



FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

TESIS

**DETERMINACIÓN DE ENERGÍA TOTAL EN CELDAS DE COMBUSTIBLE
MICROBIANA PRODUCIDA A PARTIR DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE
OXIDO-REDUCCIÓN DE HIERRO EN UN MEDIO TK-FE, EN UN LABORATORIO
EN EL DISTRITO DE SAN MARTIN DE PORRES, EN LA CIUDAD DE LIMA, EN EL
AÑO 2017.**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

BGAZO ROSALES, Jacqueline

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AMBIENTAL

LIMA - PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme a mis padres y la oportunidad de poder honrarlos. Además, haberme dado de su inigualable compañía y ayuda siempre. Quiero agradecerle por nunca dejarme sola.

A mis padres, por ser mi mejor fuente de inspiración y motivación. Quiero agradecerles porque gracias a su ejemplo de perseverancia y esfuerzo, puedo lograr mi titulación.

A mis hermanos porque me enseñan que la familia es lo más importante y me dan su apoyo incondicional.

A mis sobrinos por darme tantas sonrisas, alegrías y un amor tan puro que me hacen sentir como una súperheroína.

A la Dra. Jasmín Hurtado del laboratorio de Biotecnología Ambiental de la UPH, por ser el ángel que me acompañó todo este camino hasta mi titulación. Quiero agradecerle por cada consejo que me ayudaron a formar como profesional.

Al ing. Enrique Champin por su amable disponibilidad y sensibilidad como director de la Escuela de Ingeniería Ambiental en escuchar cualquier problema o duda.

Al ing. José Masías por su total apoyo, paciencia y disponibilidad como coordinador de la Escuela de Ingeniería Ambiental a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A Pamela Obando, mi amiga que con su compañía y consejos hicieron que la investigación y desarrollo de mi tesis en el laboratorio fueran muy gratos y provechosos.

A Betsabé Román, por su amistad y su ayuda en el aislamiento de las bacterias.

A Andrea, Nikol, Guillermo, Hans y todos mis compañeros del laboratorio por los buenos momentos que pasamos juntos y su ayuda incondicional.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN.....	III
Capítulo I.....	1
Planteamiento del Problema	1
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	1
1.1.1 Caracterización del problema.	1
1.1.2 Definición del problema.	5
1.2 Formulación del Problema.....	5
1.2.1 Problema general.	5
1.2.2 Problemas específicos.....	5
1.3 Objetivos de la Investigación	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Justificación de la Investigación.....	7
1.5 Importancia de la Investigación.....	8
1.6 Limitaciones de la Investigación	9

CAPÍTULO II.....	11
FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
2.1 Marco Referencial	11
2.1.1 Antecedentes de la investigación.....	11
2.1.2 Referencias históricas.	14
2.2 Marco Conceptual.....	16
2.3 Marco Teórico	23
CAPÍTULO III	26
MARCO METODOLÓGICO	26
3.1 Tipo y nivel de investigación.....	26
3.1.1 Tipo de la investigación.....	26
3.1.2 Nivel de la investigación.....	26
3.2 Método de la Investigación.....	26
3.3 Diseño de la Investigación.....	27
3.4 Hipótesis de la Investigación.....	27
3.4.1 Hipótesis general.....	27
3.4.2 Hipótesis específicas.....	27

3.5	Variables	28
3.5.1	Variable independiente.	28
3.5.2	Variable dependiente.	28
3.6	Cobertura del Estudio de la Investigación	29
3.6.1	Universo.....	29
3.6.2	Población.	29
3.6.3	Muestra.	29
3.7	Técnicas, Instrumentos y Fuentes de la Recolección de Datos	29
3.7.1	Técnicas de la investigación.	29
3.7.2	Instrumentos de la investigación.....	40
3.8	Procesamiento de Datos de la Investigación	46
CAPITULO IV		48
ORGANIZACIÓN, PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		48
4.1	Presentación de Resultados	48
4.1.1	Resultados parciales.....	48
4.1.2	Resultados generales.....	65
4.3	Discusión de Resultados	66

CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. MEDIO LIQUIDO FeO (400 ML).....	30
TABLA 2. MEDIO SOLIDO FeO (400 ML)	31
TABLA 3. MEDIO LIQUIDO TK/ Fe-TIO (1L)	32
TABLA 4. MEDIO LIQUIDO FeO + FERRICO (400 ML)	33
TABLA 5. MEDIO SOLIDO FeO (400 ML).....	33
TABLA 6. EQUIPOS PARA REALIZAR SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS	43
TABLA 7. EXPERIMENTO EN CCM.....	45
TABLA 8. VISTA AL MICROSCOPIO DE CEPAS SELECCIONADAS.....	50
TABLA 9. EXPERIMENTO 1 EN CCM CON NUMERO DE HORAS	54
TABLA 10. EXPERIMENTO 2 EN CCM CON NUMERO DE HORAS	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PORCENTAJE DE CONSUMO DE TIPOS DE ENERGÍA A NIVEL MUNDIAL EN EL AÑO 2017.	2
FIGURA 2. DEMANDA DE GENERACIÓN DE ENERGÍA EN EL MES DE NOVIEMBRE DEL 2017.....	3
FIGURA 3. FUENTES DE GENERACIÓN DE ENERGÍA EN EL MES DE NOVIEMBRE DEL 2017.	4
FIGURA 4. PLANOS DE CORTE LÁSER DE LA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANO. FUENTE PROPIA.	36
FIGURA 5. SEMICELDAS DE ACRÍLICO. FUENTE PROPIA.	38
FIGURA 6. PARTES DE SEMICELDAS. FUENTE PROPIA.....	38
FIGURA 7. CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA DISEÑADA CON MEMBRANA NAFLON. FUENTE PROPIA.....	39
FIGURA 8. CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA	40
FIGURA 9. CEPAS OXIDANTES EN TUBOS.....	48
FIGURA 10. CEPAS OXIDANTES EN BOTELLAS.....	49
FIGURA 11. CEPAS OXIDANTES SELECCIONADAS.....	49
FIGURA 12. CEPAS OXIDANTES SELECCIONADAS.....	51
FIGURA 13. CEPAS REDUCTORAS SELECCIONADAS EN MEDIO LÍQUIDO.....	52
FIGURA 14. CEPAS REDUCTORAS SELECCIONADAS EN MEDIO SÓLIDO.	53
FIGURA 15. EXPERIMENTO EN CELDA MICROBIANA DE COMBUSTIBLE.	54
FIGURA 16. COMPARACIÓN DE VOLTAJE GENERADO POR LAS CELDAS EN EL EXPERIMENTO 1.....	55
FIGURA 17. COMPARACIÓN DE VOLTAJE GENERADO POR LAS CELDAS..	57
FIGURA 18. COMPARACIÓN DE VOLTAJE MEDIDO EN LAS CELDAS - EXPERIMENTO 1.	58
FIGURA 19. COMPARACIÓN DE VOLTAJE MEDIDO EN LAS CELDAS PASADAS LAS 40 HORAS - EXPERIMENTO 1.	58
FIGURA 20. GRÁFICA DE GANANCIA DE VOLTAJE– EXPERIMENTO 1.....	59
FIGURA 21. GRÁFICA DE DENSIDAD DE POTENCIA.....	60

FIGURA 22. . COMPARACIÓN DE VOLTAJE MEDIDO EN LAS CELDAS – EXPERIMENTO 2.....	61
FIGURA 23. GRÁFICA DE GANANCIA DE VOLTAJE – EXPERIMENTO 2.....	62
FIGURA 24. GRÁFICA DE DENSIDAD DE POTENCIA– EXPERIMENTO 2.....	63

RESUMEN

Esta investigación se enmarca en la utilización de microorganismos para generar electricidad, teniendo como escenario el dilema de la crisis energética y la contaminación ambiental. El objetivo de esta investigación es producir electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando microorganismos acidófilos reductores de ión férrico con la finalidad de encontrar nuevas alternativas para la generación eléctrica que no causen daño al medioambiente y a su vez puedan remediar las sustancias contaminantes. En la primera etapa, se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de 5 cepas de *Acidithiobacillus ferroxidans* (microorganismos acidófilos), del Banco de Cepas aisladas de muestra mineral del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Asimismo, mediante la utilización de técnicas microbiológicas se seleccionó las cepas anaerobias y aeróbicas de los microorganismos acidófilos para ser evaluadas dentro de las Celdas de Combustible Microbianas (CCM). Esta fue construida con una Membrana Intercambiadora de Protones teniendo en el ánodo un medio oxidante (Medio TK/Tio-Fe) y en el cátodo un medio reductor (Medio FeO+Fe+3). Se determinó la utilización del TK/Tio-Fe con cepas con capacidad de oxidación, mediante técnicas de selección como la siembra de cultivos. Mediante el uso de un voltímetro y una resistencia se determinó el voltaje (V), la corriente eléctrica (I), la densidad de potencia (DP), la potencia generada (P) para cada CCM.

La autora

SUMMARY

This research is framed in generate alternative energy by using microorganisms, this is an significant issue taking into account the current worldwide scenario of energy crisis and so the environmental pollution.

The objective of this research shows how to produce electricity using microbial fuel cells filled of microorganisms named acidophilus which are reducers of Ion Ferric. The ultimate target is to help finding alternatives “green” sources of energy generation.

In the first stage, the macroscopic and microscopic characterization of 5 strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (microorganisms acidophilus), from a mineral sample of the laboratory of Environmental Biotechnology of the Peruvian university Cayetano Heredia (UPCH). Also, through the use of microbiological techniques, anaerobic and aerobic strains of acidophilus microorganisms were selected to be evaluated within microbial fuel cells (CCM). This was built with a proton-exchanger membrane bearing an oxidizing medium in the anode (TK/Ten-Fe) and in the cathode a reducing medium (half FeO + Fe + 3). The use of TK/Ten-Fe with strains with oxidation capacity, by means of selection techniques as sowing of crops. By using a voltmeter and a resistance the voltage (V), the electric current (I), the power density (DP), the generated power (P) for each CCM were determined.

The author

INTRODUCCIÓN

A partir de la revolución industrial, las máquinas que reemplazaron la fuerza del hombre como fuerza motriz de cada actividad, necesitaron fuentes de energía de mayor poder, por lo que el mundo incrementó su necesidad de encontrar nuevas fuentes de energía.

Las fuentes de energía pueden ser no renovables o renovables. Las energías no renovables son las que al ser usadas, luego de cierto periodo de tiempo, se agotan, siendo estas clasificadas de acuerdo a su poder calorífico de la siguiente manera: el lignito, que es de bajo poder calorífico y con proporciones grandes de azufre y compuestos inertes; el carbón, que tiene mezclas de hullas y antracitas y es de mediano poder calorífico; el petróleo y sus derivados, que tienen alto poder calorífico como el fuel-oil que es utilizado para generar electricidad; el gas natural, extraído de reservas naturales y es de alto poder calorífico; y finalmente el uranio, que genera energía térmica nuclear como combustible. Por otro lado, las energías renovables se pueden usar y naturalmente se pueden regenerar. Estas pueden ser: hidráulica, que haciendo uso de la fuerza de caída de una corriente de agua se genera un tipo de energía que se transforma en turbinas en energía eléctrica; eólica, es un tipo de energía que se genera por la fuerza del viento que impulsa hélices y este trabajo mecánico es el que se aplica a un alternador para generar energía eléctrica; y la solar, que es un tipo de energía que a través de paneles logra captar la energía fotónica de la radiación para luego ser transformada en energía eléctrica.

En la búsqueda de nuevas fuentes de energía, el mundo se ha visto afectado por el impacto medioambiental generado por el uso de estas. Muchos de los impactos son: el calentamiento global, que por procesos de combustión y la acumulación de gases de efecto invernadero hay un aumento gradual de la temperatura de la Tierra; la disminución de la capa de ozono, que es un fenómeno

producto de la alteración del balance de oxígeno y ozono en la estratósfera; la acidificación, que es producto de la reacción del vapor de agua presente en el aire con óxidos que son producto de uso de combustible; la contaminación por metales pesados, como el plomo, que están presentes en muchos combustibles; la niebla fotoquímica, que es producto de la reacción de óxidos o compuestos volátiles con un alta radiación solar; la radiactividad, por el uso de elementos químicos que desprenden rayos dañinos para los humanos; el agotamiento de recursos, como los combustibles fósiles que no son renovables y la generación de residuos industriales y radiactivos.

Muchos de estos impactos están estrechamente relacionados con el tipo de fuente de energía; pues se ha demostrado que analizando las diferentes etapas del ciclo de vida de los sistemas de generación de electricidad las fuentes de energía no renovables causan un mayor impacto medioambiental. Esto se debe a que para hacer uso de las energías renovables no es necesario incluir proceso alguno de combustión que es el generador de emisiones contaminantes. Sin embargo, si se tiene en cuenta que el lugar donde se instalan los equipos de las fuentes de energía renovables; es decir, el terreno, muchas veces sí se ve afectado por lo que no se podría tampoco afirmar que no causan daño alguno.

A partir de esta situación se hace cada vez más urgente la necesidad de contar con fuentes amigables con el medio ambiente y que causen un menor o nulo impacto de contaminación haciendo uso de fuentes renovables, es decir que no acabe con nuestros recursos.

Por el año 1987 se hizo el primer descubrimiento casual sobre microorganismos con la habilidad de generar electricidad (Roach, J., 2004).

La importancia de mirar siempre alrededor y ver que hay siempre una solución ecológica para obtener energía y no dañar el medioambiente, se ve plasmada en la idea de usar bacterias para generar electricidad.

Las bacterias tienen millones de años viviendo en la Tierra y con el tiempo han logrado sobrevivir y tener la capacidad de acondicionarse a las más extremas realidades; es decir, con capacidad de sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno, altas o bajas temperaturas, a un nivel bajo de pH y diferentes y/o extremas condiciones. En esta diversidad, las bacterias que oxidan su sustrato y tienen pili o la capacidad de formar biofilms pueden transferir electrones a diversos receptores como bien podría ser un electrodo (Poddar y Khurana, 2011).

La forma de saber si una bacteria tiene capacidad de producir electricidad es a través de pruebas en Celdas de Combustible Microbiana (CCM). Las celdas microbianas son estructuras acondicionadas conformadas por dos secciones: una denominada ánodo (generalmente en condiciones de anaerobiosis) y la otra, cátodo, en las cuales se realiza la oxidación y reducción, respectivamente. Las dos secciones están separadas por una membrana que permite el paso de protones del ánodo al cátodo. En la sección del ánodo, el electrodo recibe los electrones producto de la oxidación de la materia por parte de las bacterias, y los envía a través de una resistencia generando un voltaje que puede ser medida por un voltímetro. Estos electrones llegan a la sección del cátodo permitiendo la formación de agua al combinarse los protones transportados a través de la membrana semipermeable con el oxígeno presente en esa cámara.

Las celdas microbianas de combustible han sido estudiadas desde hace más de cincuenta años; sin embargo, su avance ha sido muy lento pues las cepas bacterianas con las que se ha trabajado no han logrado generar un voltaje significativo.

