.T., 2009. Factors affecting the performance of microbial fuel cells for sulfur pollutants removal. *Biosens. Bioelectron.* 2, 2009. pp.1931–1936.
14. Ieropoulos, I., Gálvez, A., & Greenman, J. Effects of sulphate addition and sulphide inhibition on microbial fuel cells, *Enzym. Microb. Technology*. Vol 52 (1): pp. 32–37.2013.
15. Zhang, T., Bain, T., Barlett, M., Dar, S., Snoeyenbos-West, O., Nevin, K.P., *et al.* Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1. *Microbiology*, 2014: pp. 123–129.
16. Sulonen M, Kokko M, Lakaniemi A & Puhakka J. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *J Hazard Mater* 2015; 284: pp.182–9.
17. Ni, G., Christel, S., Roman, P., Wong, Z & Bijmans, M. Electricity generation from an inorganic sulfur compound containing mining

wastewater by acidophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 2016. Vol 167(7), pp. 568–575.

18. Córdova de la Cruz, R.C & Rojas Perez, J. “Alcalinización de travertino y desmineralización de aguas ácidas de minas en simulador de humedal a nivel de laboratorio,” (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo. Perú.
19. Dopson, M & Johnson, D. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 14. pp: 2620–2631
20. Sanz del Castillo, D. Química del Suelo. Ciclos Biogeoquímicos. En el libro Bases Químicas del Medio Ambiente. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2013.
21. Xu, Y., Schoonen, M. A., Nordstrom, D., Cunningham, K., & Ball, J. Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park: I. The origin of thiosulfate in hot spring waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1998. 62(23), 3729-3743.
22. Xu, Y., Schoonen, M. A., Nordstrom, D., Cunningham, K., & Ball, J. Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park, Wyoming, USA. II. Formation and decomposition of thiosulfate and polythionate in Cinder Pool. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 2000. 97(1), 407-423.
23. Nordstrom, D. Advances in the hydrogeochemistry and microbiology of acid mine waters. *International Geology Review*, 2000. 42(6), 499-515.
24. Malki, M. De Lacey, A. Rodríguez, N. Amils, R. y Fernandez, V. "Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic

- bacterium in the presence of oxygen." *Applied and environmental microbiology* 74.14 (2008): 4472-4476.
25. Baker, B. J. & Banfield, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 139–152. 2003.
  26. Méndez-García C, Peláez AI, Mesa V, Sánchez J, Golyshina OV, Ferrer M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front Microbiol.* 2015; 6:475.
  27. Kelly, D & Wood, A. "Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 511–516.
  28. Márquez, J. E., Revah, S., & Le Borgne, S. Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje bioquímico*, 34. 2010.
  29. Gennaro, A.R. Remington Farmacia: Tomo 1, 19a Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina. 1998.
  30. Barrera, C. Aplicaciones electroquímicas al tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverte. 1era edición. México. 2014.
  31. Costa, J. M. Curso de Química Técnica. Reverte; 4ª edición; 1994. (Bibliografía del glosario).
  32. Cabildo, M., Cornago, M., Escólastico, C., Soledad, S., López, C., & Sanz, D. Bases químicas del medio ambiente. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2013.
  33. Potter, MC. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc R Soc. Ser B.* 1912; 84:260-76.

34. Esteve-Núñez, A. "Bacterias productoras de electricidad." 2008.
35. Das, S., & Mangwani, N. Recent developments in microbial fuel cells: a review. *J. Sci. Ind. Res.* Vol 69 2010, pp. 727-731.
36. Logan, B. *et al.* "Microbial fuel cells: methodology and technology." *Environmental science & technology* 40.17 (2006): 5181-5192.
37. Lovley, D. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Env micro rep*, 3(1), 2011. pp. 27-35.
38. Chaudhuri, S., & Lovley, D. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature biotechnology*, 2003. 21(10), 1229-1232.
39. Min, B. Cheng, S y Logan, B. "Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells." *Water research* 39.9 (2005): 1675-1686.
40. Logan, B., Murano, C., Scott, K., Gray, N & Head, I. "Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell." *Water Research* 39.5 (2005): 942-952.
41. Alzate-Gaviria L., Fuentes-Albarrán C., Álvarez-Gallegos A., Sebastián P.J. Generación de electricidad a partir de una celda de combustible microbiana tipo PEM. *Interciencia* 33, 2008, 503-50.
42. Buitrón, G & Pérez, J. "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 (2011): 5-11.

