

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**“IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PROVENIENTE DE  
RELAVES MINEROS QUE PERMITA LA GENERACIÓN DE ELECTRICIDAD  
EN UNA CCM.”**

**Tesis presentada por los Bachilleres:**

Rodríguez Rendón, Rina Lizbeth

Paredes Aranzamendi, Manuel Alfredo

**para optar el Título Profesional de:**

Ingeniero Biotecnólogo

**Asesor:**

Dr. Jiménez Pacheco, Hugo

**Arequipa – Perú**

**2019**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2019000001726

N° Trámite en Fac. 420-2019

Fecha Recep. Fac. 10-01-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **RODRIGUEZ RENDON, Rina Lizbeth**  
**PAREDES ARANZAMENDI, Manuel Alfredo**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"PRODUCCION DE BIOELECTRICIDAD MICROBIOLÓGICA A PARTIR DE RELAVES MINEROS  
Y EVALUACION DE LOS MICROORGANISMOS RESPONSABLES EN EL PROCESO"**

DICTAMINADORES: 1) *Dr. Fredy Molina Rodríguez* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por la recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, sugiriendo cambiar el título a: **"IDENTIFICACION DE UN CONSORCIO MICROBIANO PROVENIENTE DE RELAVES MINEROS QUE PERMITA LA GENERACION DE ELECTRICIDAD EN UNA CCM"** luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS

FECHA 21-03-19

ASESOR: *Dr. Hugo Jiménez Pacheco*

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMA

FECHA 09/08/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Ing. Cinthia Córdova Barrios* 3) *Mgter. Natalia López Álvarez*  
2) *Dr. Fredy Molina Rodríguez*

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

FECHA 10/10/2019

JURADOS: PRESIDENTE *ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS*  
VOCAL *DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ*  
SECRETARIO *MAG. NATALIA LOPEZ ALVAREZ*

FECHA 18/10/19 HORA 19.00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO

FECHA

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por estar siempre guiando mis pasos y dándome la motivación necesaria para seguir adelante.*

*A mi madre Nadia, mi “MAPA”, por su amor incondicional que me acompañó en el sueño de ser Ingeniera y no dejar que me rinda. A mi padre Alfredo y mis hermanos Alfredo y Giuliana, por apoyarme durante toda mi carrera y mi vida.*

*A, mi “Mamá Rina”, porque ella me impulsó y nunca dejó de creer en mí ni en lo grande que podía llegar a ser.*

*Además quiero agradecer a todas las personas que nos ayudaron a lograr que este trabajo de investigación llegue a consumar: El grupo de investigación INNOVERGY, en especial a Douglas, Giuliana, Frank; a mi amiga Carolina y María Fernanda por ayudarme con el diseño y ajeteo de la tesis; a Ignacio por enseñarme todo lo que necesitaba saber sobre electricidad, y todos los demás que nos apoyaron en diversas fases del trabajo.*

### **Rina**

*A Dios: por permitirme tener la fuerza para terminar mi carrera.*

*A mis padres Marleni y Alex por su esfuerzo en concederme la oportunidad de estudiar y por su constante apoyo a lo largo de mi vida. A Mirian Aranzamendi Fernández por el apoyo constante e incondicional en mi vida.*

*A mis hermanos, parientes y amigos: por sus consejos, paciencia y toda la ayuda que me brindaron para concluir mis estudios.*

*A una persona especial que siempre está a mi lado, también a mi recordado padre Alfredo Aranzamendi Vera que desde el cielo me acompaña y que a pesar de no estar presente, sus enseñanzas y buenos ejemplos me ayudaron a conseguir este logro profesional.*

### **Manuel**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	II
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
RESUMEN .....	XI
ABSTRACT .....	XIII
INTRODUCCIÓN .....	XIV
OBJETIVO GENERAL .....	XVI
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	XVI
HIPÓTESIS .....	XVII
VARIABLES E INDICADORES .....	XVIII
DELIMITACIONES .....	XIX
CAPITULO I .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
<i>1.1. Sector energético a nivel nacional</i> .....	<i>1</i>
<i>1.2. Contaminación minera en el Perú</i> .....	<i>1</i>
<i>1.3. Microorganismos electrogénicos y su cinética de crecimiento en las celdas de combustible microbiana</i> .....	<i>3</i>
<i>1.4. Electricidad y corriente eléctrica</i> .....	<i>4</i>
<i>1.5. Celdas de combustible microbiana</i> .....	<i>5</i>
<u><i>1.5.1. Sistema bioelectroquímico</i></u> .....	<u><i>5</i></u>
<u><i>1.5.2. Principio de una celda de combustible microbiana</i></u> .....	<u><i>6</i></u>
<u><i>1.5.3. Diseño de una celda de combustible microbiana</i></u> .....	<u><i>7</i></u>
<u><i>1.5.4. Desempeño eléctrico de las celdas de combustible microbiana</i></u> .....	<u><i>8</i></u>
<i>1.6. Membranas en la producción energética</i> .....	<i>9</i>