Es importante también decir que el presente trabajo de investigación hizo uso de cepas bacterianas con capacidad de crecer a condiciones extremas. Además, el probar que éstas tengan la capacidad de generar electricidad abre un camino de esperanza para futuras investigaciones en este campo, pues serviría como una opción ecológica de fuente de energía haciendo uso de bacterias del mismo suelo.

Capítulo I

Planteamiento del Problema

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

1.1.1 Caracterización del problema.

A nivel mundial la demanda energética es creciente. La mayoría de las actividades industriales están en busca de fuentes de energía y de aquellas que brinden mayor poder calorífico y se encuentren en el mercado a mayor cantidad y a menor precio.

En la figura N°1 se observa que en el año 2017, ha crecido un 2,9% el consumo de energía a nivel mundial en relación del año anterior y sólo en China, se ha duplicado el consumo de energía. Algunas fuentes de combustible como el petróleo, derivados y gas natural han reducido su producción en alrededor del 3%. Sin embargo, el consumo de carbón y lignito ha aumentado en un 26% y esto debido a su bajo precio y alto poder calorífico. La electricidad también ha crecido en consumo, sobre todo en países como China. Mientras que, las fuentes de energía renovables ha disminuido su crecimiento en unos 16 puntos, como el caso de la hidroeléctrica. En términos generales, las emisiones de CO₂ han aumentado en relación al año anterior en un 3,9%.

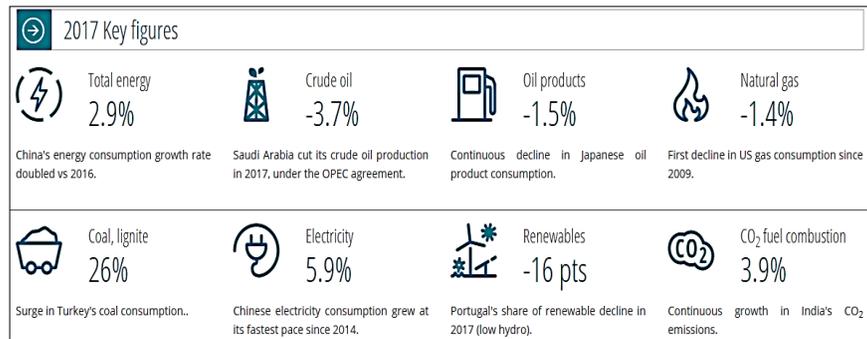


Figura 1. Porcentaje de consumo de tipos de energía a nivel mundial en el año 2017. Copyright 2017 por SNMPE. Reimpreso con permiso.

Por otro lado, el consumo energético de la población mundial es ascendente y su crecimiento es mayor que la velocidad en que crece el campo de producción de energías renovables.

Esta realidad y la necesidad de disminuir el consumo de combustibles fósiles como fuente de energía, debido a su también notable impacto negativo en la naturaleza, induce a la búsqueda de nuevas fuentes de energía que reemplacen a largo plazo las usadas en la actualidad. (Staffan, J. y Volkmar L.,2006)

El Perú no es ajeno a esta necesidad de buscar nuevas fuentes de energía.

En la figura N°2, se observa que en el Perú, el uso de fuentes alternas de energía como la eólica y térmica no están muy desarrolladas; sin embargo, se nota un crecimiento anual.

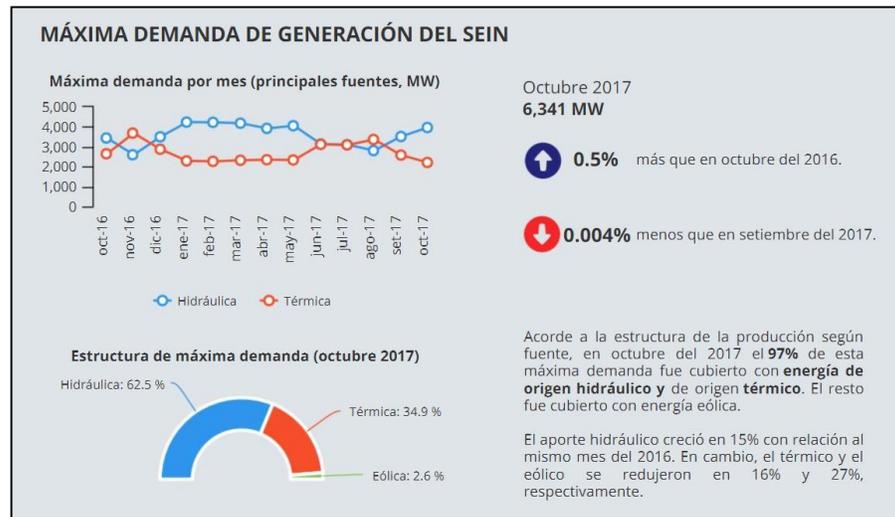


Figura 2. Demanda de generación de energía en el mes de noviembre del 2017.
Copyright 2017 por SNMPE. Reimpreso con permiso.

Las energías hidráulica y térmica representaron en conjunto el 97% de la generación del SEIN (Sistema Interconectado Nacional del Perú) en Octubre del 2017.

En la Figura N°3, se puede observar que en el mes de noviembre del 2017, en el Perú, la generación hidráulica superó la generación térmica.

Muchas veces se ha notado la situación inversa debido a problemas estacionales y a períodos de estiaje. Para la producción de energía, tampoco es una novedad el uso de materia orgánica, su fácil disponibilidad ha popularizado, por ejemplo, el uso de restos de alimentos, vegetales o incluso excretas animales para la producción de biocombustibles.



Figura 3. Fuentes de generación de energía en el mes de noviembre del 2017. Copyright 2017 por SNMPE. Reimpreso con permiso.

Si mencionamos a las bacterias, su disponibilidad en el medio ambiente es aún mayor pues son microorganismos que tienen la característica de encontrarse en todo tipo de suelos (terrestre, marino) y en todas las condiciones. Debido a su alta capacidad de adaptación, se conoce que también viven en muestras de mineral de suelos de minas, de donde se infiere que el aislamiento de cepas nativas para la producción de energía a partir de un proceso metabólico mediante la transferencia de electrones de forma directa a los electrodos y la generación de pequeñas corrientes eléctricas en celdas de combustible microbiológicas simuladas en el laboratorio, representando la posibilidad de ser usadas como fuente de energía alternativa de fácil alcance.(Rodyou, Rengpipat y Sriyudthsak, 2017).

1.1.2 Definición del problema.

La mayor fuente de producción de electricidad en el Perú es la hidroeléctrica; y puesto que las fuentes de agua dulce en el Perú están agotándose, la energía hidroeléctrica tendrá que ser reemplazada por nuevas fuentes alternas. Es en esta búsqueda de alternativas que está el mundo por falta de fuentes de energía, por lo que contar con alternas fuentes de energía es importante pero será mejor contar con fuentes renovables que permitan la producción de energía de manera continua y al desarrollarla de manera sostenible se logrará un menor impacto en la naturaleza (Kaygusuz, 2002).

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema general.

¿Se puede determinar la producción de energía en celdas microbianas de combustible usando bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro?

1.2.2 Problemas específicos.

-¿Se puede seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico?

-¿Se puede diseñar y construir una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio?

-¿Se puede trabajar con las bacterias seleccionadas en la CMC diseñada y construida en el laboratorio?

-¿Se puede medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas?

-¿Cuál es el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC?

-¿Cuál es el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC?

-¿Se puede calcular la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC?

-¿Se puede calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar la producción de energía en celdas microbianas de combustible usando bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro.

1.3.2 Objetivos específicos

-Seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico.

-Diseñar y construir una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio.

-Trabajar con las bacterias seleccionadas en CMC diseñada y construida en el laboratorio.

-Medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas.

-Determinar el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.

-Determinar el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.

-Calcular la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.

-Calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.

1.4 Justificación de la Investigación

En la búsqueda de nuevas alternativas para la generación de electricidad, aparecen como una posible opción, las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) que podrían solucionar la crisis energética haciendo uso de la disponibilidad de bacterias presentes en suelos mineros. Se conoce los efectos nocivos de un mal o ausente tratamiento de desechos mineros y también es necesario aportar ideas y fuentes alternas de energía. Por

lo que la investigación en este campo de producción de energías limpias se justifica, pues se hace uso de microorganismos de forma sostenible y sin dañar el medio ambiente para proponer un nuevo tratamiento que sería de menor impacto en el ambiente, al encontrar los microorganismos que tengan capacidad de generar electricidad a partir de reacciones propias de su metabolismo. Lo que dejaría como precedente a futuras investigaciones y subvencionamientos de proyectos en ésta área de investigación científica.

1.5 Importancia de la Investigación

Esta investigación es importante pues se considera que las bacterias estudiadas han demostrado la capacidad de producir energía por lo que también se pueden considerar como fuente alternativa de energía.

Además, se muestra un aprovechamiento del suelo de minas que muchas veces generan problemas de aguas por el drenaje ácido de mina, pues al trabajar con bacterias extraídas del mismo suelo y que han sido acondicionadas a reducir el ión férrico; de esta forma, se puede impedir la solubilización de otros metales y la acidificación del agua.

Por lo que podríamos resumirlo de la manera siguiente:

-Importancia Tecnológica: en la zona de estudio, es una tecnología nueva de tratamiento, las bacterias presentes en el suelo minero viven a condiciones específicas y este tipo de producción alterno de energía se podría usar a futuro en las zonas mineras.

-Importancia Económica: Al proponer como tratamiento alternativo para producción de energía se espera que sea de menor costo que tratamientos actuales, pues se obtendría

la materia prima, es decir, el suelo e mina, en el mismo lugar. A partir de este suelo se aíslan las bacterias con capacidad reductiva y no se necesitaría comprar o conseguir de un lugar lejano que implique mayor costo.

-Importancia Social: desde el punto de vista social, el uso del mismo suelo para aislar microorganismos nativos, cuida el entorno en el que viven las comunidades, no degradando los suelos, no generando enfermedades y por consiguiente favoreciendo el desarrollo sostenible (considerando sostenible, como el uso de recursos abióticos y bióticos limitados) de la zona y se espera que la electricidad producida sea en un futuro de beneficio para las comunidades vecinas.

-Importancia Ambiental: La producción de moléculas de agua limpia y de electricidad a partir de una fuente alterna, es decir, evitando el uso de combustibles fósiles que contaminan el medio ambiente y generan gases que incrementa el efecto invernadero, por lo que se puede decir que se propone un procedimiento que no contaminaría el medio ambiente y de esta manera favorecería el cuidado del mismo. También es importante resaltar que es de carácter de urgencia, el contar con nuevas fuentes de energía y que éstas sean renovables pues las fuentes de carbono están agotándose.

1.6 Limitaciones de la Investigación

El tiempo es la mayor limitante para realizar un estudio, pues en el proceso de investigación se han abierto muchos caminos para probar y experimentar diversos aspectos que involucran lograr la reducción del ión férrico, la generación de moléculas de agua limpia y la producción de electricidad.

-Limitación geográfica: La fase experimental se hará en el laboratorio de Biotecnología Ambiental en la Universidad Cayetano Heredia, en el distrito de San Martín de Porres en la provincia de Lima, departamento Lima- Perú por lo que no hay una limitación en ese sentido.

-Limitación temporal: La investigación, que consta de la parte de análisis de muestra, prueba de producción de electricidad y redacción de la investigación, se realizará en el periodo de aproximadamente 1 año y medio.

Esta iniciará en Febrero del 2016 y culminará el año 2017 en el mes de Noviembre, pues se ha considerado un tiempo adecuado para hacer pruebas y evaluar resultados.

Considerando de esta forma al tiempo como un limitante controlado.

-Limitación del conocimiento: Sería la limitante más considerable porque el tema es muy amplio; por esta razón, la investigación se centrará en abundar sobre temas de producción de electricidad en celdas microbianas, así como contar con el asesoramiento de personal capacitado en los temas de aislamiento de microorganismos y electricidad para que se pueda superar esta posible limitación que podría generarse por falta de conocimiento.

-Limitación de tecnología: Se ha contado con el apoyo económico de un proyecto para comprar maquinarias e instrumentos necesarios además de los con que ya cuenta el laboratorio para poder realizar la investigación. También el tener acceso a fuentes bibliográficas en red para controlar esta posible limitación.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Marco Referencial

2.1.1 Antecedentes de la investigación.

2.1.1.1 Bruce E. Logan (2006) en el artículo: “Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology”, publicada en la revista American Chemical Society.

En este artículo se describe el funcionamiento de la celda microbiana de combustible (MFC) por lo que también detallan la tecnología y metodología para poder construirlas. Se brinda un pequeño resumen del transporte de electrones desde el ánodo al cátodo a través de una resistencia. Se dice que los electrones que llegan al cátodo se mezclan con los protones que pasaron desde el ánodo a través de la membrana intercambiadora de protones (generalmente se usa Nafion o Ultrex). También se describen los diferentes tipos de celdas y los diversos materiales que se usan para armarlas. Se menciona que muchas veces se ha probado una mejor producción de electricidad con cultivos puros en vez de usar cultivos mixtos. Y se explican factores que influyen en el descenso del voltaje de la celda y los cálculos necesarios para conocer la eficiencia energética. Además, también se explica con detalle como la presencia de mediadores altera la producción de voltaje. Lo que sugieren es que se considere que las bacterias tienen varias aplicaciones en el campo.

2.1.1.2 Abraham Esteve-Núñez (2008), en el artículo “Bacterias productoras de electricidad” publicado en la revista Actualidad de la Sociedad Española de Microbiología (SEM).

En este artículo explica de manera resumida como la energía química producida por las bacterias es convertida en energía eléctrica y es registrada en una celda microbiana de energía. Explica los tipos de celdas y cómo a través de los años se ha ido avanzando en este campo. Ahonda sobre el tema de mediadores redox que son los que aumentan la producción de corriente y la potencia. Explica cómo estos mediadores transportan los electrones de la bacteria hacia el electrodo, suelen reoxidarse y quedar a disposición para ser reducidos por las bacterias. También comenta que estos mediadores son algo tóxicos por lo que por razones ambientales se limita su uso en celdas.

Recalca que generalmente no se puede asegurar que organismos son los que participan activamente en el “proceso electrogénico” pues es probable que estas poblaciones realicen incluso “fermentaciones del combustible” y posen sobre el ánodo sólo para tener un soporte. Además el descubrimiento en los últimos años de “microorganismos electrogénicos” ha desplazado la idea de usar mediadores, pues estos organismos son capaces de transferir sus electrones sin necesidad de mediadores redox artificiales.

En este artículo también se explica como la bacteria *Geobacter* es usada de modelo de electrogénesis y cómo desde su descubrimiento en 1987 se ha ido estudiando y sorprendiendo con las diferentes aplicaciones en aspectos ambientales.

En este artículo también estudiaron a la bacteria y lograron secuenciar su genoma y a partir de estudios también descubrieron que su capacidad de transferir electrones fuera de la célula estaba relacionado con la presencia de citocromos C. Esto lo corroboran con una técnica llamada espectroscopía de fluorescencia. Sin embargo, con la técnica de espectroscopía de infrarrojo que es más sensible, se demostró que “los grupos hemo de los citocromos C más externos descargan sus electrones de forma directa sobre la superficie del electrodo”.