43. Carbajosa, S. Malki, M. Caillard, R. Lopez, M. Palomares, J. Martín-Gago, J.A. Rodríguez, N. Amils, R. Fernández, V.M. & De Lacey, A.L. "Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen." *Biosensors and Bioelectronics* 26.2 (2010): 877-880.
44. Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers and comparison with <sup>14</sup>C<sub>2</sub>-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Mikrobiol.* 1973. 88: 285-298.
45. Pronk J.T. de Bruyn J.C. Bos P. Kuenen J.G. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. 58, 2227-2230.
46. Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 23 (1995):205- 18.
47. Arias, V., Rodríguez, C., Ramírez, P., Nonones, E., Salazar, D., Gil, J., Paredes, J., & Jamanca, G. Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 2012. 15(30), 59-66.
48. Bidart T. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect* 2004; 21 (Supl 1): S13-S19.
49. Alvarez, S & Jerez, C.A. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 70. (2004):5177-5182.

50. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. chem.* 1951. 193, 265.
51. Hoyos, B., Monsalve, C., & Restrepo, A. Evaluación de Celdas de Combustible de electrolito polimérico con ánodos Pt-M (M= Sn, Ru e Ir) para la oxidación de H<sub>2</sub> y CO. *dyna*, 75(156), 2008. 121-126.
52. Pérez-Uz B., de Silóniz M.I., Torralba B., Vázquez C. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico, REDUCA (Biología) 3, N° 5 (2010).
53. Goldenberger, D., I. Perschil, M. Ritzler, and M. Altwegg. A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Applic.* 4(1995):368–370.
54. Quintana, M. Identificación molecular de microorganismos biooxidantes en drenajes acidos de mina (dam). Tesis para optar el grado de magister en bioquímica y biología molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2011.
55. Hernández F. & E. Rodríguez. El fenómeno de "swarming" y otros tipos de desplazamiento bacteriano. *Rev. Costo Cienc. Méd.* 14. (1993): 45-51.
56. Colmer, A. R., Temple, K. L., & Hinkle, M. E. An iron-oxidizing bacterium from the drainage of some bituminous coal mines. *J. Bact.*, 59, (1949): 317-328.
57. Staley J.T, Boone D.R., Brenner D.J., de Vos P., Garrity G.M., Goodfellow M., Krieg N.R., Rainey F.A., Schleifer K-H.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Second Edition (2005). Springer, New York, 323-358, 607-624.

58. Demergasso, C. S., Galeguillos, P. A., Escudero, L. V., Zepeda, V. J., Castillo, D. & Casamayor, E. O. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy* 80, (2005): 241–253.
59. Tan, G., W. Whu, K. B. Hallberg, F. Li, C. Lan, and L. Huang. Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailing at Lechang, Guangdong, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59 (2007):118-126.
60. Sanchez- Andrea I, Rodriguez N, Amils, R & Sanz JL. Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol* 77 (2011): 6085–6093.
61. Osorio V, Márquez E, Márquez M. Caracterización por Ardrea de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 2007; IX (1): 14-21.
62. Hernández, R. Construcción, implementación y calibración de Potenciostato dedicado a mediciones volatamétricas. ITESM, 3-5.2013.
63. Parot, S.; Delia, M. L.; Bergel, A. Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 4809–4816.
64. Heijne, A. T. *et al.* Copper recovery combined with electricity production in a microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4376–4381 (2010).
65. Cheng, S., Dempsey, B.A., Logan, B.E. Electricity generation from synthetic acid-mine drainage (AMD) water using fuel cell technologies. *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007): 8149–8153.

- 66.** Román, B. Estudio de bacterias acidófilas ferroxidantes presentes en mineral de magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota, y agua de mina de Quiruvilca. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2017.
- 67.** Matsubara A. Hurtado J. E. Isolation and Characterization of Actinomycetes from Acidic Cultures of Ores and Concentrates. *Advanced Materials Research*. 2013; 825:406-409.