1.7. <i>Electrodos</i> .....	11
<u>1.7.1. <i>Ánodo</i></u> .....	12
<u>1.7.2. <i>Cátodo</i></u> .....	13
1.8. <i>Sustratos en celda de combustible microbiana</i> .....	13
<b>CAPITULO II</b> .....	16
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
2.1. <i>Materiales</i> .....	16
<u>2.1.1. <i>Lugar de ejecución y recolección de muestra</i></u> .....	16
<u>2.1.2. <i>Vidrio</i></u> .....	16
<u>2.1.3. <i>Unidades biológicas</i></u> .....	16
<u>2.1.4. <i>Reactivos químicos y bioquímicos</i></u> .....	16
<u>2.1.5. <i>Instrumentación y equipos</i></u> .....	17
<u>2.1.6. <i>Otros</i></u> .....	18
2.2. <i>Metodología</i> .....	18
<u>2.2.1. <i>Recolección de muestra de relave minero</i></u> .....	18
<u>2.2.2. <i>Caracterización de la composición del relave minero</i></u> .....	20
<u>2.2.3. <i>Aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos presentes en el relave minero</i></u> .....	20
2.2.3.1. <i>Aislamiento de los microorganismos</i> .....	20
2.2.3.2. <i>Caracterización Macroscópica de los microorganismos del relave minero</i> 21	
2.2.3.3. <i>Caracterización Molecular de los microorganismos del relave minero</i> 22	
2.2.3.3.1. <i>Extracción del ADN bacteriano</i> .....	22
2.2.3.3.2. <i>Amplificación (PCR) de la región barcode para bacterias (16S) ....</i>	22
2.2.3.3.3. <i>Limpieza (Clean-Up) de amplicones</i> .....	24
2.2.3.3.4. <i>Secuenciamiento Sanger</i> .....	24
2.2.3.3.5. <i>Ensamblaje de secuencias y Blast</i> .....	25
<u>2.2.4. <i>Construcción y ejecución de las celdas</i></u> .....	25
2.2.4.1. <i>Construcción de la celda de combustible microbiana</i> .....	25
2.2.4.2. <i>Preparación del sustrato y el agua catódica</i> .....	27
2.2.4.3. <i>Preparación del electrodo</i> .....	27
2.2.4.4. <i>Membrana de Nafion 117</i> .....	28

2.2.4.5.	<i>Monitoreo de la ejecución de la celda de combustible microbiana.....</i>	28
2.2.4.5.1.	<i>Determinación de Voltaje e Intensidad .....</i>	29
2.2.4.5.2.	<i>Determinación de la potencia .....</i>	30
2.2.4.5.3.	<i>Determinación de densidad de potencia .....</i>	30
2.2.4.5.4.	<i>Determinación de densidad de corriente .....</i>	31
2.2.4.5.5.	<i>Determinación de la energía total producida.....</i>	31
2.2.4.6.	<i>Comparación de las características fisicoquímicas del relave minero antes y después de ser empleado en una celda de combustible microbiana. ....</i>	32
2.2.4.7.	<i>Análisis de resultados.....</i>	32
<b>CAPITULO III .....</b>		<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
3.1.	<i>Caracterización de la composición del relave minero .....</i>	33
3.2.	<i>Aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos presentes en el relave minero.....</i>	34
3.2.1.	<i><u>Caracterización Morfológica o Macroscópica de los microorganismos del relave minero .....</u></i>	34
3.2.2.	<i><u>Caracterización e Identificación Molecular de los microorganismos del relave minero .....</u></i>	37
3.2.2.1.	<i><u>Amplificación (PCR) de la región barcode para bacterias (16s) .....</u></i>	37
3.2.2.2.	<i><u>Secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa bacteriana .....</u></i>	39
3.2.2.3.	<i><u>Análisis bioinformático de la secuencia.....</u></i>	41
3.3.	<i>Construcción y ejecución de las celdas .....</i>	45
3.3.1.	<i><u>Sistema bioelectroquímico .....</u></i>	46
3.3.2.	<i><u>Evaluación de la generación de electricidad .....</u></i>	47
3.3.2.1.	<i><u>Determinación de voltaje .....</u></i>	47
3.3.2.2.	<i><u>Determinación de intensidad de corriente .....</u></i>	50
3.3.2.3.	<i><u>Determinación de la potencia .....</u></i>	52
3.3.2.4.	<i><u>Determinación de la densidad de la potencia .....</u></i>	54
3.3.2.5.	<i><u>Determinación de la densidad de corriente .....</u></i>	56
3.3.2.6.	<i><u>Determinación de la energía total producida .....</u></i>	58
3.3.3.	<i><u>Comparación de las características fisicoquímicas del relave minero antes y después de ser empleado en una celda de combustible microbiana. ....</u></i>	60
3.3.4.	<i><u>Análisis de resultados .....</u></i>	61

<b>CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	65
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	66
<b>ANEXOS</b> .....	74



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de un depósito de Relaves mineros (13).....	2
Figura 2. Desempeño de los microorganismos electrogénicos, donde el sustrato es metabolizado por bacterias, que transfieren los electrones ganados al ánodo (6).....	3
Figura 3. El principio de funcionamiento de una celda de combustible microbiana (5).....	6
Figura 4. Esquema de celda de combustible microbiana (MFC) tipo H (36).....	8
Figura 5. (A) Se muestra una vista simplificada de un MFC de dos cámaras. (B) MFC de una cámara con cátodo al aire libre (26). .....	10
Figura 6. Materiales de carbón tradicionalmente empleados como electrodos en CCM's (31). .....	12
Figura 7. Funcionamiento y Desempeño de una celda de combustible microbiana (CCM) (59). .....	15
Figura 8. Lodo activado proveniente de relave minero, obtenido de CEPROMET (Centro de Entrenamiento y procesos metalúrgicos. Minera PORVENIR S.A.C). .....	19
Figura 9. Recolección de muestra de lodo activado (relave minero) en el Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos de la Minera PORVENIR S.A.C.....	19
Figura 10. (De izquierda a derecha) Muestra sin tratamiento, primera disolución con Tween 80, primera disolución con Tween 80, segunda disolución con Tween 80 y segunda muestra sin tratamiento. ....	21
Figura 11. Rotulación y envío de muestras de microorganismos en agar nutritivos a la empresa BioAl para su secuenciación. ....	21
Figura 12. Celdas listas para el ensamble total de la CCM, donde se puede visualizar el puente donde se encuentra la membrana de Nafion. ....	26
Figura 13. Ferricianuro de Potasio disuelto en agua, dentro de una celda de combustible microbiana. ....	27
Figura 14. Electrodo de grafito empleados en la Celda de combustible microbiana.....	27
Figura 15. Primer paso para la activación de la Membrana de Nafion 117 (1 hora en una solución de peróxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 3% a 80 °C).....	28
Figura 16. Multímetro Keysight 34461 a exactitud básica % CD, 0.06 AC. ....	29
Figura 17. Sistema de monitoreo adquisidor Keysight 34972.....	29