2.1.1.3 Hernández Fernández (2010), en el artículo “Montaje y estudio de una pila de combustible microbiana para la producción de electricidad con depuración simultánea de aguas residuales” publicado en II Jornadas sobre nuevas tendencias en la enseñanza de las ciencias y las ingenierías del 18 al 20 de noviembre de 2010 en Murcia.

En este artículo, se explica el funcionamiento de una celda microbiana aplicada a la depuración de aguas residuales a nivel de laboratorio. En estos experimentos se utiliza una botella de la marca SHOTT DURAN que se usa como celda y se prueba con diferentes tipos de electrodos para el ánodo y cátodo. Se hacen mediciones de voltaje periódicas y de demanda bioquímica de oxígeno. También se determina el rendimiento de la pila de combustible microbiana calculando la intensidad, la potencia y la eficiencia coulombica.

2.1.1.4 Surajit Das (2010), en el artículo “Recent developments in microbial fuel cell: a review” publicado en Journal of Scientific & Industrial Research.

En este artículo se resume el principio de funcionamiento de una celda microbiana de energía (MFC) y describe los materiales de construcción empleados para armar una celda. Menciona que el vidrio y el policarbonato son los materiales más usados para la construcción de la celda. Además señala que el platino es el mejor electrodo pero por ser costoso es más común el uso de grafito. Las membranas de intercambio protónico más usadas son las de Nafion o Ultrex. El artículo también describe que la MFC de un solo compartimento es más económica pues no usa membrana de intercambio protónico y una aereación periódica hace el compartimento más eficiente y una mejor opción para el tratamiento de aguas residuales y generación de energía. El principio de funcionamiento de una celda microbiana es explicado a partir del potencial metabólico generado por la conversión de la materia orgánica en electricidad por la transferencia de electrones producidos en el ánodo. En líneas generales se explica que cuando hay oxidación en ausencia de oxígeno, los electrones se unen a través de la cadena transportadora de electrones a terminales como el Fe^{+3} o nitrato y cuando no hay aceptores de electrones, los electrones se dirigen hacia el ánodo.

2.1.2 Referencias históricas.

Las celdas de combustible microbianas (CCM) han sido estudiadas desde los años 80's-90's, aunque la idea general de producir electricidad a partir de organismos vivos ya había sido descubierta en el siglo 18 cuando casualmente Galvani (O'Malley, 1956) experimentaba que las piernas de una rana muerta se

movían. En este mismo siglo, Volta, que era un profesor físico, (Ciardi, 2001) observó los resultados de los experimentos de Galvani y a partir de sus propios estudios, construyó una primera batería. Luego, fue otro físico, Gastón Planté, quien en 1859 hizo que sus pilas ingresaran al mundo comercial al construir pilas (Kurzweil, 2010) a base de plomo sólido, como de las que usamos hasta estos días. Sin embargo, quien es considerado el padre de las celdas de combustible es William Grove (Motovali, 2004) al ser quien construyó la primera. En 1911 Potter (Song, Zhu y Li 2015) tuvo la idea de usar microorganismos para generar electricidad experimentando con E.coli. En 1931, Barnet Cohen fue capaz de construir celdas microbianas de combustible que ordenó en serie y logró producir 35 voltios aunque con una corriente de sólo 2 miliamperios. En 1959, Bacon (Carrette, Friedrich y Stimming, 2001) logró construir una celda con la que logró obtener una corriente de 5kW. Posteriormente creció el campo de investigación en celdas de combustible y hasta la NASA así como empresas de vehículos desarrollaron investigaciones en diversos tipos de celdas de combustible que se clasificaron según el electrolito que usaron. Una de las más estudiadas fue la que producía hidrógeno, pero aunque funcionó y produjo electricidad, no se consideró confiable porque la producción de hidrógeno por parte de los microorganismos era inestable. A lo largo de estas experimentaciones, todas las celdas han demostrado presentar ventajas como también desventajas en su uso. En el año 1976, Karube fue el que elaboró el diseño actual de una celda microbiana de combustible (Karube, Matsunaga, Tsuru Suzuki, 1976) y posteriormente Suzuki trabajó usando este tipo de modelo y experimentando con ella, dejándole paso a Allen y luego a Bennetto (Bennetto,

Stirling, Tanaka y Vega, 1983) quien consideró a las celdas como un futuro método para la generación de electricidad en países pobres. Y en el año 2007, una universidad en Australia con el aporte económico de una compañía privada, lograron armar un prototipo de celda microbiana que logró convertir 10 litros de aguas residuales de una cervecería en CO₂ (Lee, Logan, Terry y Spear, 2014), agua limpia y electricidad. Esto es un gran avance y las investigaciones siguen hacia adelante para lograr resultados positivos a escala industrial.

2.2 Marco Conceptual

2.2.1 Ácido.

Es un grupo de compuestos importantes que se caracterizan por que al disolverse en agua, la concentración de hidronios (H⁺) aumenta por su facilidad de ceder iones H⁺. Una característica de los compuestos es que presentan un pH menor a 7.

2.2.2 Aerobiosis.

Se denomina a un espacio que contiene oxígeno. El término se aplica a organismos que tienen la capacidad de vivir respirando oxígeno.

2.2.3 Anaerobiosis.

Medio sin presencia de oxígeno, es decir, anóxico. El término se aplica a la vida sin oxígeno u organismos con capacidad de vivir en ausencia de oxígeno.

2.2.4 Ánodo.

Es el electrodo positivo de la celda electrolítica el cual atrae iones negativos (aniones) que están en el electrolito que está en la cámara anódica (Cuentas-Gallegos, Palacín, Colomer, Jurado y Gomez-Romero, 2002).

2.2.5 Bacteria.

Es un microorganismo unicelular procarionte, no presentan núcleo y pueden estar desnudas o presentar una cápsula, aisladas o en grupo y pueden presentar flagelos o pequeños cilios. Son los organismos más abundantes y pueden vivir en casi todos los hábitats y a diferentes condiciones. Existen diversos géneros conocidos pero explicaremos a continuación el género con el que vamos a trabajar.

Acidithiobacillus spp. Es el género de bacterias que incluye proteobacterias quimilitrófas, debido a que usan compuestos inorgánicos como donadores de electrones pero también son autotróficos pues obtienen material celular transformando el CO₂ por reacciones del ciclo de calvin (Colmer , Temple y Hinkle ,1950).

Acidithiobacillus ferroxidans, es la especie que vamos a estudiar y se caracteriza por ser bacilos rectos Gram negativo, se desarrollan en medios ácidos y poseen capacidad quimiosintética para oxidar compuestos de azufre a ácido sulfúrico y de hierro a ión férrico. Son generalmente aeróbicas (Pradhan , Nathsarma , Srinivasa, Sukla y Mishra, 2008).

2.2.6 Cátodo.

Es el electrodo negativo de una celda electrolítica al cual se dirigen iones positivos (cationes) que están disueltos en el electrolito dentro de la cámara catódica (Cuentas-Gallegos et al., 2002).

2.2.7 Celda.

Celda electroquímica: Es un dispositivo capaz de transformar las reacciones químicas sucedidas en el interior en energía eléctrica. Una semicelda contiene un metal en dos estados de oxidación y sucede una reacción redox. Las dos semiceldas deben estar tener sus soluciones sin mezclar y estar unidas por un puente salino o una membrana.

Celda electrolítica: Contiene en su interior un líquido llamado electrolito y empieza cuando una pila o fuente externa, empuja electrones hacia un electrodo (quedando cargado negativamente como cátodo y atrayendo iones positivos o cationes) y extrae los mismos al otro electrodo (quedando cargado positivamente como ánodo y atrayendo iones negativos o aniones) (Gómez-Biedma., Soria y Vivó, 2002).

2.2.8 Corriente.

Corriente eléctrica: Es la magnitud física que nos señala la cantidad de electricidad que recorre un conductor por una unidad de tiempo y según el sistema internacional de unidades, se mide en amperios y es consecuencia del movimiento de los electrones que se presenten en el material medido. Se mide en Amperios.

2.2.9 Cultivo de microorganismos.

Es una técnica biológica de proliferación de microorganismos proporcionándole un entorno a condiciones adecuadas. Es importante controlar cantidades de nutrientes, pH, concentración de iones, temperatura y demás condiciones. Al proliferarse, producen copias idénticas de sí mismos y necesitan los elementos presentes en su propia composición química.

2.2.10 Densidad de potencia.

Se define como potencia por unidad de área (W/m^2) o Watts por metro cuadrado. También es común el uso de densidades de potencia en miliwatts por centímetro cuadrado (mW/cm^2). En este estudio lo vamos a calcular como el área bajo la curva de comparación de las medidas de voltaje a través del tiempo de las celdas experimentales sobre la celda control.

2.2.11 Electrodo.

Es una superficie donde ocurren reacciones de ox-red. Los procesos en la interfase metal-solución de cualquiera fuere el metal que este en contacto con el electrolito, son difíciles de medir de manera absoluta. El metal que esté en contacto con el electrolito se tiende a disolver y queda negativamente cargado. Por otro lado los electrolitos depositados sobre el metal alcanzan el equilibrio en un momento determinado y se crea una diferencia de potencial entre metal y electrolito.

2.2.12 Electricidad.

Se conoce como un conjunto de fenómenos producidos por el movimiento de electrones e interacción entre las cargas eléctricas positivas y negativas de los cuerpos físicos.

2.2.13 Energía.

Capacidad que posee un cuerpo para realizar una acción, trabajo o realizar un cambio o transformación. La ley de la conservación de la energía dice que “la energía no se crea ni se destruye, sólo se transforma”. La energía puede tomar otra forma de energía; es decir, la energía puede tomar apariencia de corriente, luz, calor y movimiento.

2.2.14 Hierro.

Es el cuarto elemento más abundante en la Tierra, representando un 5% y, entre los metales, sólo el aluminio es más abundante. Forma parte de varios minerales, destacan la hematites (Fe_2O_3), la magnetita (Fe_3O_4), la limonita ($\text{FeO}(\text{OH})$), la siderita (FeCO_3), pirita (FeS_2), ilmenita (FeTiO_3), entre otros.

2.2.15 Inóculo.

Las bacterias crecen o se cultivan en diferentes con componentes muy variados. Cuando se quiere sembrar bacterias en otro medio para acondicionarlas o en el mismo medio para hacerlas crecer, el material con bacterias que se inocula en el medio, toma el nombre de inóculo.

2.2.16 Materia orgánica.

La materia orgánica está presente en el suelo y se estima analizando la cantidad de carbono presente. Es decir, conociendo la cantidad de carbono orgánico, se estima la cantidad de materia orgánica. Las bacterias en presencia de oxígeno descomponen la materia orgánica y producen dióxido de carbono y agua. Mientras que la descomposición anaeróbica, produce productos tóxicos como el sulfuro de hidrógeno, metano y nitrito.

2.2.17 Membrana de intercambio iónico.

Están hechas de un material polimérico. Las membranas de intercambio aniónico tienen grupos catiónicos fijos, mientras que las membranas de intercambio catiónico tienen grupos aniónicos.

2.2.18 Microorganismo.

Son un grupo de seres vivos de diferentes características cuya única característica común es su tamaño. Por su diminuto tamaño pasan inadvertidos al ojo humano y sólo son visibles en microscopios. La mayoría son unicelulares y muy pocos llegan a constituir organismos pluricelulares. La parte que se ocupa de su estudio es la microbiología.

2.2.19 Mineral.

Es inorgánico de origen natural, tiene una estructura química ya determinada así como una estructura cristalina que también está definida y formando cristales.

2.2.20 Oxidación.

Es el resultado de oxidar. Es decir, cuando el oxígeno se combina con un metal o un metaloide. Al producirse la oxidación, el elemento en cuestión pierde una cantidad de electrones. Y en líneas generales, la oxidación implica que uno de los elementos desprenda electrones y que otro los asimile.

2.2.21 pH.

Indica la acidez o alcalinidad de una sustancia. Considera la concentración de iones hidronio $[H_3O^+]$

2.2.22 Potencia.

Cantidad de trabajo (W) por unidad de tiempo (t). Es decir; es el trabajo que realiza cada carga (voltaje) por el número de cargas por unidad de tiempo (corriente).

2.2.23 Protones.

En términos físicos, un protón es una partícula subatómica con una carga +1, de signo contrario a los electrones.

2.2.24 Reducción.

Todo proceso de reducción está unido al proceso de oxidación. Este proceso implica transferencia de electrones; pérdida de la sustancia que se oxida y ganancia de electrones de la sustancia que se reduce.

2.2.25 Resistencia eléctrica.

Es la resistencia que se ejerce en contra de la corriente. Los materiales que tengan baja resistencia eléctrica, son buenos conductores de electricidad.

2.2.26 Voltaje.

Es el trabajo por unidad de carga (ejercido por el campo eléctrico) sobre una partícula para moverla de un lugar a otro. Este diferencial potencial se mide en voltios (V) según el sistema internacional. Es decir; la cantidad de energía que transporta cada carga.

2.3 Marco Teórico

2.3.1 Agua ácida.

El agua ácida fluctúa entre un pH de 6,9 a 1 y entre más iones hidrógeno se liberen, más ácida se vuelve una sustancia. El agua ácida que usamos en esta investigación es a pH 1,8 y se usa para mantener la acidez de los medios de cultivo de las bacterias que son acidófilas.

2.3.2 Bacterias acidófilas.

Son las bacterias que se han adaptado a crecer y vivir en condiciones ácidas; es decir, a un pH menor que 4. Algunos de estas bacterias son aerobias y otros anaerobios estrictos.

2.3.3 Celda microbiana de combustible (CMC).

Es una pila de combustible microbiana y un dispositivo que convierte la energía química en energía eléctrica producto de la oxidación de bacterias de ciertos sustratos. Una CMC común, consiste en dos semiceldas separadas por una membrana de intercambio iónico; generalmente es una membrana de intercambio catiónico. En la cámara anódica, producto de la oxidación en condiciones anaeróbicas se produce CO₂, protones y e⁻. Estos electrones (e⁻) generados son transferidos hacia el electrodo negativo ubicado en la cámara catódica viajando a través de una resistencia desde el ánodo hacia el cátodo. Aquí los electrones son entregados a un aceptor de electrones, generalmente es el oxígeno que se combina con protones provenientes de la cámara anódica a través de la membrana y forma agua.

2.3.4 Calentamiento global.

El Calentamiento global es el aumento de la temperatura media de la superficie terrestre, como consecuencia del cambio climático. Los gases de efecto invernadero son una de las causas; pues actúan de manera similar a un invernadero, atrapando el calor y recalentando la Tierra.

2.3.5 Coloración Gram.

Christian Gram (microbiólogo danés) fue el creador de esta técnica que permite diferenciar claramente la morfología de las bacterias, entre bacterias gram positivas (aquellas que se teñían de morado) y las bacterias gram negativas (las que tras la tinción se ven de color rosa o rojizas).