## **XI. ANEXOS**

### **11.1. Anexo 1. Composición y preparación de los medios empleados:**

#### **11.1.1. Medios líquidos:**

##### **11.1.1.1. Medio líquido de Tiosulfato (g/L)**

5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 mL de solución de elementos traza (anexo 11.1.3)

Primero se disuelve el sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), el sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), el fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y los elementos traza en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Después, el tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) se filtra con agua estéril a pH 3,5 en una membrana estéril de  $0.2 \mu\text{m}$  (milipore) y se incorpora a la solución A y se agitan para mezclar todos los componentes.

##### **11.1.1.2. Medio líquido de Tiosulfato Ferroso (g/L)**

5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

33.4 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 mL de solución de elementos traza (anexo 11.1.3)

Primero se disuelve el sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), el sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), el fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y los elementos traza en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Después, el tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y el sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) son filtrados con agua estéril a pH 3,5 en una membrana estéril de  $0.2 \mu\text{m}$  (milipore) e incorporados a la solución A, siendo agitados para mezclar todos los componentes.

#### **11.1.1.3. Medio líquido de Tiosulfato Férrico (g/L)**

5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.456 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.428 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.524 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 mL de solución de elementos traza

1.33 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.53 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.25 g de Trypticase Soy Broth (TSB)

6.92 g de  $\text{Fe}^{+3}$

Primero se disuelve el sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), el sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), el fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), el TSB y los elementos traza en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$

1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C. Después, el tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) es filtrado con agua estéril a pH 3,5 en una membrana estéril de 0.2  $\mu\text{m}$  (milipore) e incorporados a la solución A. Después se le incorpora la solución férrica (anexo 11.1.3) a la solución A y se agita para mezclar todos los componentes.

#### **11.1.1.4. Medio líquido TK/Fe (g/L)**

5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

33.4 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Primero se disuelve el sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), el sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y el fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C. Después, el tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) se filtra con agua estéril a pH 3,5 en una membrana estéril de 0.2  $\mu\text{m}$  (milipore) e incorporados a la solución A, siendo agitados para mezclar todos los componentes.

#### **11.1.1.5. Medio líquido FeO (g/L)**

100 mL de Sales basales 10x (anexo 11.1.3)

0.25 g de Tryptic Soy Broth (TSB)

1 mL de solución de elementos traza (anexo 11.1.3)

2.78 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Primero se mezcla las sales basales 10x, el TSB y los elementos traza en 500 mL de agua destilada a pH 3.5 (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C. Después, el sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se filtra con agua estéril a pH 3,5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N en una membrana estéril de 0.2  $\mu\text{m}$  (milipore) y se incorporan a la solución A y se agitan para mezclar todos los componentes.

#### **11.1.1.6. Medio líquido TSB-Merck (g/L)**

17 g de Peptona de caseína

3 g de Peptona de

2.5 g de Glucosa monohidratada (D+)

5 g de NaCl

2,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 7.1-7.5 y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C.

#### **11.1.2. Medios sólidos:**

##### **11.1.2.1. Medio FeTio (g/L)**

100 mL de Sales basales 10x (anexo 11.1.3)

0.25 g de Tryptic Soy Broth (TSB)

1 mL de solución de elementos traza (anexo 11.1.3)

2.78 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

15  $\pm$  0.5 de Agar Oxoid

0.241 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

pH: 3.5  $\pm$  0.5

Primero se mezcla las sales basales 10x, el TSB y los elementos traza en 500 mL de agua destilada a pH 2,5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C. Después, el sulfato de hierro heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) se filtra con agua estéril a pH 1,8 en una membrana estéril de 0.2 µm (milipore) y se incorporan a la solución A. Luego, el tiosulfato de sodio pentahidratado (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O) se filtra con agua estéril a pH neutro en una membrana estéril de 0.2 µm (milipore) y se incorpora a la solución A. Finalmente, se le agrega el agar Oxoid estéril (previamente lavado) y se sirve en placas Petri antes de que la solución se enfríe.