Figura 18. Vista macroscópica de la Cepa 1. Colonia rosa claro con una forma circular, incubada a 37 °C por 5 días.....	35
Figura 19. Vista macroscópica de la Cepa 2. Colonia roja con una forma circular, incubada a 37 °C por 5 días.....	35
Figura 20. Vista macroscópica de la Cepa 3. Colonia anaranjada clara con una forma redonda, incubada a 37 °C por 5 días.....	36
Figura 21. Vista macroscópica de la Cepa 4. Colonia transparente amarillo brillante con una forma ovalada, incubada a 37 °C por 5 días.....	36
Figura 22. Vista macroscópica de la Cepa 5. Colonia amarilla intensa con una forma lisa, incubada a 37 °C por 5 días.....	37
Figura 23. Electroforesis de la PCR 1 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de cada cepa.....	37
Figura 24. Electroforesis de la PCR 2 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de las cepas 3, 4 y 5.....	38
Figura 25. Electroforesis de la PCR 3 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de las cepas 3 y 5.....	38
Figura 26. Electroforesis de la PCR 4 en gel de agarosa al 3%, cargando 15 ng de ADN de las cepas 3 y 5.....	39
Figura 27. Diseño del prototipo final y totalmente ensamblado para su uso como CCM....	45
Figura 28. Celdas de combustible microbianas en operación. ....	47
Figura 29. Resultados de la evaluación del efecto del consorcio microbiano en términos de voltaje sin el uso de resistencia externa.....	48
Figura 30. Resultados de la evaluación del efecto del consorcio microbiano en términos de voltaje con el uso de las diferentes resistencias.....	48
Figura 31. Resultados de la determinación de intensidad de corriente sin el uso de resistencia externa. ....	51
Figura 32. Resultados de la determinación de intensidad de corriente con el uso de las diferentes resistencias. ....	51
Figura 33. Resultados de la determinación de la potencia sin el uso de resistencia externa.53	
Figura 34. Resultados de la determinación de la potencia con el uso de las diferentes resistencias.....	53

Figura 35. Resultados de la determinación de la densidad de potencia sin el uso de una resistencia externa.....	55
Figura 36. Resultados de la determinación de la densidad de potencia con el uso de las diferentes resistencias. ....	56
Figura 37. Resultados de la determinación de la densidad de corriente sin el uso de una resistencia externa.....	57
Figura 38. Resultados de la determinación de la densidad de corriente con el uso de las diferentes resistencias. ....	58
Figura 39. Resultados de la determinación de energía total producida (J).....	59
Figura 40. Gráfico de la Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM.....	61
Figura 41. Diseño en programa Autocad previo al ensamblaje de la CCM. ....	76
Figura 42. Resultados de la determinación de metales totales (mg/L) para la muestra de relave minero antes pre-tratado. Laboratorio de Control de Calidad de la UCSM. ....	77
Figura 43. Resultados de los metales totales (mg/L) para la muestras de las celdas después de su operación. Laboratorio de Control de Calidad de la UCSM. ....	78
Figura 44. Resultados estadísticos para la determinación de la producción de energía eléctrica obtenida. ....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers de Takahashi (Pro341F/Pro805R).....	23
Tabla 2. Componentes para la amplificación con los primers de Takahashi. ....	23
Tabla 3. Proceso de la PCR. ....	24
Tabla 4. Concentración de reactivos para la limpieza de amplicones. ....	24
Tabla 5. Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM. ....	33
Tabla 6. Vista Macroscópica de las cepas aisladas. ....	34
Tabla 7. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 1. ....	42
Tabla 8. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 2. ....	42
Tabla 9. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 3. ....	43
Tabla 10. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 4. ....	43
Tabla 11. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 5. ....	44
Tabla 12. Parámetros del Diseño de una Celda de combustible microbiana.....	46
Tabla 13. Resultados Máximos en torno al Voltaje de cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas. ....	49
Tabla 14. Resultados Máximos de los Amperios generados en cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas. ....	52
Tabla 15. Resultados Máximos de los Watts generados en cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas. ....	54
Tabla 16. Resultados Máximos de $W/m^2$ generados en cada ánodo de la CCM's. ....	55
Tabla 17. Resultados Máximos de los $A/m^2$ generados en cada ánodo de la CCM's. ....	57
Tabla 18. Energía total producida generada en cada CCM's. ....	59
Tabla 19. Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM. ....	60
Tabla 20. Prueba de Tukey empleada a las diferentes CCM con sus resistencias respectivas. ....	62
Tabla 21. Materiales que pueden ser empleados en cada componente de una celda de combustible microbiana (2). ....	74
Tabla 22. Microorganismos y sustratos utilizados en una MFC's (2). ....	75



## RESUMEN

Las celdas de combustible microbianas son una tecnología innovadora, que cada vez está tomando más impacto en la sociedad investigadora como en la social debido a que es un tipo de tecnología que generaría energía sin contaminar el medio ambiente usando un microorganismo o un consorcio de ellos, que, mediante su respiración celular, pueden llegar a generar electrones, es decir, energía eléctrica. Como sabemos el Perú al ser un país dependiente económicamente de la explotación minera, conlleva a generar grandes cantidades de residuos mineros, lodos activados y distintas pilas de lixiviados que son considerados un desperdicio altamente disponible que no tiene un valor industrial. En la presente investigación se diseñó una Celda de Combustible Microbiana, en la cual se tomó un relave minero proveniente del Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos Minera Porvenir S.A.C, se caracterizó fisicoquímicamente el relave minero mostrando un pH de 7.5 y una gran concentración de metales; donde se tomó mayor énfasis en la Plata, Plomo Cobre y Zinc. Se logró el aislamiento, identificación y caracterización molecular de bacterias presentes en el relave minero de mayor eficiencia con un tratamiento con Tween 80 al 1%, obteniendo así a las familias de microorganismos: *Serratia*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*.