2.3.6 Fuentes alternas de energía.

Las fuentes alternas de energía se refiere a todas las maneras de conseguir energía que no involucran la quema de combustibles fósiles. Estas fuentes ampliamente disponibles en la tierra y son amigables con el medio ambiente debido a que poca o nula contaminación. Hay varios proyectos de fuentes de energía alterna en muchos países para reducir el uso primordial de los combustibles fósiles. Ahora existen muchas alternativas impresionantes que podemos considerar. Cómo la energía solar, energía eólica.

2.3.7 Métodos de aislamiento.

Para aislar a las bacterias con las que se va a trabajar, se considera varios medios de crecimiento que les brinde a las bacterias, las condiciones idóneas para su desarrollo. Los medios más usados son los medios líquidos y los medios sólidos.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y nivel de investigación

3.1.1 Tipo de la investigación.

Se propuso para esta investigación, la realización de un estudio de tipo aplicada pues se apoya en la observación de hechos experimentales en laboratorio.

También podría decirse que es de tipo aplicada y biotecnológico- ambiental pues usa seres vivos para obtener un desarrollo tecnológico como es la producción de energía.

3.1.2 Nivel de la investigación.

La investigación está dentro del nivel correlacional, pues pretende encontrar relaciones de influencias entre la producción de electricidad y el del uso de bacterias que sean capaces de reducir metales como el hierro.

3.2 Método de la Investigación

Se desarrolló el método experimental y esta investigación se ha organizado de la siguiente manera:

- Selección de microorganismos
- Construcción de celda microbiana de combustible

- Desarrollo de experimentos con grupos control.

3.3 Diseño de la Investigación

Esta investigación se encuentra dentro del tipo de diseño experimental, de laboratorio; específicamente cuasiexperimental porque aunque existe un grupo control, no hay un control máximo de las variables que podrían influir en los resultados.

3.4 Hipótesis de la Investigación

3.4.1 Hipótesis general.

Las bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro tienen capacidad de producir energía en celdas microbianas de combustible.

3.4.2 Hipótesis específicas.

- Es posible seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico.

- Es posible diseñar y construir una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio.

- Es posible trabajar con las bacterias seleccionadas en CMC diseñada y construida en el laboratorio.

- Es posible medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas.

- Es posible determinar el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.

-Es posible determinar el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.

- Es posible calcular la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.

- Es posible calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.

3.5 Variables

3.5.1 Variable independiente.

Capacidad bacteriana de óxido-reducción de TK-Fe.

3.5.1.1 Indicadores.

Colonias crecidas.

Voltaje medido.

3.5.2 Variable dependiente.

Energía total de la celda

3.5.2.1 Indicadores.

Cálculo del área bajo la curva.

3.6 Cobertura del Estudio de la Investigación

3.6.1 Universo.

Muestras de mineral del Laboratorio de Biotecnología ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.6.2 Población.

Cultivos del banco de cepas aislados de muestra mineral del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.6.3 Muestra.

5 cepas de *Acidithiobacillus ferroxidans* de los cultivos de muestras de mineral. Las cepas 102, 226, 311, 312 y la 107.2 fueron las seleccionadas. Estas cepas demostraron tener la capacidad de oxidar Fe^{+2} y reducir Fe^{+3} , con excepción de la 102 que sólo oxida Fe^{+2} .

3.7 Técnicas, Instrumentos y Fuentes de la Recolección de Datos

3.7.1 Técnicas de la investigación.

3.7.1.1 Preparación de medios.

Medio Feo:

Es un medio de cultivo oxidante que brindará a las bacterias las condiciones a las cuales las queremos hacer crecer que permite el crecimiento de bacterias acidófilas y ferrooxidantes (Johnson, 1995). Este es un medio con altas cantidades de hierro ferroso por lo que se seleccionarán bacterias que tengan la capacidad de oxidar el ión ferroso. En este medio, la Sol. A (Tabla N°1) debe estar a un pH de 2,5-2,8 y ser esterilizado en la autoclave para evitar crecimiento de otro microorganismo. La Sol. B (Tabla N°1) debe ser filtrada y esterilizada con una membrana de 0,2 micrómetros. Las soluciones empleadas en la preparación del medio Feo están descritas al final.

Tabla 1
Medio líquido Feo (400 ml)

Soluciones	Medio FeO	Cantidades
Sol. A	TSB	0.1 g
	Sales Basales	40 ml
	Elem. Trazas	0,4 ml
	Agua	250 ml
Sol. B	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78 g.
	H ₂ O(d) pH: 1.8	110 ml

Nota de la Tabla 1: En esta tabla se describe el medio líquido que se preparó para el caldo de crecimiento de las bacterias. La Sol. A se prepara por separado a un pH de 2,5 y se esteriliza con autoclave; mientras que la Sol. B, con filtros.

Para preparar el medio sólido Feo (Tabla N°2), se sigue el mismo procedimiento pero es necesario agregar el agar diluido en agua, calentarlo y esterilizarlo en la autoclave para ser repartido en placas Petri que al enfriarse se cuajará y se guardará en la congeladora hasta su uso (Johnson, 1995).

Tabla 2
Medio sólido FeO (400 ml)

Soluciones	Medio FeO	Cantidades
Sol. A	TSB	0.1 g
	Sales Basales	40 ml
	Elem. Trazas	0,4 ml
	Agua	250 ml
Sol. B	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78 g.
	H ₂ O(d) pH: 1.8	110 ml
Sol. C	Agar	2.8 g.
	H ₂ O (d)	50

Nota de la Tabla 2: En esta tabla se describe el medio sólido que se preparó para el crecimiento de las bacterias. La Sol. A se prepara por separado a un pH de 2,5 y se esteriliza con autoclave; mientras que la Sol. B, con filtros. Finalmente se agrega la Sol. C.

Medio TK / Fe-Tio:

Es un medio de cultivo oxidante que brindará a las bacterias las condiciones a las cuales las queremos hacer crecer. Este es un medio con altas cantidades de Hierro y tiosulfato por lo que se seleccionarán bacterias que tengan la capacidad de ambos. (Tuovinen y Kelly, 1973) En este medio, la Sol. A (Tabla N°3) debe estar a un pH de 1,8 y ser esterilizado en la autoclave para evitar crecimiento de otro microorganismo. La Sol. B (Tabla N°3) debe ser filtrada y esterilizada con una membrana de 0,2 micrómetros, el hierro con 50ml de agua a pH 1,8 y el tiosulfato con 10 ml de agua a pH 4.

Tabla 3
Medio líquido TK/ Fe-Tio (1litro)

Soluciones	Medio TK/ Fe-Tio	Cantidades
Sol. A	KH ₂ PO ₄	0.5 g
	Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0.4 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g
	Agua	800 ml
Sol. B	FeSO ₄ .7H ₂ O	33.4 g.
	Tiosulfato	5 g.

Nota de la Tabla 3: En esta tabla se describe el medio líquido que se preparó para el crecimiento de las bacterias. La Sol. A se prepara por separado a un pH de 1,8 y se esteriliza con autoclave; mientras que la Sol. B, con filtros a un pH 1,8 y pH 4.

Solución Férrica:

Es producto de la oxidación natural por parte de las bacterias, cuando al consumir la materia orgánica del medio convierten el Fe⁺² a Fe⁺³.

Para obtener este medio (Johnson and McGinness, 1991), se filtra el producto de la oxidación de una cepa en el medio Feo y se usa papel filtro para retener formaciones cristalinas y luego se filtra con membrana 0.2 µm en un ambiente estéril para retener bacterias y sólo quede el medio oxidado; es decir, el férrico oxidado por acción de las bacterias a partir del ferroso.

Medio Feo +Férrico:

Es un medio de cultivo reductor y se prepara a partir de la fórmula del Feo. Se usa la Sol A. (Tabla N°1) a un pH de 2,5 con la solución férrica a una

concentración de 10 g/L de Fe. Las soluciones empleadas en la preparación del medio Feo están descritas al final de la tabla.

Tabla 4
Medio líquido Feo + férrico (400 ml)

Soluciones	Medio FeO+ férrico	Cantidades
Sol. A	TSB	0.1 g
	Sales Basales	40 ml
	Elem. Trazas	0,4 ml
	Agua	250 ml
Sol.B	Solución férrica	100 ml

Nota de la Tabla 4: En esta tabla se describe el medio líquido que se preparó para el de crecimiento de las bacterias. La Sol. A se prepara por separado a un pH de 2,5 y se esteriliza con autoclave; mientras que la Sol. B sólo se agrega.

Para preparar el medio sólido Feo+ férrico (Tabla N°5), se sigue el mismo procedimiento pero es necesario agregar el agar diluido en agua, calentarlo y esterilizarlo en la autoclave para ser repartido en placas Petri que al enfriarse se cuajará y se guardará en la congeladora hasta su uso.

Tabla 5
Medio sólido Feo + férrico (400 ml)

Soluciones	Medio FeO+ férrico	Cantidades
Sol. A	TSB	0.1 g
	Sales Basales	40 ml
	Elem. Trazas	0,4 ml
	Agua	200 ml
Sol. B	Solución férrica	100ml
	Agar	2,8 g.
	H2O(d)	50

Nota de la Tabla 5: En esta tabla se describe el medio que se preparó para el medio líquido de crecimiento de las bacterias. La Sol. A se prepara por separado a un pH de 2,5 y se esteriliza con autoclave; mientras que la Sol. B sólo se agrega.

3.7.1.2 Selección de microorganismos.

Procedimientos de la selección:

Para la selección de microorganismos, se sembró por separado cada cepa proveída por el laboratorio (Román, 2017) en medio líquido FeO (Tabla N°1) y en medio líquido TK/Tio-Fe (Tabla N°3) repartidos en tubos, en ambos casos se agregó Voriconazol (fungicida) para evitar el crecimiento de hongos y se mantuvieron en la estufa a 28°C por 15 días en condiciones de aerobiosis para su oxidación. Los dos medios contienen ión ferroso y el crecimiento bacteriano fue medido considerando la oxidación del ión ferroso.

Se eligieron las cepas que demostraron tener capacidad oxidativa. Se les realizó coloración Gram (Román, 2017) y se observaron al microscopio. Luego se sembraron en medio Feo sólido (Tabla N°2) y se mantuvieron en tapers dentro de la estufa a 28°C por 15 días en condiciones de aerobiosis para su oxidación.

Para la preparación de la solución férrica, se seleccionó la cepa que demostró tener una capacidad de oxidación en menor tiempo.

Las colonias seleccionadas en medio sólido fueron desarrolladas en medio líquido FeO+Fe⁺³ (Tabla N°4) para ver si tenían capacidad de reducir el férrico. Las que redujeron Fe, se repicaron a medio sólido de FeO+Fe⁺³ para ver colonias. Esta prueba se hizo por duplicado, en condiciones de

aerobiosis y anaerobiosis. La anaerobiosis se obtuvo al introducir los sobres generadores de anaerobiosis en jarras junto con los tubos o placas de cultivo.

Las colonias con capacidad de reducir el Fe^{+3} fueron seleccionadas para las pruebas en las celdas microbianas de combustible.

3.7.1.3 Diseño y construcción de la celda de combustible microbiana (CCM).

Estructura de la celda:

La celda fue construida con el polímero metil metacrilato (PMMA) comúnmente llamado acrílico, es un material transparente e inerte a sustancias corrosivas. Una lámina de 4mm de espesor fue cortada en cuadrados de 35 x 35 mm de caras laterales, rectángulos de 35 x 38 mm, 38 x 80 mm y 38 x 39 mm para las paredes posteriores, bases y techos, respectivamente. Una lámina adicional de 10 mm de espesor se usó para cortar los sujetadores, rectángulos de 60 x 38mm usados para fijar las dos semiceldas y evitar derrames. En la figura N°4 se muestran los planos del corte laser. Se realizó cortes laser que dejaron lisos los bordes de todas las piezas. Como se observa en la figura N°4, en el techo de cada semicelda se realizaron 3 orificios. 2 orificios con un diámetro de 5,5 mm y uno en el centro con un diámetro de 1mm. Asimismo en la pieza de nombre “sujetador” se hicieron 4 orificios de 5mm.

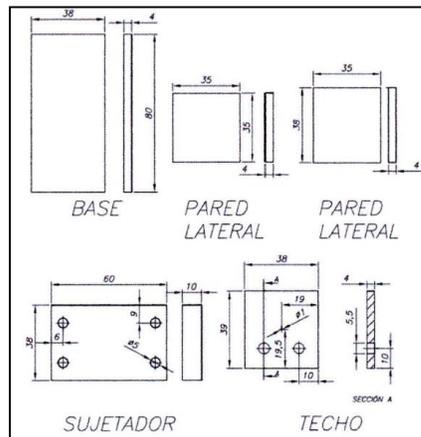


Figura 4. Planos de corte láser de la celda de combustible microbiano. Fuente propia.

Adicionalmente, se cortó caucho de llanta en forma de un marco rectangular de medida externa 39 x 43 mm y medida interna 35 x 30 mm.

Preparación de electrodos:

Los electrodos a base de fieltro de grafito fueron cortados con una tijera de metal en cuadrados de 10 x 10 mm. Después, fueron dejados en un frasco ámbar con 15 ml de solución a 1M de NaOH por dos días, luego fueron enjuagados con agua desionizada y limpiados con papel toalla.

Posteriormente, fueron traspasados a un frasco de vidrio transparente con 15 ml de solución a HCl a 1M por 2 días, en seguida fueron enjuagados con agua desionizada y limpiados con papel toalla. Este proceso fue repetido 5 veces, hasta que no hubo la presencia de grafito en el papel toalla.

Preparación de cables de conducción:

Para la conducción de la energía se seleccionó alambres de platino. Estos alambres se cortaron con una longitud de 60 mm y en el extremo se incrusta al electrodo por el centro y enganchándolo para que no se caiga. Finalmente, para volver a usar los alambres, se esterilizan al hervirlos en 5 gotas de HNO_3 y enjuagarlos con agua destilada.

Activación de la membrana Naflon:

La membrana de Intercambio de protones (MIP) fue activada por inmersión en baños de agua destilada a una temperatura de 80°C durante una hora. Luego, la MIP fue sumergida en una solución al 3% de H_2O_2 en las condiciones anteriormente descritas. Finalmente, la activación concluyó con la inmersión de la MIP en H_2SO_4 en el mismo período de tiempo y temperatura.

Ensamblaje de la celda con membrana Naflon:

Las piezas de acrílico se usaron para armar 2 semiceldas, tal como se muestra en la figura N°5. Se utilizó cianoacrilato (superglue) para pegar la base con las paredes y después este con el techo para formar un cubo interior.



Figura 5. Semiceldas de acrílico. Fuente propia.

Se aseguró la impermeabilidad de las semiceldas sellando los bordes con silicona. De la misma forma, se fijaron los marcos de caucho a las celdas, esto evitó la fuga de líquidos de la celda.

En los 4 orificios de 55mm se colocaron conos de aguja y se selló la unión con silicona, como se muestra en la figura N°6.



Figura 6. Partes de semiceldas. Fuente propia.