#### **11.1.2.2. Medio FeO (g/L)**

100 mL de Sales basales 10x (anexo 11.1.3)

0.25 g de Tryptic Soy Broth (TSB)

1 mL de solución de elementos traza (anexo 11.1.3)

2.78 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

15 ± 0.5 de Agar Oxoid

pH: 2.5 ± 0.5

Primero se mezcla las sales basales 10x, el TSB y los elementos traza en 500 mL de agua destilada a pH 2,5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (solución A) y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C. Después, el sulfato de hierro heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) se filtra con agua estéril a pH 1,8 en una membrana estéril de 0.2 µm (milipore) y se incorporan a la solución A. Finalmente, se le agrega el agar Oxoid estéril (previamente lavado) y se sirve en placas Petri antes de que la solución se enfríe.

### **11.1.3. Soluciones:**

#### **11.1.3.1. Buffer fosfato neutro (g/L)**

13.7 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

18.2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 7 y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### **11.1.3.2. Buffer fosfato ácido (g/L)**

13.7 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

18.2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 3,5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### **11.1.3.3. Solución férrica (g/L)**

1.33 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.53 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.25 g de Tryptic Soy Broth (TSB)

6.92 g de  $\text{Fe}^{+3}$

1 mL de solución de elementos traza

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### **11.1.3.4. Solución de cobre (g/L)**

1.33 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.53 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.25 g de Tryptic Soy Broth (TSB)

1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1 mL de solución de elementos traza

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 3.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N y se lleva a esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### **11.1.3.5. Elementos traza (66)**

(Usado a 1ml/L de medio completo) (g/L en 0.01 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

10g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.5 g de  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 15\text{H}_2\text{O}$

0.6g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0.5 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{Ni SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

0.1 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.1 g de  $\text{NaVO}_3$

La solución de elementos traza fue elaborada con 800 ml de agua destilada a pH 2.0. Después, se agregan los elementos mencionados en el orden que aparecen, logrando que cada uno se disuelva antes de agregar el siguiente. El pH debe ser mantenido a 2.0 con 10N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, se adiciona vanadato de sodio (NaVO<sub>3</sub>) y se completa hasta 100ml con agua destilada ajustando al final a pH a 2.0.

#### **11.1.3.6. Solución de Sales basales 10X (g/L) (67)**

12.5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Los compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 2.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C.

#### **11.1.3.7. Solución Prestock (g/L)**

4 g de NaOH

30 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Los compuestos son disueltos en un litro de agua destilada y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C, almacenar a temperatura ambiente.

#### **11.1.3.8. Solución de tartrato de sodio y potasio 4%(w:v)**

4 g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O

El tartrato de sodio y potasio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O) es disuelto en 100 mL destilada y se almacena en refrigeración.

#### **11.1.3.9. Solución de sulfato cúprico 2%(w:v)**

2 g de  $\text{CuSO}_4$

El sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) es disuelto en 100 mL destilada y se almacena en temperatura ambiente.

#### **11.1.3.10. Solución de albumina de suero bovino (0.2 mg/mL)**

20 mg de albumina de suero bovino (0.2 mg/mL)

La Solución de albumina de suero bovino (0.2 mg/mL) es disuelto en 100 mL destilada y se almacena en el congelador.

#### **11.1.3.11. Solución de Lowry A**

1 mL de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 4%

1 mL de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) al 2%

Se afora hasta 100 mL con solución prestock.

#### **11.1.3.12. Solución de Lowry B**

Reactivo de Folin

El reactivo de Folin se diluye 1:1 con agua destilada.

## 11.2. Anexo 2. Fotos:



Fig.1: Tubos con medio líquido de Tiosulfato y *At. ferrooxidans* en una



Fig.2: Placas con medio sólido FeTio y *At. ferrooxidans* en una jarra de anaerobiosis.