La celda de combustible microbiana tuvo como diseño un modelo tipo H, con tubos como conexión entre las cámaras separadas por una membrana, se utilizó como electrodo placas de grafito de alta densidad para el mejor transporte de los electrones.

En la primera corrida experimental se analizó la concentración de metales dentro del relave minero, antes y después del proceso en la celda de combustible microbiana, donde se pudo comprobar que el consorcio podría funcionar no solo en la generación de electricidad, sino también para el tratamiento de estos lodos activados; ya que la concentración de los metales en mg/L disminuyó a menos de la mitad. En la segunda comparación se tuvo la implicancia de la resistencia externa dentro de las celdas de combustible microbianas, demostrándose que si hay una diferencia significativa de generación de electricidad entre el empleo de diferentes resistencias externas mostrando valores de  $0.36283 \text{ W/m}^2$  para la resistencia de  $470 \Omega$ ,  $0.37418 \text{ W/m}^2$  para  $500 \Omega$ ,  $0.41337 \text{ W/m}^2$  para  $510 \Omega$  y  $0.28808 \text{ W/m}^2$  para la resistencia externa de  $560 \Omega$ .; demostrándose que para poder producir electricidad, hubo dentro de la CCM una oxido reducción. Con estos resultados se comprobó que el consorcio microbiano pudo biorremediar el relave minero, pudo generar electricidad siendo una celda de combustible microbiana de pequeña escala.

Palabras clave: *celdas de combustible microbianas, CCM, Relave minero, lodo activado, resistencias externas.*

## ABSTRACT

Microbial fuel cells are an innovative technology, which is increasingly having an impact on the research society as well as the social one because it is a type of technology that would generate energy without contaminating the environment using a microorganism or a consortium of them, which, through their cellular respiration, can generate electrons, that is, electrical energy. As we know Peru, being a country economically dependent on mining, leads to generate large amounts of mining waste, activated sludge and different leachate batteries that are considered a highly available waste that does not have an industrial value. In the present investigation, a Microbial Fuel Cell was designed, in which a mining tailings from the Training and Metallurgical Process Center Minera Porvenir S.A.C was taken, the mining tail was physicochemically characterized showing a pH of 7.5 and a large concentration of metals; where greater emphasis was placed on Silver, Copper Lead and Zinc. Isolation, identification and molecular characterization of bacteria present in the most efficient mining tailings was achieved with a treatment with Tween 80 at 1%, thus obtaining the families of microorganisms: Serratia, Erwinia, Rhodococcus, Agrobacterium and Acinetobacter. The microbial fuel cell was designed as a type H model, with tubes as a connection between the chambers separated by a membrane, high density graphite plates were used as electrode for the best transport of the electrons. In the first experimental run, the concentration of metals within the mining tailings was analyzed, before and after the process in the microbial fuel cell, where it was found that the consortium could work not only in the generation of electricity, but also for the treatment of these activated sludges; since the concentration of metals in mg / L decreased to less than half. In the second comparison there was the implication of the external resistance within the microbial fuel cells, demonstrating that if there is a significant difference in electricity generation between the use of different external resistors showing values of  $0.36283 \text{ W/m}^2$  for  $470 \Omega$  resistance,  $0.37418 \text{ W/m}^2$  for  $500 \Omega$ ,  $0.41337 \text{ W/m}^2$  for  $510 \Omega$  and  $0.28808 \text{ W/m}^2$  for external resistance of  $560 \Omega$ ; proving that in order to produce electricity, there was a reduction in the CCM. With these results it was found that the microbial consortium was able to bioremediate the mining tailings, could generate electricity being a small-scale microbial fuel cell.

**Keywords:** *microbial fuel cells, CCM, mining tailings, activated sludge, external resistances.*

## INTRODUCCIÓN

Con la demanda cada vez mayor de energía, pero a su vez el trabajo de controlar la producción energética nuclear y combustión de hidrocarburos, se están buscando fuentes de energía alternativas a las que ya existen; así se está luchando día a día, con tecnologías que utilizan energías renovables, como es la producción de metano a partir de desechos biológicos (1). El problema surge al ver que estas tecnologías tienen limitaciones y así es que con diversas investigaciones y el desarrollo, se crean nuevos métodos que solas o en conjunto pueden servir para un mejor suministro de energía (2).

Según el Ministerio de Energía y Minas, la generación de electricidad en estos tiempos en nuestro país está distribuida entre fuentes de energía hidroeléctrica y termoeléctrica. Las investigaciones acerca de energías alternativas, en el país, son pocas; es por ello la importancia de tecnologías alternas que ayuden con el desarrollo sostenible de todo el sector eléctrico (3).

Las celdas de combustible microbiana, forman parte del campo de bioelectricidad, y es una tecnología que llama mucho la atención, debido a que usan el metabolismo microbiano para generar energía eléctrica a partir de sustratos orgánicos, sin llegar a generar gases contaminantes, además que un beneficio agregado es la limpieza de los efluentes desechados (4). Estas celdas también pueden ser consideradas un tipo de bioreactor, al poder usar estas reacciones metabólicas para producir un bien. La ventaja principal de estas celdas es su alto rendimiento en la conversión de sustrato y poder hacerlo sin necesidad de un factor externo como temperatura, pH o aireación; todo esto las marca como una tecnología para producción de energía sostenible y económica (5).

Se han utilizado varios sustratos como evaluación para la ejecución en las celdas, como aguas residuales, residuos de glucosa, en una proporción menor, los relaves mineros, que son el objeto de análisis para este estudio. Algunas investigaciones están mostrando que quizás el mayor valor de la tecnológica de la CMM no sea necesariamente la generación de electricidad, sino la capacidad de microbios de electrodo de llegar a degradar los residuos o productos químicos tóxicos que se encuentran como sustrato (6).

El poder generar o recuperar, a partir de desechos orgánicos, energía eléctrica es un tema llamativo en la investigación, así como las células de biocombustibles que generan un bien utilizando fuentes de carbono que no tienen un costo elevado. El que estas celdas junto con microorganismos (bacterias) puedan utilizar desechos o sustratos para generar electricidad las convierte en una fuente de energía sostenible que ayudarían mucho a las necesidades energéticas que se vive hoy en día en nuestro país. Y también ayudaría a reducir a conjunto los costos que se darían si se realizara un tratamiento a estas fuentes de desecho (7).