En el extremo libre de los alambres de platino se conectó a una resistencia con un cable con cocodrilos para sostenerlos y mantener fija la corriente que viaja desde los electrodos, pasa por la resistencia y es leída por el multímetro. Este procedimiento se realizó para tener una conexión sólida en la cual tomar las muestras de voltaje.

Las 2 semiceldas se unieron con la membrana colocada en medio de ambas y presionadas por el sujetador (Fig. 4), usando 4 pernos de 130 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro como se muestra en la figura N°7.

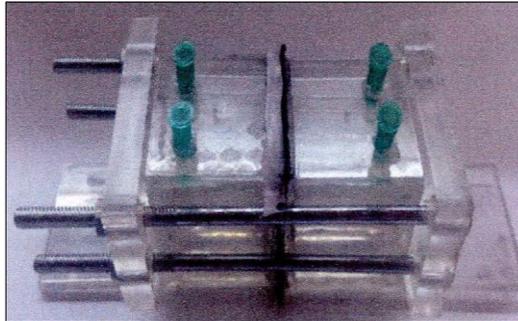


Figura 7. Celda de combustible microbiana diseñada con membrana Naflon. Fuente propia.

Llenado de celda:

En la cámara anódica, uno de los dos orificios de 5,5 mm se usó para alimentarla con 30 ml de medio TK/ Tio-Fe (Tabla N°4) y las cepas de pruebas. La alimentación se realizó mediante una jeringa estéril de 20 ml conectada a un adaptador estándar y unido a una manguera o alargadera. El segundo orificio de mismo diámetro estuvo conectado a un suministro de gas que contenía una mezcla de 80%N y 20% CO₂, a través de un regulador de suero. El tercer orificio, de 1 mm de diámetro, fue utilizado para introducir el cable unido al electrodo de fieltro de grafito antes de sellar la celda.

En la cámara catódica, uno de los dos orificios de 5,5 mm se usó para ingresar 30 ml de medio Feo + férrico (Tabla N°5). Y las cepas de bacterias si es que fuera el caso. La alimentación se realizó mediante una jeringa estéril de 20 ml conectada a un adaptador estándar y unido a una manguera o alargadera. El segundo orificio de mismo diámetro se usó para oxigenar el agua mediante un aireador de pecera. El tercer orificio, de 1 mm de diámetro fue utilizado para introducir el cable unido al electrodo de fieltro de grafito antes de sellar la celda.

De esta forma, la celda microbiana de combustible queda como se ve en la figura N°8.

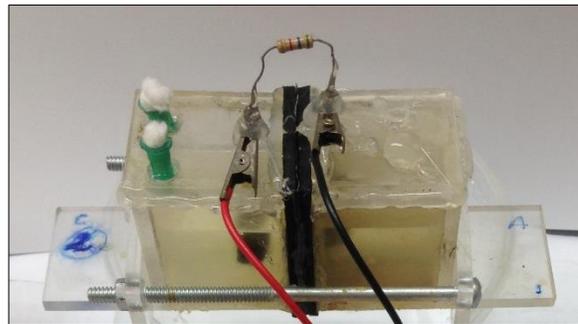


Figura 8. Celda de combustible microbiana

3.7.2 Instrumentos de la investigación.

3.7.2.1 Selección de microorganismos.

Materiales y equipos:

Para realizar el trabajo microbiológico de selección de cepas bacterianas, es necesario realizar cada actividad del procedimiento con limpieza y

cuidado para evitar en lo posible una contaminación del medio de cultivo de las cepas. Además es necesario el contar con material que permita la cuantificación exacta de los medios y o soluciones a ser usadas para trabajar con precisión y exactitud.

Los materiales necesarios para el trabajo de selección de cepas bacterianas son: Matraces Earlmeyer, botellas de vidrio, tubos de ensayo, probetas, pipetas, asas de siembra, placa Petri, laminillas, colorantes y sobres de anaerobiosis.

Los medios de cultivo se preparan en envases de vidrio como matraces Earlmeyer, botellas y/o tubos de ensayo que antes de ser usados se lavan con solución de agua -detergente y escobillas especiales para remover cualquier residuo. Si éstos continúan sucios, se llenan con una solución sulfocrómica y se deja reposar unas 12 horas, luego se enjuagan con agua y finalmente con agua destilada hasta que sequen. Para evitar la contaminación, se debe esterilizar los envases de vidrio después de taparlos con tapones de algodón o tapas, en el caso de los tubos. Esta actividad se lleva a cabo en la autoclave donde a través de valores de presión elevados, como 121 kPa, se logra obtener temperaturas superiores a 100°C que permiten la eliminación de cualquier microbio. Para asegurar la esterilidad, los frascos y/o envases de vidrios deben ser tapados con una cubierta de papel y asegurado con liga encima de la tapa o tapón de algodón.

La exactitud de las cantidades de medio de cultivo y/o muestra es importante para obtener resultados iguales en cada repetición del proceso. Para esto hacemos uso de probetas y pipetas que al igual que los envases de vidrio, se deben limpiar, lavar y enjuagar como se explica. La esterilización de éstos es en la autoclave y con una cubierta de papel aluminio, en el caso de las probetas y, con un tapón de algodón en la parte superior de las pipetas y envueltas en papel kraft.

Las asas de siembra son de tipo metálico y se deben mantener limpias en la parte inferior y quitar cualquier residuo adherido, al momento de usarla se esteriliza el extremo inferior con el fuego del mechero hasta que se torna de color rojo vivo.

En los medios de cultivo sólidos se usan placas Petri desechables que vienen en bolsas estériles, listas para usar.

Cuando se cultiva en condiciones de anaerobiosis se hace uso de sobres Anaerogen de la marca Oxoid y que permiten las condiciones de anaerobiosis dentro de una jarra con cierre hermético que permite que el oxígeno presente reaccione con el hidrógeno y se forme agua, generando la anaerobiosis.

Para la utilización de laminillas, se deben limpiar y lavar con solución agua-detergente y enjuagar con agua destilada. Inmediatamente antes de

colocar la gota de muestra para observar en el microscopio, rociar alcohol 70° y esperar que seque en el fuego.

Los colorantes para tinción Gram (Román,2017) deben estar debidamente preparados y filtrados para evitar grumos que obstaculicen una clara visualización en el microscopio.

Los equipos usados en el laboratorio (Tabla N° 6) deben estar en correcto funcionamiento y condiciones, así como el microscopio que debe tener también los lentes limpios y la balanza y pHmetro deben estar calibrados.

Tabla 6
Equipos para realizar selección de microorganismos

N°	Equipos
1	Autoclave (YX-280D)
2	Balanza (AR3130 Adventurer OHAUS)
3	Filtro para membrana de papel 0,2 micras (Whatman)
4	PHmetro (HI 2213 – Hanna Instruments)
5	Congeladora (Ultra Guard Freezer- Binder)
6	Agitador magnético (PC 351- Coming)
7	Microscopio (Primo Star- ZEIZZ)
8	Agitador Vortex QL-861

Nota de la Tabla 6: En esta tabla se menciona los equipos usados en el laboratorio.

3.7.2.2 Desarrollo de experimentos en CCM.

Se realizaron dos experimentos, con tres celdas cada uno, usando el mismo medio en las celdas y también las mismas cepas bacterianas (Tabla N°7).

-Experimento 1: Se prueba la producción de energía con las cepas seleccionadas.

Se trabaja con tres celdas en paralelo pero a diferentes condiciones que fueron monitoreados por quince días con la medición de voltaje. Se mantuvo con el inóculo inicial de bacterias en las celdas donde hubo inóculo.

-Experimento 2: Se evalúa el efecto de la adición de inóculo en la producción de energía.

Se trabaja con tres celdas en paralelo pero a diferentes condiciones que fueron monitoreados por diecinueve días con la medición de voltaje. Se hizo el reingreso de inóculo de bacterias dos veces en las celdas donde hubo inóculo.

En ambos experimentos, la celda 1 fue considerada control y ninguna de las dos cámaras contó con presencia de bacterias, la celda 2 trabajó en el ánodo con las cepas 311 y 226 que tienen capacidad de oxidar hierro y tiosulfato en condiciones de anaerobiosis y en el cátodo con las cepas 311,312 y 107.2 que tienen capacidad de reducir Fe^{+3} en condiciones de aerobiosis y la celda 3 trabajó solamente en el ánodo con las cepas 311 y 226 que tienen capacidad de oxidar hierro y tiosulfato en condiciones de anaerobiosis.

Tabla 7
Experimento en CCM

Exp.	CCM	Cable de electrodo	Ánodo	Inóculo	Cátodo	Inóculo
Celda 1	Control- sin inóculo	Platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	-----	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----
Celda 2	Inóculo en cátodo y ánodo	Platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + Cepa 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	311+312 +107.2
Celda 3	Inóculo sólo en ánodo	Platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + Cepa 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----

Nota de la Tabla 7: Se describe el modelo de los experimentos de tres celdas usando el mismo medio. La celda 1 (control) no contaba con inóculo. A la celda 2 se le adicionó inóculo en ambas cámaras; mientras que, a la celda 3 se le adicionó inóculo sólo en la cámara anódica.

Voltaje en CCM:

La medición se hace con multímetro cada dos horas para luego graficar la tendencia de la corriente generada a través del tiempo.

Densidad de Potencia en CCM:

$$DP = \frac{(V_{Gen})^2}{R * A} \dots (1)$$

Donde:

DP = Densidad de Potencia (W/m²)

V_{Gen} = Voltaje generado en (V), teniendo los datos en mV

R = Resistencia externa (Ohmios), siendo la escogida 5.6 Kohms

$A = \text{Área del electrodo (m}^2\text{)}, \text{ teniendo cada uno de estos } 1 \text{ cm}^2$

Energía en CCM:

De las grafica del comportamiento del voltaje a través del tiempo, se obtiene que los picos de densidad de potencia.

Luego, se procede a calcular el área bajo la curva de las gráficas obtenidas y con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides se tendrá como resultado el total de energía generada por las bacterias.

Se considera el área del electrodo 1cm^2 y como $1\text{W}*\text{H}$ equivale a 3600 J, se obtiene el siguiente factor de conversión:

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

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada.

3.8 Procesamiento de Datos de la Investigación

Multímetro: Para la medición de voltaje generado en cada celda se conecta el cable del multímetro al cocodrilo que sostiene la resistencia de la celda con el electrodo, como está descrito en la sección del ensamblaje de la celda.

Microsoft Excel: Esta herramienta ofimática permitirá la recolección y análisis de datos para graficar la tendencia del voltaje a través del tiempo.

MatLab: Esta herramienta de software matemático será usado con el algoritmo que se emplea para hallar la densidad de potencia y la energía producida en la celda a partir de los datos ingresados haciendo uso del entorno de simulación en matlab y mostrándose imágenes que resultan de cada algoritmo.

CAPITULO IV

ORGANIZACIÓN, PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Presentación de Resultados

4.1.1 Resultados parciales.

4.1.1.1 Selección de microorganismos.

De las cepas sembradas en medio líquido Feo y medio líquido TK/Tio-Fe, se seleccionaron las que mostraron crecimiento bacteriano. Los medios líquido Feo y TK/Tio-Fe tienen un color transparente o blanco traslúcido inicialmente por lo que se midió el crecimiento bacteriano considerando la oxidación del ión ferroso (Román,2017).

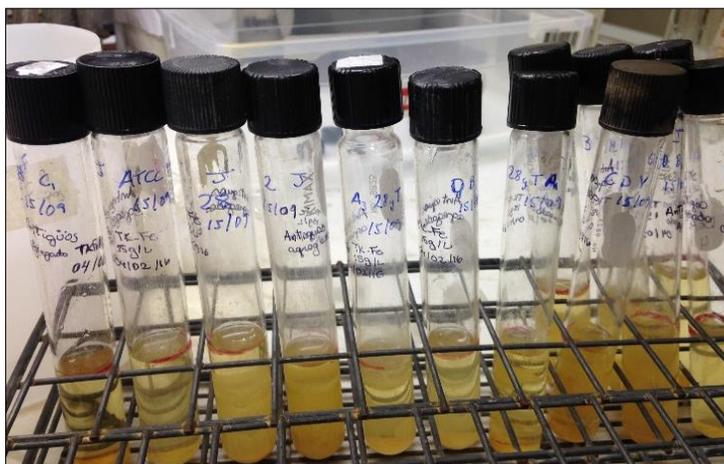


Figura 9. Cepas oxidantes en tubos. En esta imagen se muestra a varias cepas que fueron probadas en medios de cultivo oxidantes como Feo y TK (descritos en la tabla N°1 y N°3) demostrando su capacidad oxidativa en medios con presencia de hierro ferroso.

Si la cepa oxida el ión ferroso, el medio se torna de color naranja traslúcido como se muestra en las figuras N°9 y N°10.

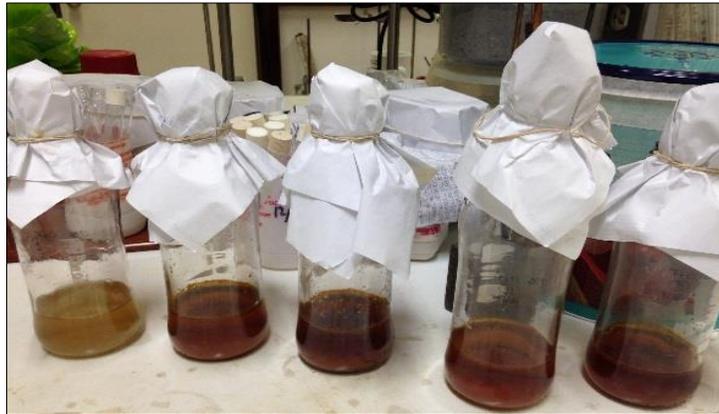


Figura 10. Cepas oxidantes en botellas. Las cepas con capacidad oxidativa se van probando en botellas para demostrar su capacidad de oxidación de ferroso en mayores volúmenes de medio.

Las cepas 102, 107.2, 226, 311 y 312 son seleccionadas por tener capacidad oxidativa como se nota en la figura N°11.

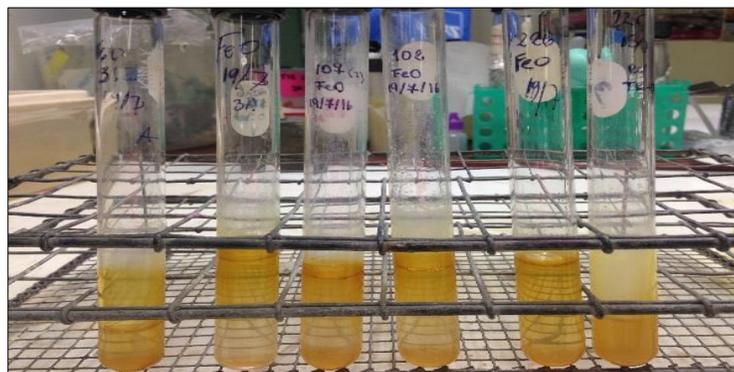
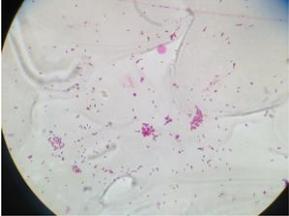
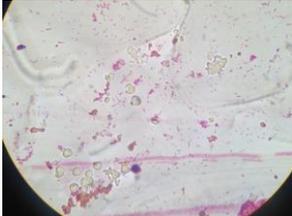
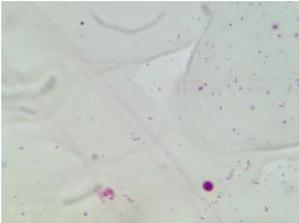
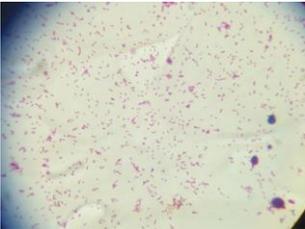
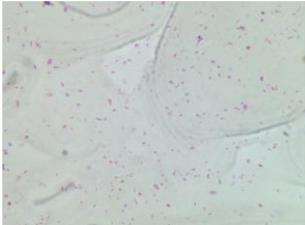


Figura 11. Cepas oxidantes seleccionadas. Después de varias pruebas, se ha logrado seleccionar a las seis cepas con las que se va a trabajar. De derecha a izquierda: Cepa 226, 102, 107.2, 311 y 312.