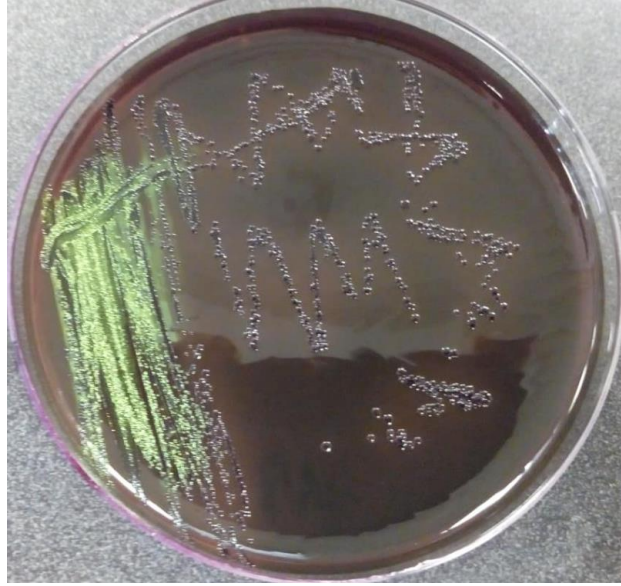


Fig.3: *Escherichia coli* ATTC 10536 sembrada en el medio EMB.



Fig. 4: Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli* ATTC 10536, tubo 1: citrato -; Tubo 2: SIM: Motilidad +, H<sub>2</sub>S -; Tubo 3: A/A, H<sub>2</sub>S -, Gas +; LIA: K/K, H<sub>2</sub>S -.



Fig. 5: Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli* ATTC 10536,  
SIM: Motilidad +, H<sub>2</sub>S -, indol +.

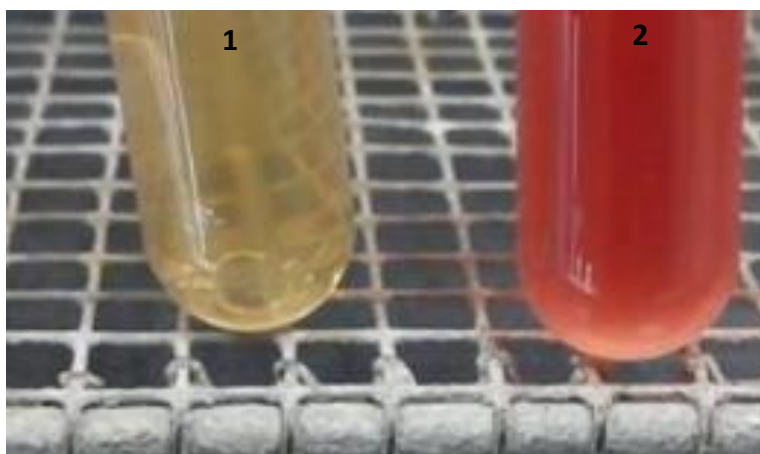


Fig. 6: Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli* ATTC 10536,  
Tubo 1: Vogues Proskauer-; Tubo 2: Rojo de Metilo +



Fig.7: Potenciostato Potentiostat 466 system Model ER466-eDAQ



Fig.8: Potenciostato Model 273A Potentiostat/Galvanostat - Princeton Applied Research.



Fig.9: Semi-celdas de una Celda de Combustible Microbiana



Fig.10: Electrodo de fieltro de grafito unido al alambre de cobre (Cu)



Fig.11: Electrodo de fieltro de grafito unido al alambre de platino (Pt)

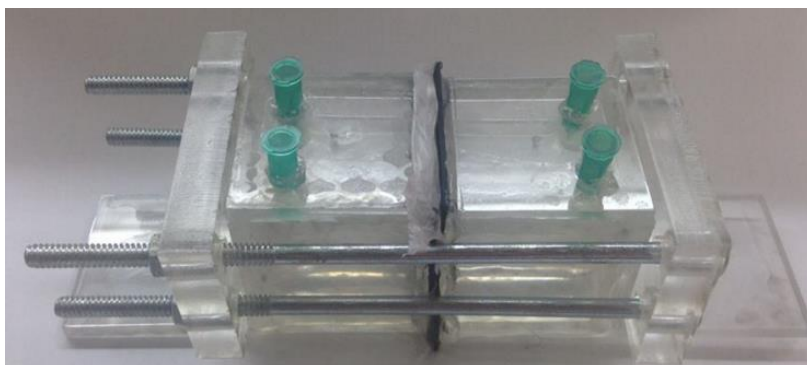


Fig.12: Celda de Combustible Microbiana