Dado toda esta información sobre nuestro sector energético actual, el principal motivo de esta investigación es evaluar la generación de energía eléctrica alternativa, en el marco de las tecnologías de bioelectricidad con celdas de combustible microbianas (8). Las CCM's se usan sobre todo para la alimentación de pequeños sistemas eléctricos que no necesitan altos rendimientos o consumos energéticos.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar un consorcio microbiano proveniente de relaves mineros que permita la generación de electricidad en una CCM.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fisicoquímicamente el relave minero.
2. Aislar y caracterizar e identificar los microorganismos presentes en el relave minero.
3. Diseñar y construir una celda de combustible microbiana para la generación de electricidad.
4. Analizar y evaluar el efecto de las resistencias en las CCM's.
5. Comparar las características fisicoquímicas del relave minero antes y después de ser empleado en una celda de combustible microbiana.

## HIPÓTESIS

Si se conoce la presencia de microorganismos en concentraciones altas de metales y que pueden generar reacciones de óxido-reducción, es posible caracterizar un consorcio microbiano procedente de relaves mineros y generar energía eléctrica a partir de ellos en una CCM.



## VARIABLES E INDICADORES

VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADORES
<i>Consortio Microbiano</i>	Familia / Especie
	Características Macroscópicas
	Características Moleculares
<i>Resistencias</i>	Sin Resistencia
	470 $\Omega$
	500 $\Omega$
	510 $\Omega$
	560 $\Omega$

VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES
<i>Cantidad eléctrica producida por las CCM</i>	Voltaje (Voltios)
	Intensidad de corriente (Amperios)
	Potencia (Watts)
	Densidad de Potencia (Watts/m <sup>2</sup> )
	Densidad de Corriente (Amperios/m <sup>2</sup> )
	Energía total producida (Joules)

## DELIMITACIONES

Nuestra investigación es descriptiva y correlacional, descriptiva debido a que vamos a describir cómo es que los microorganismos presentes en un relave minero pueden llegar a generar electricidad en una CCM, mas no vamos a indagar el “por qué” o “cómo” se da este hecho; y es correlacional porque vamos a medir dos variables, por un lado tenemos las diferentes resistencias que vamos a emplear y por otro si es que estos microorganismos presentes pueden, además de generar electricidad, disminuir las concentraciones de metales presentes en el lodo activado.

### 1) Delimitación Espacial:

Para nuestra investigación se obtuvo la muestra del Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos Minera Porvenir S.A.C (CEPROMET) con coordenadas  $16^{\circ}19'53.9''S$   $71^{\circ}36'46.4''W$ . en la periferia de la ciudad de Arequipa en el distrito de Cerro Colorado, donde una vez dentro de esta represa se encontraba una poza única impermeabilizada, de donde se recolecto el relave minero lo más homogéneo posible.

### 2) Delimitación Temporal longitudinal:

El periodo que nos tomó esta investigación fue de Enero del presente año (2019) hasta Mayo del mismo. En el caso de la recolección de la muestra se realizó exactamente el 29 de Enero del 2019 a las 4:38 de la tarde. Posterior a la toma de muestra los demás pasos de la experimentación se fueron dando según las circunstancias y disponibilidad de laboratorios

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1.Sector energético a nivel nacional

Cada día en Perú incrementa la demanda de necesidad energética, por mencionarlo en el año 2007 al año 2016 hubo un crecimiento de 7,4% por año de esta demanda. Está incrementando tanto, que para el año 2030 se cree que esta demanda energética va a superar los 1,632 KWh (9). Existen cuatro sectores en Perú donde la demanda de energía es grande, el 40%, que es el porcentaje más grande de energía utilizada, lo usa el sector transporte, seguido del sector residencial utilizando un 28%, casi al mismo porcentaje el sector industrial y minero con un 25% y representando un 3% el sector pesquero (3). La capacidad de producción de energía se reparte entre fuentes de energía termoeléctrica y fuentes hidroeléctricas. Pero debido a que la demanda energética crece y crece, el Gobierno Peruano se ha apoyado en el gas natural como fuente de esta energía, que mientras tanto sirve mucho como alternativa, pero al crecer la demanda se volvería solo una solución temporal (3).

Nuevas tecnologías que podrían a un futuro servir de fuentes energéticas son las micro turbinas, que son las que usan la energía cinética producida de los ríos, y los cada vez más usados paneles solares que servirían más que todo para la iluminación y comunicación (10). Y la última tecnología que últimamente está tomando cada vez más y más peso en este sector, como fuente de energía, son las celdas microbianas de combustible a nivel nacional.

#### 1.2.Contaminación minera en el Perú

El Perú es considerado un país netamente minero, por ello es reconocido como el cuarto productor de plomo en todo el mundo, pero esta producción conduce a una contaminación ambiental y relaves por parte de mineras formales e informales. Los relaves mineros son desechos generados de un proceso minero, lo conforman: tierra, agua, minerales y rocas que en su conjunto tienen concentraciones elevadas de químicos (11). Hay una amplia gama de minerales explotados en nuestro país; es por ello que según el mineral extraído, su localización y los métodos empleados, se va a generar diferentes tipos de relaves o desechos mineros (12).

Desde el 2010, el Perú tiene 176 minas metálicas operando conocidas, donde 54 de estas minas producen 100 toneladas por día de metales, la ventaja, es que cada vez son más mineras que en conjunto con la tecnología han mejorado sus métodos de disposición de relaves, como son el relleno subterráneo, descarga espesada, tratamiento de aguas acidas, etc.; todo ello dirigido para proteger el medio ambiente y la salud y seguridad de los seres vivos (13).