A las cepas seleccionadas se les realiza coloración Gram para observarlas en el microscopio como se observa en la tabla N°8.

Tabla 8

Vista al microscopio de cepas seleccionadas.

Cepa	Descripción	Fotos
311	Gram: Abundantes bacilos (-)	
312	Gram: Abundantes bacilos (-)	
107(2)	Gram: Algunos bacilos (-) medianos	
102	Gram: Abundantes bacilos(-) medianos	
226	Gram: Algunos bacilos	

Nota de la Tabla 8: Para corroborar un crecimiento bacteriano libre de hongos, se hace una tinción gram y se elabora esta tabla que describe la cantidad de población de bacterias en una pequeña muestra observada al microscopio.

Las cepas seleccionadas son sembradas en medio Feo sólido que inicialmente es de color blanquecino. Se logra ver colonias de color naranjas marrones de forma amorfa a lo largo del agar demostrando su capacidad de oxidación del hierro ferroso en la figura N°12.

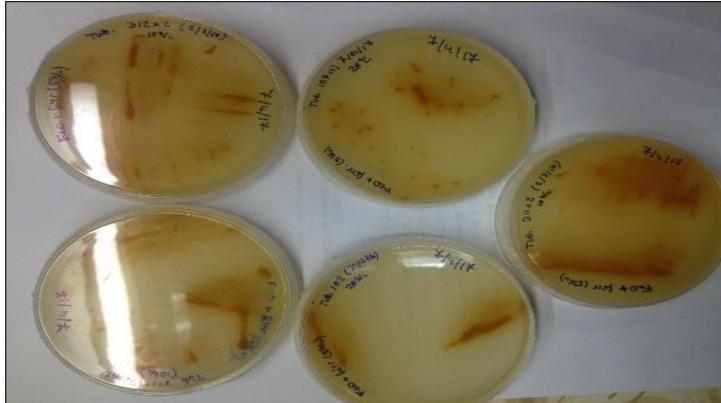


Figura 12. Cepas oxidantes seleccionadas. Se esperó el crecimiento de las cepas en medio sólido porque es un medio de aislamiento más difícil; sin embargo, aún se notó un crecimiento de cepas oxidantes.

La cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* 102 fue elegida para preparar la solución férrica debido a que fue la cepa que en menor tiempo lograba oxidar el ión ferroso.

Las cepas seleccionadas que lograron oxidar hierro ferroso fueron desarrolladas en medio líquido Feo+Fe⁺³ y se eligieron las que lograron reducir el ión férrico. El medio Feo+Fe⁺³ tiene un color anaranjado tenue inicialmente por lo que se midió el crecimiento bacteriano considerando la

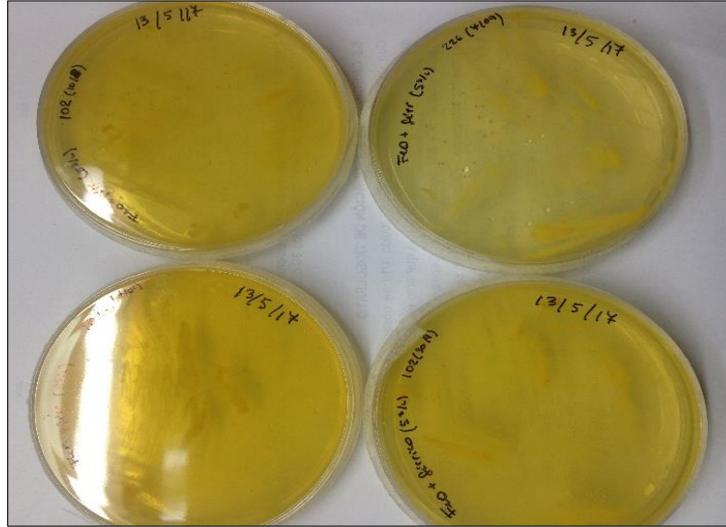


Figura 14. Cepas reductoras seleccionadas en medio sólido. A diferencia de las cepas oxidantes, éstas cepas logran reducir el hierro férrico presente en el medio sólido y se nota por su crecimiento bacteriano de color blanquecino a diferencia del naranja del medio oxidante.

Para las pruebas en las CCM, se seleccionaron las cepas con crecimiento aeróbico para el cátodo y las cepas con crecimiento en condiciones anaeróbicas para el ánodo.

4.1.1.2 Celda de combustible microbiana (CCM).

Desarrollo de experimentos en CCM:

Las celdas son monitoreadas con multímetros para medir el voltaje generado como se ve en la figura N°15.

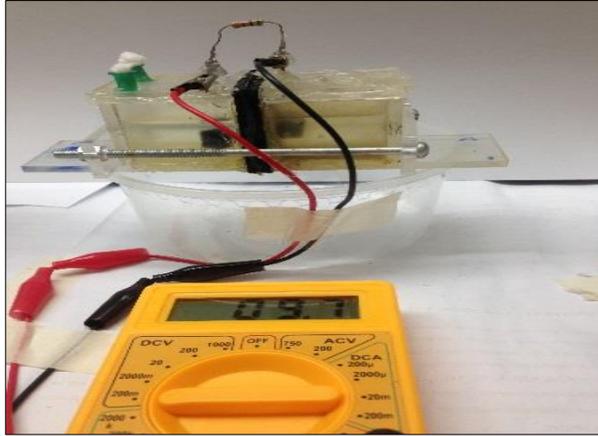


Figura 15. Experimento en celda microbiana de combustible. Se observa una celda armada y conectada a un multímetro para empezar la medición de voltaje cada dos horas.

Voltaje en CCM:

El experimento 1 se mantuvo con el inóculo inicial (8ml) y fue monitoreado por quince días con la medición de voltaje cada dos horas (Tabla N°9).

Tabla 9

Experimento 1 en CCM con número de horas

Exp.	CCM	Cable de electrodo	Anodo (22ml)	Inoculo (8ml)	Catodo (22 ml)	Inoculo (8ml)	# días/horas
Celda 1	Control-sin inóculo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	-----	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----	598.74
Celda 2	Inóculo en cátodo y ánodo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	311+31 2+107. 2	598.74
Celda 3	Inóculo sólo en ánodo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----	598.74

Nota de la Tabla 9: Es una tabla resumen de las condiciones en las que se desarrolló el experimento 1 y las horas de monitoreo.

El voltaje medido fue graficado en relación del tiempo, notándose el descenso del voltaje (Fig. N°16). Sin embargo, es notoria la mayor cantidad de voltaje producida en la celda con inóculo en ambas cámaras, seguido por la celda con inóculo sólo en el ánodo. El voltaje de la celda control, rápidamente tiende a disminuir y mantenerse en niveles casi nulos.

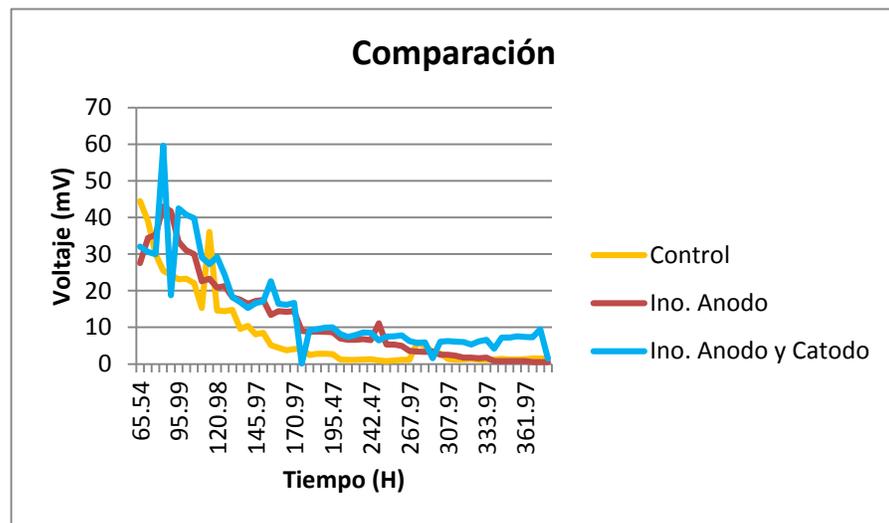


Figura 16. Comparación de voltaje generado por las celdas en el experimento 1. Es una gráfica voltaje vs tiempo en la que se ve a partir de las 70 horas de corrido el experimento, las celdas tienen la tendencia de disminuir su producción de voltaje a través del tiempo. No obstante, se nota que hay una producción mayor de voltaje en la celda con inóculo en ambos lados de la celda (línea celeste), seguido por la celda con inóculo en el ánodo (línea roja) y la rápida disminución de producción de voltaje en la celda control (línea amarilla) conforme pasa el tiempo.

En el experimento 2, la celda tuvo un ingreso de un inóculo inicial (15 ml) y dos reingresos de inóculo que fueron monitoreados por diecinueve días con la medición de voltaje cada 2 horas (Tabla N°10).

Tabla 10

Experimento 2 en CCM con número de horas.

Exp. 2	CCM	Cable de electrodo	Anodo	Inoculo (15ml)	Catodo	Inoculo (15ml)	# días/h oras
Celda 1	Control- sin inóculo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	-----	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----	523.1
Celda 2	Inóculo en cátodo y ánodo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + Cepa 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	311+31 2+107. 2	523.1
Celda 3	Inóculo sólo en ánodo	platino	Tk /Tio + Fe pH3.3	Cepa 311 + Cepa 226	Fe0 + fe3+ pH 3.5	-----	523.1

Nota de la Tabla 10: Es una tabla resumen de las condiciones en las que se desarrolló el experimento 2 y las horas de monitoreo.

El voltaje medido fue graficado en relación del tiempo, notándose el descenso del voltaje (Fig. 17). La mayor cantidad de voltaje producida en la celda con inóculo en ambas cámara es seguido por la celda con inóculo sólo en el ánodo. El voltaje de la celda control, rápidamente tiende a disminuir y mantenerse en niveles casi nulos.

Este comportamiento se repite con cada reingreso de inóculo, notándose los picos de elevación de voltaje.

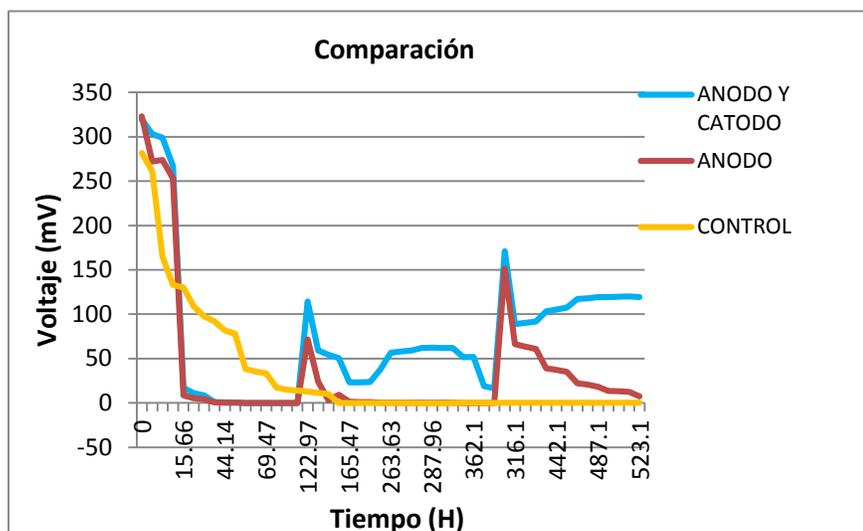


Figura 17. Comparación de voltaje generado por las celdas. Es una gráfica voltaje vs tiempo en la que se ve a partir de las 0 horas de corrido el experimento, las celdas tienen la tendencia de disminuir su producción de voltaje a través del tiempo. Se hicieron dos reingresos de inóculo a las 123 horas aproximadamente y a las 316 horas de corrido el experimento, notándose que nuevamente es la celda con presencia de cepas bacterianas en ambos lados de la celda la que genera más producción de energía (línea celeste), seguido por la celda con bacterias en un solo lugar (línea roja) y la celda control (línea amarilla) que a partir de 50 horas de corrido el experimento, mantiene su descenso hasta llegar a cero.

4.1.2.2 Densidad de Potencia en CCM.

En el experimento 1 que está descrito en la tabla N°8, se hizo uso del programa de procesamiento Matlab para mapear las curvas y calcular los valores necesarios.

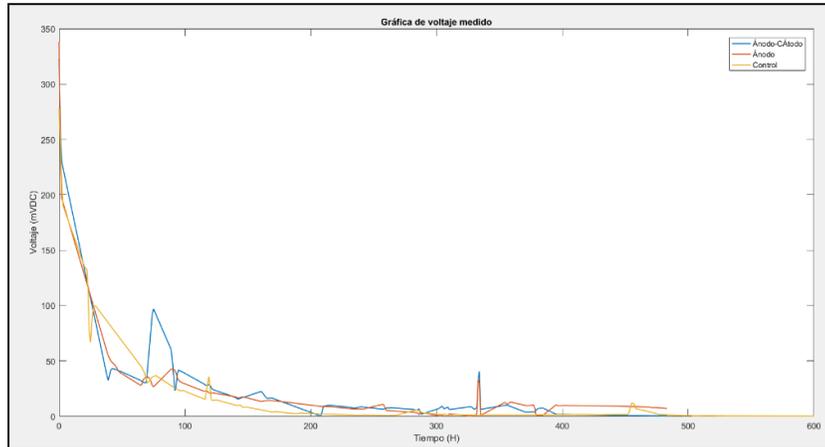


Figura 18. Comparación de voltaje medido en las celdas - Experimento 1. Se observa el comportamiento del voltaje vs tiempo del experimento 1 con los datos ingresados al programa Matlab desde el tiempo cero.

Para una mejor observación de los datos se realiza un acercamiento a la zona pasadas las 40 horas.

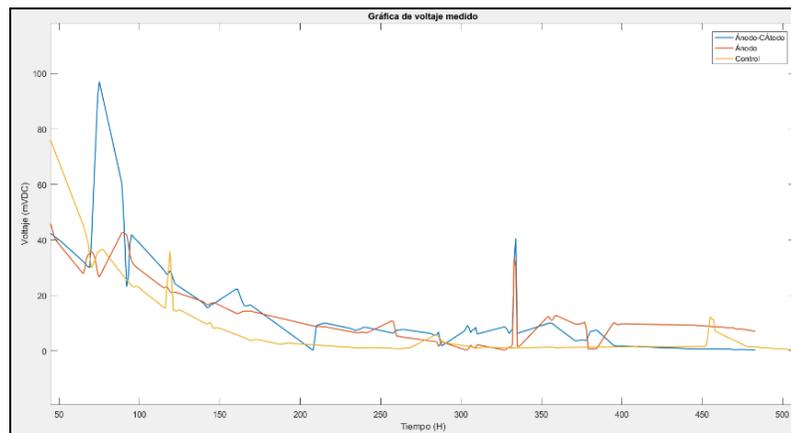


Figura 19. Comparación de voltaje medido en las celdas pasadas las 40 horas - Experimento 1. Se observa el comportamiento del voltaje vs tiempo del experimento 1 de los datos ingresados al programa Matlab pasadas las primeras 40 horas

En base a los datos obtenidos de la figura N° 19, se calcula la corriente generada por las celdas en comparación con la celda de control y se obtiene los datos de la figura N°20.

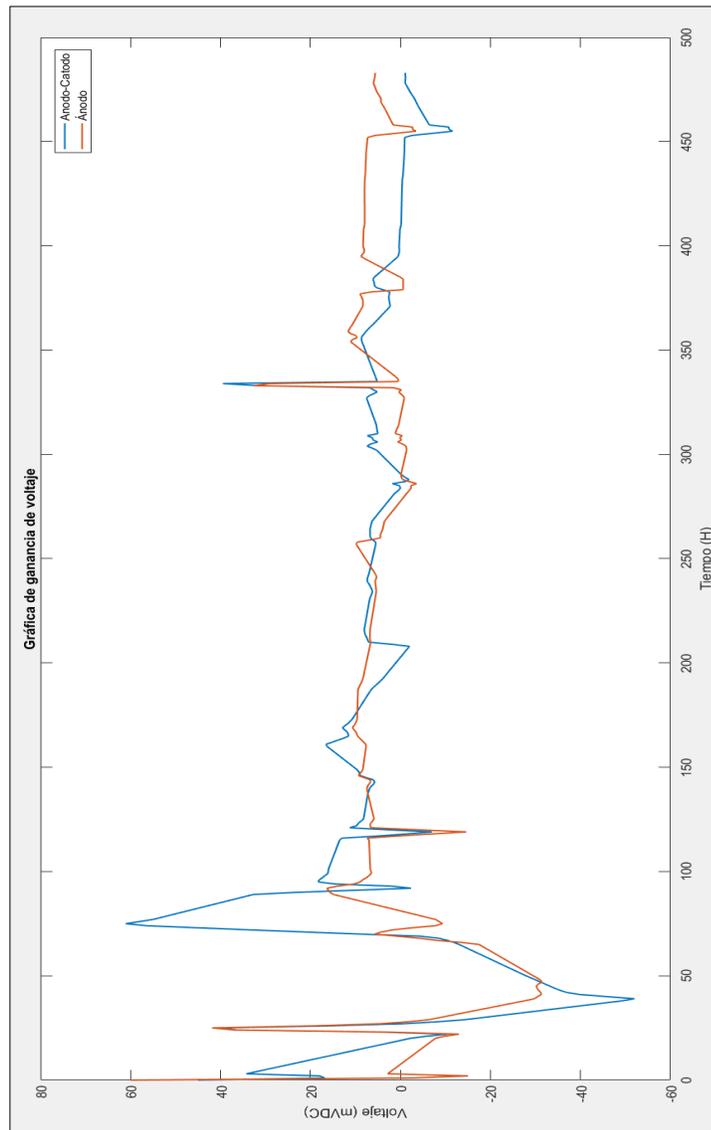


Figura 20. Gráfica de ganancia de voltaje– Experimento 1. Se observa la ganancia de voltaje de la celda con inóculo en ambos lados (línea celeste) y de la celda con inóculo en el ánodo (línea roja) tomando como referencia base el voltaje producido por la celda control.

Con estos valores se calcula la densidad de potencia con la fórmula (1):

$$DP = \frac{(V_{Gen})^2}{R \cdot A} \dots (1)$$

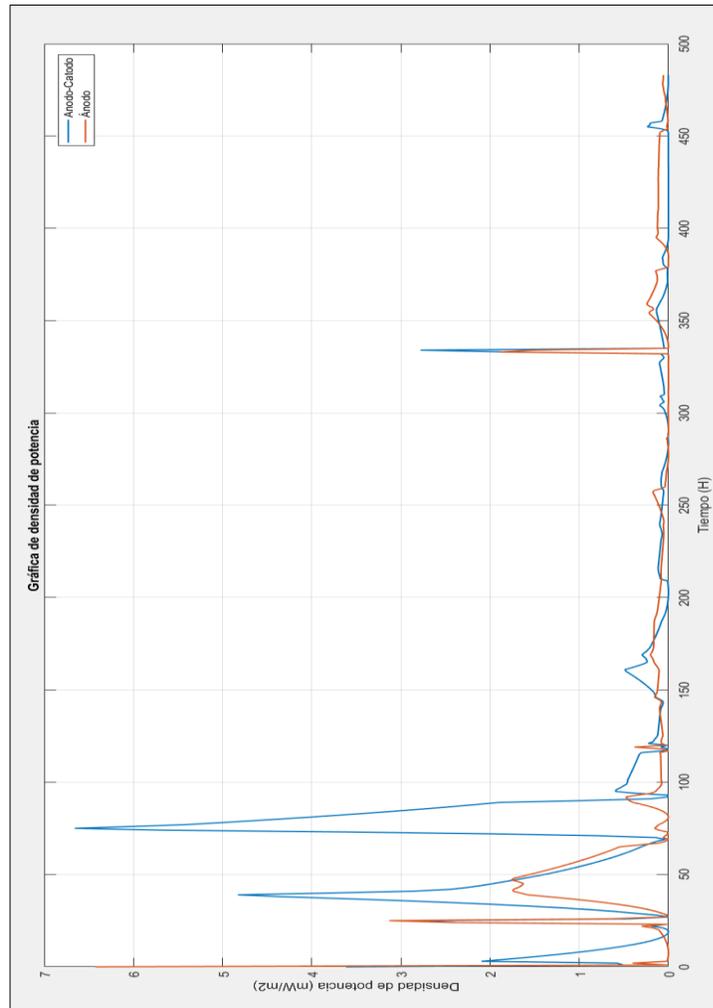


Figura 21. Gráfica de densidad de potencia. A partir de la fórmula de densidad de potencia, una vez ingresada en el Matlab se logra obtener un gráfico de los puntos de densidad de potencia de la celda con bacterias en ambos lados (línea celeste) y la celda con bacterias sólo en el ánodo (línea roja).

En el programa Matlab se muestran los picos de densidad de potencia y se corroboran en la figura N°21.

En Ánodo-Cátodo de MFC: 6.65 mW/m²

En Ánodo de MFC: 3.13 mW/m²

En el experimento 2 que está descrito en la tabla N°9 también se usó el programa de procesamiento Matlab para mapear las curvas y calcular los valores necesarios, obteniéndose la comparación de los voltajes medidos en las celdas como se ve en la figura N°22.

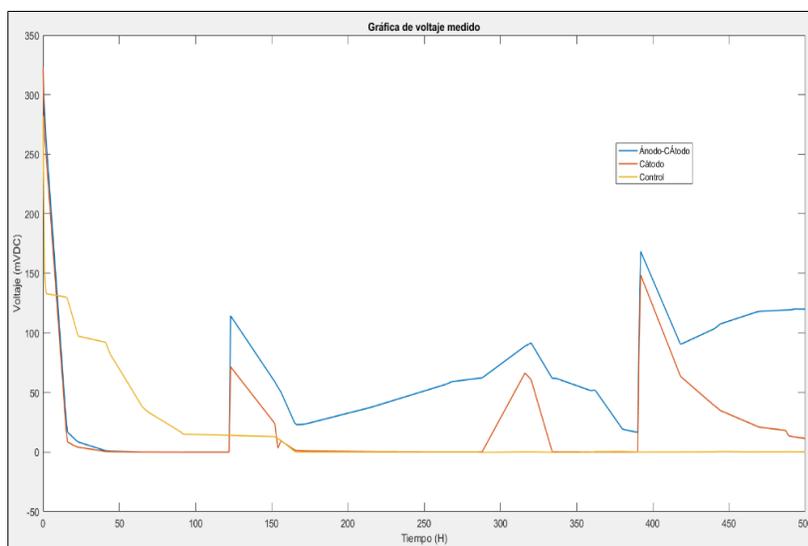


Figura 22. . Comparación de voltaje medido en las celdas – Experimento 2. Es una gráfica voltaje vs tiempo, las celdas tienen la tendencia de disminuir su producción de voltaje a través del tiempo. Sin embargo, pasadas las 100 horas y aproximadamente las 400 horas hay un reingreso de inóculo que permite observar una producción mayor de voltaje en la celda con inóculo en ambos lados de la celda (línea celeste), seguido por la celda con inóculo en el ánodo (línea roja) y la rápida disminución de producción de voltaje en la celda control (línea amarilla) en cada reingreso de inóculo.

Basándonos en estos resultados se calculó la corriente generada por las celdas en comparación con la celda de control.

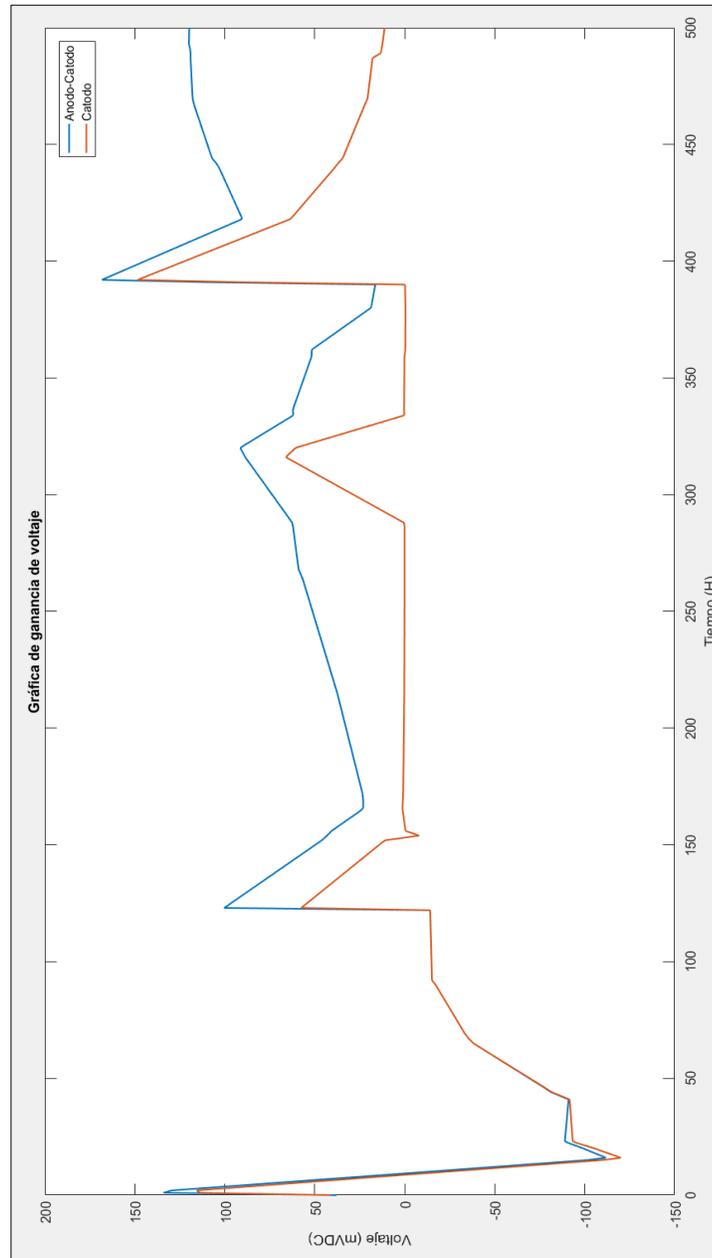


Figura 23. Gráfica de ganancia de voltaje – Experimento 2. Se observa la ganancia de voltaje de la celda con inóculo en ambos lados (línea celeste) y de la celda con inóculo en el ánodo (línea roja) tomando como referencia base el voltaje producido por la celda control.

Con estos valores se calcula la densidad de potencia con la fórmula

$$(1)DP = \frac{(V_{Gen})^2}{R * A} \dots\dots(1)$$

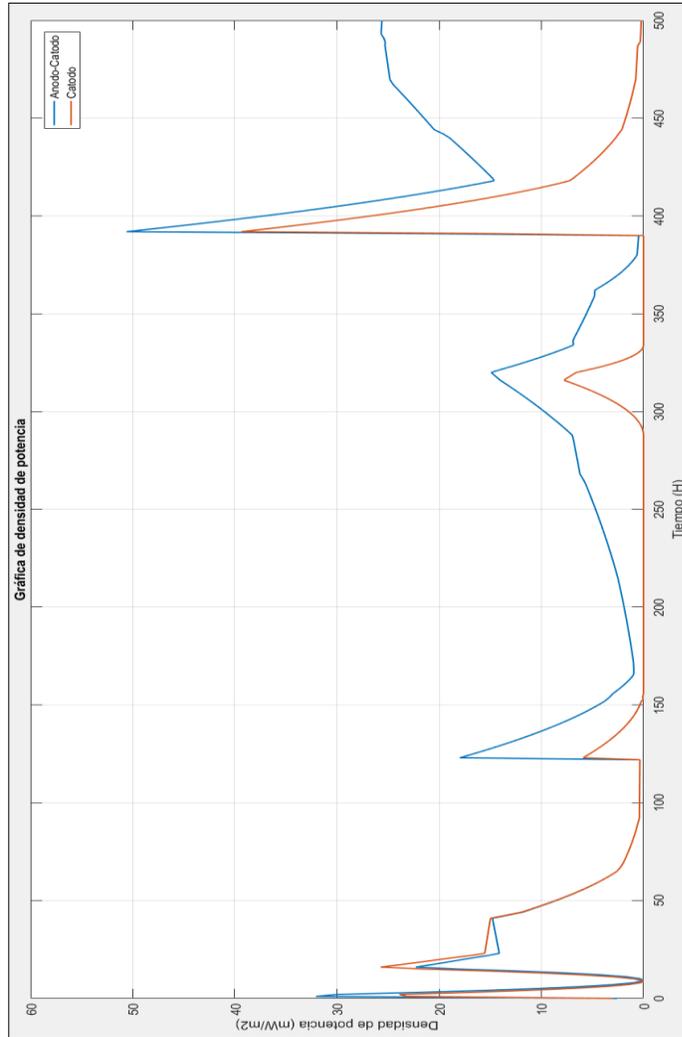


Figura 24. Gráfica de densidad de potencia– Experimento 2. A partir de la fórmula de densidad de potencia, una vez ingresada en el Matlab se logra obtener un gráfico de los puntos de densidad de potencia de la celda con bacterias en ambos lados (línea celeste) y la celda con bacterias sólo en el ánodo (línea roja).