El lodo del relave minero está conformado por varios compuestos que pueden llegar a resultar contaminantes hídricos como son: los ácidos, metales en su forma de iones, cianuro de sodio y diversos reactivos químicos. Estos lodos son transportado a diferentes lugares (canchas de relave), como se muestra en la Figura 1., donde se supone no generan un gran impacto negativo ambiental (con elaboración previa de un EIA), pero la geografía física de algunos lugares del territorio andino peruano no siempre son apropiadas para atenuar estos efectos (12).

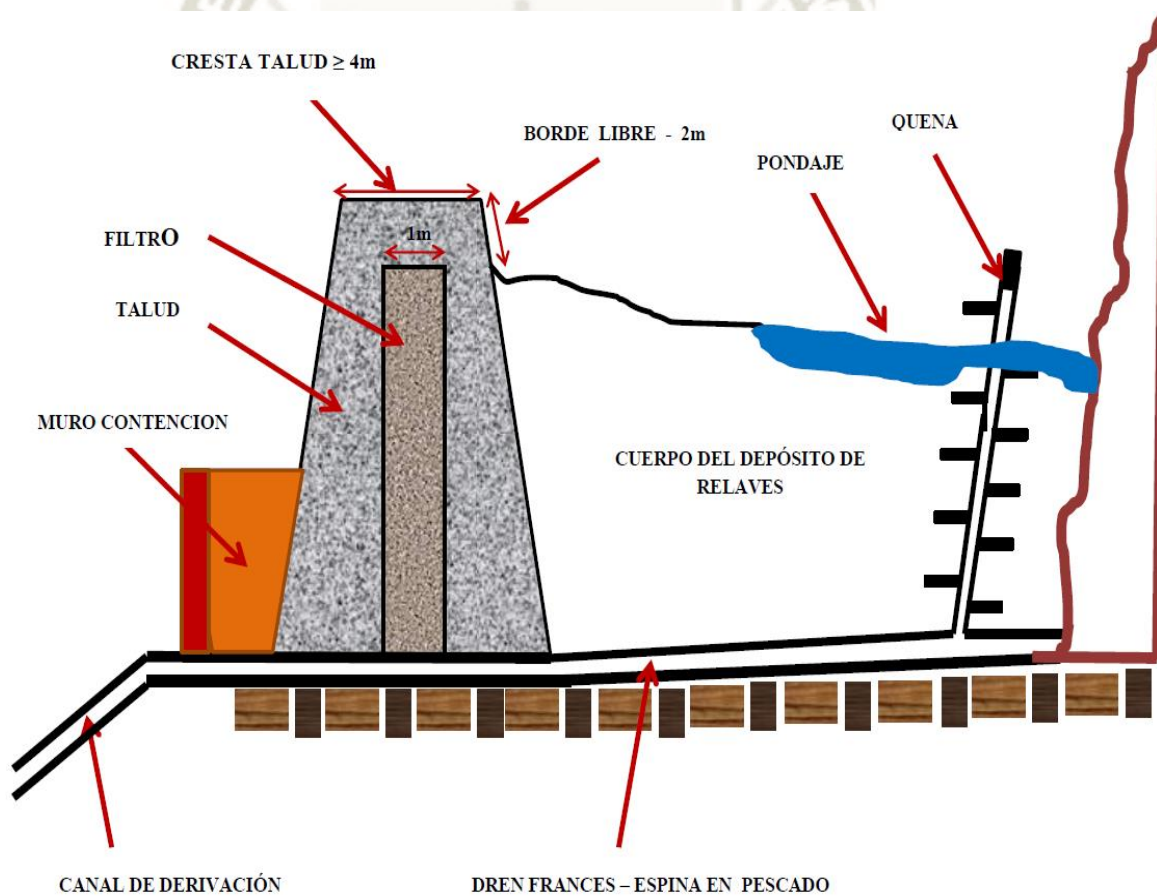


Figura 1. Partes de un depósito de Relaves mineros (13).

### 1.3. Microorganismos electrogénicos y su cinética de crecimiento en las celdas de combustible microbiana

La característica peculiar que diferencia a una CCM's de los otros tipos de celda, es el uso de microorganismos dentro de ella; donde estos microorganismos tienen que poder oxidar el sustrato y poder transferir los electrones al electrodo de la cámara anódica (Figura 2.) (14). Es por ello que es importante reconocer las vías metabólicas que gobiernan el flujo de electrones y protones dentro de las bacterias, ya que se ha investigado que tanto el potencial del ánodo como el sustrato determinarán el metabolismo bacteriano (15).

Esto quiere decir que a mayor cantidad de corriente el potencial del ánodo disminuirá, haciendo que la bacteria realice el paso de electrones en lugares más y más reducidos. Lo explicado anteriormente no quiere decir que son pocos los microorganismos que generen electricidad, lo que ayuda este potencial del ánodo es en poder saber si estas rutas metabólicas son poco o muy oxidativas e incluso fermentaciones (5).