En el programa Matlab se muestran los picos de densidad de potencia y se corroboran en la figura N°24.

MFC en Ánodo-Cátodo: 50.6 mW/m²

MFC en Cátodo: 37.65 mW/m²

4.1.2.3 Energía en CCM.

En el experimento 1 descrito en la tabla N° 7 se procede a calcular el área bajo la curva de las gráficas obtenidas (Fig. N°21) y con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapecoides se tendrá como resultado el total de energía generada por las bacterias.

En Ánodo-Cátodo de MFC: 193.36 mW.H/m²

En Ánodo de MFC: 90.15mW.H/m²

Si consideramos el área del electrodo 1cm² y como 1W*H equivale a 3600 J, se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW*H/m}^2 = 3600/107 \text{ J} \dots\dots(2)$$

Con este factor de conversión (2) podemos expresar la energía generada como:

En Ánodo-Cátodo de MFC: 70 mJ

En Ánodo de MFC: 32.5 mJ

En el experimento 2 descrito en la tabla N°8 se procede a calcular el área bajo la curva de las gráficas obtenidas (Fig.N°23) y con procedimientos que convierten secciones entre puntos en trapezoides, teniendo como resultado el total de energía generada por las bacterias:

En Ánodo-Cátodo de MFC: 4902.4 mW.H/m²

En Ánodo de MFC: 1764.2 mW.H/m²

Si consideramos el área del electrodo 1cm² y como 1W*H equivale a 3600 J, se obtiene el siguiente factor de conversión:

$$1 \text{ mW*H/m}^2 = 3600/107 \text{ J} \dots\dots(2)$$

Con este factor de conversión podemos expresar la energía generada como:

En Ánodo-Cátodo de MFC: 1.76 J

En Ánodo de MFC: 0.64 J

4.1.2 Resultados generales.

Se realizaron dos experimentos que se enfocaron en evaluar el comportamiento de cinco cepas de bacterias como productoras de energía, como se detalla en los resultados. En el experimento uno se logra una producción de energía de 0,07J en el caso de la celda que funciona con bacterias en ambas cámaras de la celda y una

producción de 0,03 J en la celda que funciona con bacterias sólo en el ánodo. En el experimento dos, la celda que funciona con bacterias en ambas cámaras logra una producción de energía de 1.76 J y la celda con bacterias en una sola cámara, logra una producción de energía de 0,64 J.

El primer experimento sólo logra una producción de energía menor al 5% de la energía generada por el segundo experimento. Si bien en ambos experimentos se usaron las mismas cepas y el mismo medio; se debe decir que la reinsertación de inóculo de bacterias (en el experimento dos) parece ser lo que produjo la diferencia en la cantidad de energía producida. Se podría considerar también el volumen de inóculo usado en ambos experimentos, en el experimento uno se usó la mitad del volumen de medio en cada celda. Y también los quince días de monitoreo de la celda uno fueron menos que los diecinueve de la celda dos.

4.3 Discusión de Resultados

Este trabajo ha contado con varias condiciones que no han podido ser controladas, sin embargo se llevó a cabo el experimento mostrando una tendencia que respaldaba con resultados similares a otros trabajos.

Es importante considerar que las cepas han actuado como oxidantes y reductoras a la vez; es decir, que en condiciones anaeróbicas oxidaron el hierro ferroso presente y en condiciones aeróbicas, redujeron el hierro férrico. Esto facilitó el transporte de electrones desde el ánodo hacia el cátodo notándose que hay una mayor lectura de voltaje en el caso

donde actuaban bacterias oxidando y reduciendo que en el caso donde sólo se encontraban oxidando.

La cantidad de inóculo, aunque no se logró medir de manera exacta la cantidad de bacterias ingresadas, tuvo un impacto en la producción de energía, notándose una mayor energía producida en el caso donde se agregó mayor cantidad en volumen de inóculo ingresado.

Las cepas 102,107.2, 311, 312 y 226 son capaces de oxidar y reducir Hierro.

Las cepas seleccionadas fueron capaces de producir 0.07J en 15 días de funcionamiento.

La generación de energía pudo ser repetida al agregarse inóculo y solución al sistema. Y se llegó a producir 1.76 J en 19 días agregando dos veces inóculo.

La construcción de celdas de combustible microbiana (CCM) y la capacidad del inóculo seleccionado de cinco cepas bacterianas, podría significar un impacto positivo en alternativas de fuentes de energía como la producción de electricidad.

CONCLUSIONES

- Se logró determinar la producción de energía en celdas microbianas de combustible usando bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro.
- Se seleccionó microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y reducir hierro férrico.
- Se diseñó y construyó una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio.
- Se trabajó con las bacterias seleccionadas en CMC diseñada y construida en el laboratorio.
- Se midió en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas.
- Se logró determinar el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.
- Se logró determinar el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.
- Se calculó la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.
- Se calculó la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.

RECOMENDACIONES

- Es necesario seguir realizando investigaciones en este campo y seguir revisando la literatura disponible acerca de los estudios actuales en celdas microbianas de energía.

BIBLIOGRAFÍA

- Bennetto, H., Stirling, J., Tanaka, K., y Vega, C. (1983). Anodic reactions in microbial fuel cells. *Biotechnology And Bioengineering*, 25(2), 559-568.
- Boletín Estadístico Mensual Eléctrico por SNMPE. (2017). *Demanda de generación de energía en el mes de noviembre del 2017*. [Gráfico]. Recuperado de <http://www.snmpe.org.pe>
- Boletín Estadístico Mensual Eléctrico por SNMPE. (2017). *Fuentes de energía en el mes de noviembre del 2017*. [Gráfico]. Recuperado de <http://www.snmpe.org.pe>
- Boletín Estadístico Mensual Eléctrico por SNMPE. (2017). *Porcentaje de consumo de tipos de energía a nivel mundial en el año 2017* [Gráfico]. Recuperado de <http://www.snmpe.org.pe>
- Carrette, L., Friedrich, K.A y Stimming, U. (2001). Fuel Cells. *Fundamentals and Applications* pp. 5-39
- Ciardi, M. (2001). Voltiana Alessandro Volta, On the Electricity excited by the mere Contact of conducting Substances of different kinds. *Bicentenary Edition in French, English, German and Italian of the Letter to Sir Joseph Banks* of the 20th of March 2000.
- Colmer, A., Temple, K. y Hinkle, M. (1950) An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J Bacteriol*, 59(3), 317–328.
- Cuentas-Gallegos, A., Palacín, M., Colomer, M., Jurado, J. y Gómez-Romero, P. (2002). Estudios de materiales de cátodos híbridos y ánodos vítreos. Caracterización en celdas de ion litio. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 41(1), pp.115-121.

- Gómez-Biedma, S., Soria, E., y Vivó, M.(2002). Análisis electroquímico. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(1), 18-27
- Johnson, D. B., y McGinness, S. (1991). Ferric Iron Reduction by Acidophilic Heterotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 207–211.
- Johnson, D. (1995). Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 23(2), pp.205-218.
- Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., y Suzuki, S. (1976). Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 444(2), 338-343.
- Kaygusuz, K. (2002). Renewable Energy Sources: The Key to a Better Future. *Energy Sources*, 24(8), pp.787-799.
- Kurzweil, P. (2010). Gaston Planté and his invention of the lead–acid battery—The genesis of the first practical rechargeable battery. *Journal of Power Sources*, 195(14), 4424-4434
- Lee, J., Logan, A., Terry, S., y Spear, J. (2014). Microbial response to single-cell protein production and brewery wastewater treatment. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 65-76.
- Motovalli, Jim (2004, 20 de julio). Power plays. The environmental magazine. Recuperado de <https://emagazine.com/power-plays/>

- O'Malley, C. (1956). Commentary on the Effect of Electricity on Muscular Motion. A Translation of De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. Luigi Galvani , Robert Montraville Green. *Isis*, 47(4), 454-455.
- Poddar, S., & Khurana, S. (2011). Geobacter: The Electric Microbe! Efficient Microbial Fuel Cells to Generate Clean, Cheap Electricity. *Indian Journal of Microbiology*, 51(2), 240–241. doi:10.1007/s12088-011-0180-8
- Pradhan, N., Nathsarma, K., Srinivasa, Rao, K., Sukla, L. y Mishra, B. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering*. 2008; (21): 355-365.
- Roach, J., (2004). “Rust-Breathing Bacteria: Miracle” Microbes”, *National Geographic News*, pp. 1–7.
- Rodyou, K., Rengpipat, S. y Sriyudthsak, M. (2017). Screening and Selection of Ferric Reducing Bacteria by Electrical Current for Microbial Fuel Cell. *Engineering Journal*, 21(5), pp.25-35.
- Román, B. (2017). *Estudio de bacterias acidófilas ferroxidantes presentes en mineral magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracotay agua de mina de cobre de Quiruvilca*. (Tesis de pregrado) Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
- Song, H., Zhu, Y., y Li, J. (2015). Electron transfer mechanisms, characteristics and applications of biological cathode microbial fuel cells – A mini review. *Arabian Journal Of Chemistry*. *Grove fuel cell symposium in London*. (2003). *Refocus*, 4(3), 11.

Staffan, J. y Volkmar L. (2006). The politics and policy of energy system transformation- explaining the German diffusion of renewable energy technology. *Energy Policy* 34, 256-276.

Tuovinen, O. y Kelly, D. (1973). Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Mikrobiologie*, 88(4), pp.285-298.

ANEXOS

MATRIZ DE OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA	TECNICAS	INSTRUMENTOS
<p><u>Variable independiente:</u></p> <p>Capacidad bacteriana de óxido-reducción de TK-Fe.</p>	<p><u>Biológica:</u> Oxidación y reducción del TK-Fe a partir del uso de bacterias.</p> <p><u>Física:</u> Medición de cantidad de energía transportada por unidad de carga eléctrica.</p>	<p>- Colonias crecidas.</p> <p>-Voltaje medido</p>	<p>-UFC</p> <p>-Voltios</p>	<p>-Conteo de placas.</p> <p>-Lectura de voltaje</p>	<p>-Microscopio</p> <p>-Voltímetro</p>
<p><u>Variable dependiente:</u></p> <p>Energía total de la celda</p>	<p><u>Física:</u> Medición de área bajo la curva de los picos de densidad de potencia.</p>	<p>-Cálculo del área bajo la curva.</p>	<p>-Joules</p>	<p>-Algoritmos matemáticos</p>	<p>-Matlab</p>

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
<p><u>Problema general:</u></p> <p>¿Se puede determinar la producción de energía en celdas microbianas de combustible usando bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro?</p> <p><u>Problema específicos:</u></p> <p>1. ¿Se puede seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico?</p> <p>2. ¿Se puede diseñar y construir una celda microbiana (CMC) de combustible en el laboratorio?</p>	<p><u>Objetivo general:</u></p> <p>Determinar la producción de energía en celdas microbianas de combustible usando bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro.</p> <p><u>Objetivos específicos:</u></p> <p>1. Seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico.</p> <p>2. Diseñar y construir una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio.</p>	<p><u>Hipótesis general:</u></p> <p>Las bacterias con capacidad de oxidar y reducir hierro tienen capacidad de producir energía en celdas microbianas de combustible.</p> <p><u>Hipótesis específicas:</u></p> <p>1. Es posible seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar hierro ferroso y de reducir hierro férrico.</p> <p>2. Es posible diseñar y construir una celda microbiana de combustible (CMC) en el laboratorio.</p>	<p><u>Variable independiente:</u></p> <p>Capacidad bacteriana de oxidación-reducción de TK-Fe.</p> <p>Indicadores:</p> <p>- Colonias crecidas</p> <p>- Voltaje medido</p> <p><u>Variable dependiente:</u></p> <p>Energía total de la celda.</p> <p>Indicadores:</p>	<p><u>Tipo de investigación:</u></p> <p>Aplicada</p> <p><u>Nivel de investigación:</u></p> <p>Correlacional</p> <p><u>Método de investigación:</u></p> <p>Experimental</p> <p>Esta investigación se ha organizado de la siguiente manera:</p> <p>- Selección de microorganismos</p> <p>Construcción de celda microbiana de combustible</p> <p>Desarrollo de experimentos con grupos control.</p> <p><u>Diseño de investigación:</u></p>

<p>3. ¿Se puede trabajar con las bacterias seleccionadas en la CMC diseñada y construida en el laboratorio?</p> <p>4. ¿Se puede medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas?</p> <p>5. ¿Cuál es el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC?</p> <p>6. ¿Cuál es el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC?</p> <p>7. ¿Se puede calcular la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC a partir del</p>	<p>3. Trabajar con las bacterias seleccionadas en CMC diseñada y construida en el laboratorio.</p> <p>4. Medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas.</p> <p>5. Determinar el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.</p> <p>6. Determinar el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.</p> <p>7. Calcular la densidad de potencia generada por las bacterias en la CMC</p>	<p>3. Es posible trabajar con las bacterias seleccionadas en CMC diseñada y construida en el laboratorio.</p> <p>4. Es posible medir en la CMC el voltaje producido por las bacterias seleccionadas.</p> <p>5. Es posible determinar el efecto de la cantidad de volumen de inóculo de bacterias ingresado en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.</p> <p>6. Es posible determinar el efecto de la doble adición de inóculo de bacterias en la CMC sobre la cantidad de voltaje medido en la CMC.</p> <p>7. Es posible calcular la densidad de potencia generada por</p>	<p>-Cálculo del área bajo la curva.</p>	<p>Cuasi experimental</p> <p>Grupo experimental y Control</p> <p>(A) X O₁</p> <p>(A) - O₂</p> <p>(A):Asignación no controlada</p> <p>X: Tratamiento</p> <p>O_n: Observaciones</p> <p><u>Población:</u></p> <p>Cultivos del banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología ambiental de la UPCH.</p> <p><u>Muestra:</u></p> <p>5 cepas de Acidithiobacillus ferrooxidans de los cultivos de muestras de mineral. Las cepas seleccionadas fueron la 102, 226, 311, 312 y la 107.2.</p> <p><u>Técnicas:</u></p> <p>- Preparación de medios.</p>
--	--	---	---	---

<p>voltaje producido en la CMC?</p> <p>8. ¿Se puede calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC?</p>	<p>a partir del voltaje producido en la CMC.</p> <p>8. Calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.</p>	<p>las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.</p> <p>8. Es posible calcular la energía total generada por las bacterias en la CMC a partir del voltaje producido en la CMC.</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Selección de microorganismos. - Diseño y construcción de celda microbiana de combustible. -Conteo de placas. -Lectura de voltaje -Algoritmos matemáticos -Graficas <p><u>Instrumentos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - pHmetro - Microscopio - Voltímetro - Matlab - Microsoft Excel
--	---	--	--	---