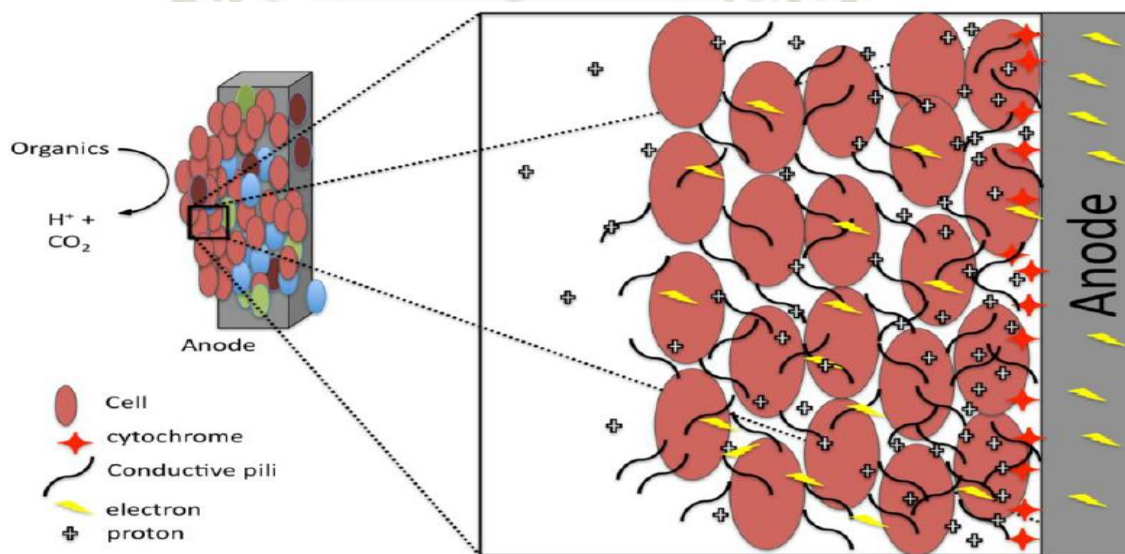


Figura 2. Desempeño de los microorganismos electrogénicos, donde el sustrato es metabolizado por bacterias, que transfieren los electrones ganados al ánodo (6).

Los lodos activos o sedimentos son el lugar perfecto para encontrar comunidades microbianas óptimas para trabajar en una CCM, estas comunidades pueden llegar a producir más energía que un cultivo puro (obtenidos de sedimentos de CCM's o su previa identificación como microorganismos Fe(III) reductores (16). Es importante mencionar que si bien estos microorganismos reductores de Fe(III) son muy efectivos al entregar electrones

al electrodo, no significa que todos estos son capaces de hacer esta actividad, y de la misma forma existen otros microorganismos con actividad electrogénica que no llegan a reducir Fe(III). Por más que cada vez son más los estudios respecto a este tema no se conoce aún como se realiza el mecanismo de transporte de electrones, de casi todos, desde la célula hacia un aceptor extracelular (17).

Se pueden pensar en tres razones que hacen que las bacterias empleen esta transferencia de electrones extracelular (14). La primera puede ser la de la respiración celular usando óxidos metálicos sólidos, como es el caso del hierro. Las bacterias pueden liberar electrones de una oxidasa terminal en la cadena respiratoria hacia compuesto con Fe(III) afuera de la célula, llegando a producir Fe(II) soluble. La segunda razón es que puede ser que las células puedan transferir electrones hacia otra célula sin un intermediario (18). Y la última teoría, que no ha sido experimentada aun, es el posible rol de la transferencia electrónica en la comunicación intercelular, se puede pensar esto debido a que por investigaciones indican que las bacterias en un biofilm se comunican entre sí por medio de químicos propios del quorum sensing, como pueden ser la NADH deshidrogenasa, ubiquinona, coenzima Q y citocromo (19) (20).

La cinética de crecimiento de estos microorganismos es el general, se refiere al aumento del número de microorganismo a lo largo del tiempo no al aumento de tamaño de un microorganismo. Por ello que se analiza por poblaciones y no en bacterias individuales. Cuando los microorganismos se encuentran en un medio adecuado el crecimiento se da activamente, continuando hasta que, por el medio agotado o acumulación de una sustancia inhibidora, el crecimiento se detiene; analizándose posteriormente, la parte estequiométrica (concentración final de bacterias) y la parte cinética (marcando la velocidad del proceso) (21).

#### **1.4. Electricidad y corriente eléctrica**

Se especifica como corriente eléctrica al movimiento de electrones a través de los átomos de un material conductor. Los electrones se mueven de un polo negativo o un generador, que es el polo positivo. El conductor va a resultar cualquier material cuyo último nivel de la configuración electrónica de sus átomos contiene pocos electrones, para que así sea fácil el movimiento de estos.

Y el material aislante, va a ser el que su último nivel de la configuración electrónica se encuentra completo, dando un resultado negativo en el movimiento de estos (22). La buena ejecución de una CCM se determina por varios factores, como es la potencia, la corriente densidad de corriente y diferencia de potencial. La carga eléctrica es la propiedad eléctrica de una partícula atómica, esta es medida en Coulomb. En todo tipo de celda, se perciben dos cargas distintas, existe una diferencia de potencial (tensión o voltaje), entre la capacidad de la carga de poder hacer un trabajo y los Coulomb (23) (24).

Dentro de la diferencia de potencial la unidad principal es el voltaje, que es la energía requerida para mover una carga unitaria a través de un elemento conductor (23), y la unidad básica de la corriente es el ampere (A).

Las celdas de combustible microbianas, funcionan igual que las celdas electroquímicas (baterías), las que llegan a producir corriente continua o directa (una única dirección), este movimiento es debido por las fuentes de voltaje (celdas), que mantienen la misma polaridad en su voltaje de salida. Es por todo ello, que en un circuito eléctrico debe estar formado por un mecanismo que cree una diferencia de cargas, un ejemplo de ellas son las CCM's; y un circuito para el paso de electrones, que sería el cable de cobre (22).

## **1.5.Celdas de combustible microbiana**

### **1.5.1. Sistema bioelectroquímico**

Se le dice sistema bioelectroquímico a los sistemas que utilizan microorganismos que realizan la oxidación de la materia orgánica sobre un ánodo (electrodo). Esta materia orgánica pueden ser sustratos como la celulosa, almidón, y hasta incluso aguas residuales diversas (25). Estos sistemas pueden ser de dos tipos: o celdas de combustible microbianas o celdas de electrolisis microbianas (26).

En el primer tipo se genera la electricidad de manera libre y espontánea por reacciones redox, en las celdas de electrolisis microbianas se consume esta energía para generar reacciones químicas redox.

### 1.5.2. Principio de una celda de combustible microbiana

Una CCM es un bioreactor donde se crea corriente eléctrica y el gas de salida producido es dióxido de carbono, no metano. Como se observa en la Figura 3. se observa el sistema básico de una celda de combustible microbiana donde, como se explicó anteriormente, el sustrato es metabolizado por la bacteria, y esta transfiere los electrones ganados hacia el electrodo o ánodo (2).

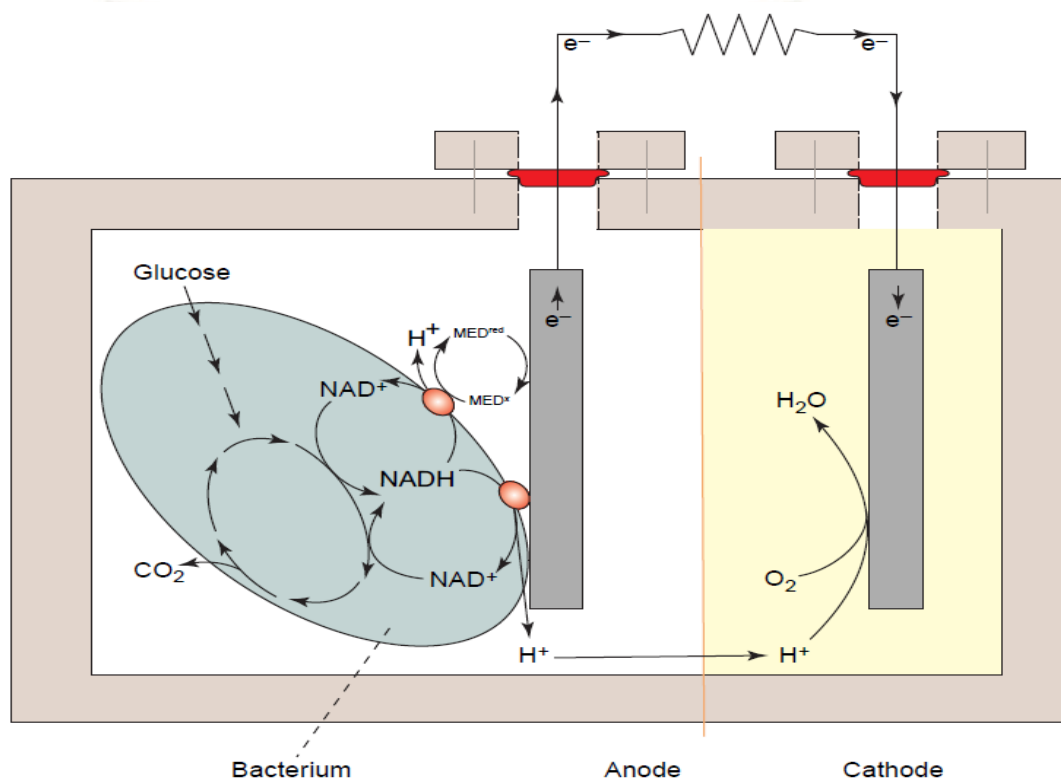


Figura 3. El principio de funcionamiento de una celda de combustible microbiana (5).

Una CCM está constituida por: cámara anódica, cámara catódica, electrodos, medio de intercambio protónico, inoculo bacteriano, aceptor de electrones y el sustrato o materia orgánica (27). En la cámara anódica el sustrato es oxidado por las bacterias, generando así protones y electrones; los electrones se transfieren a la cámara catódica por el circuito eléctrico externo y los protones son transferidos a través del medio de intercambio de iones (28). Si la cámara se maneja en una condición aeróbica, los microorganismos utilizarían el oxígeno como aceptor de electrones y formaría agua, pero al manejarse las CCM en condiciones contrarias, el aceptor va a ser uno insoluble, es decir, el ánodo de la CCM (29).

La membrana viene a ser una de las partes más importantes dentro de la CCM, esto es debido a que aísla la cámara anódica de la catódica, pero permite el transporte selectivo de protones del ánodo al cátodo. Las características principales de una membrana son: que tiene que ser buen conductor iónico, aislador electrónico, ion selectivo, durable, químicamente estable, biocompatible, y de bajo costo (30).

Las celdas de combustible microbianas tienen un sinnúmero de ventajas sobre los sistemas utilizados actualmente para generar energía usando materia orgánica. Tenemos la conversión directa de la energía del sustrato a electricidad, no necesitan variables como temperatura o aireación para poder funcionar (lo cual aliviaría mucho los costos), no necesita tratamiento de efluentes gaseosos, al solo generar dióxido de carbono. Y una de las más grandes ventajas puede ser su uso en zonas rurales que no electrificadas (5). También son una novedosa tecnología debido a que sirven para el tratamiento de aguas y recuperación energética, genera in situ energía de sensores utilizando combustibles biodegradables autóctonos y existe una biorremediación de contaminación variadas (31).

### **1.5.3. *Diseño de una celda de combustible microbiana***

En la mayoría de investigaciones de CCM's, se adoptan la forma tradicional doble cámara, que es en forma de H, la cual la conforma dos recipientes (cámaras) conectados por una membrana de intercambio protónico (PEM) o puente salino (32).

A un principio, los reactores usaban un puente salino (33), este puente era el canal de intercambio de iones, pero conforme las investigaciones aumentaban se comprobaba que había más efectividad intercambiando este por una membrana de intercambio de protones. Este cambio y otros se hicieron con el fin de incrementar las densidades de potencia y llegar a producir corriente constante. Como ejemplo tenemos a un tipo de CCM de sedimentos que utilizan el sedimento y agua sobrenadante como el anolito y catolito, y han llegado a generar densidades de potencia de  $55 \text{ mW/m}^2$  en sedimentos marinos (34). Las celdas de combustible microbianas son celdas electroquímicas que logran convertir energía química en eléctrica (Figura 4.). En la parte anódica las bacterias van a desarrollar la oxidación del sustrato y generar electrones y protones. Estos electrones se dirigen al cátodo, y los protones de hidrogeno generados en el ánodo se

transportan hacia el cátodo a través de la membrana selectiva. Finalmente, la corriente es producida por la reducción de oxígeno en el cátodo (generando  $H_2O$ ). Se han realizado perfiles taxonómicos de las comunidades microbianas en los electrodos para numerosas CCM's y las más estudiadas y que dan buenos resultados son de las familias Shewallaceae y Geobacteraceae (35).

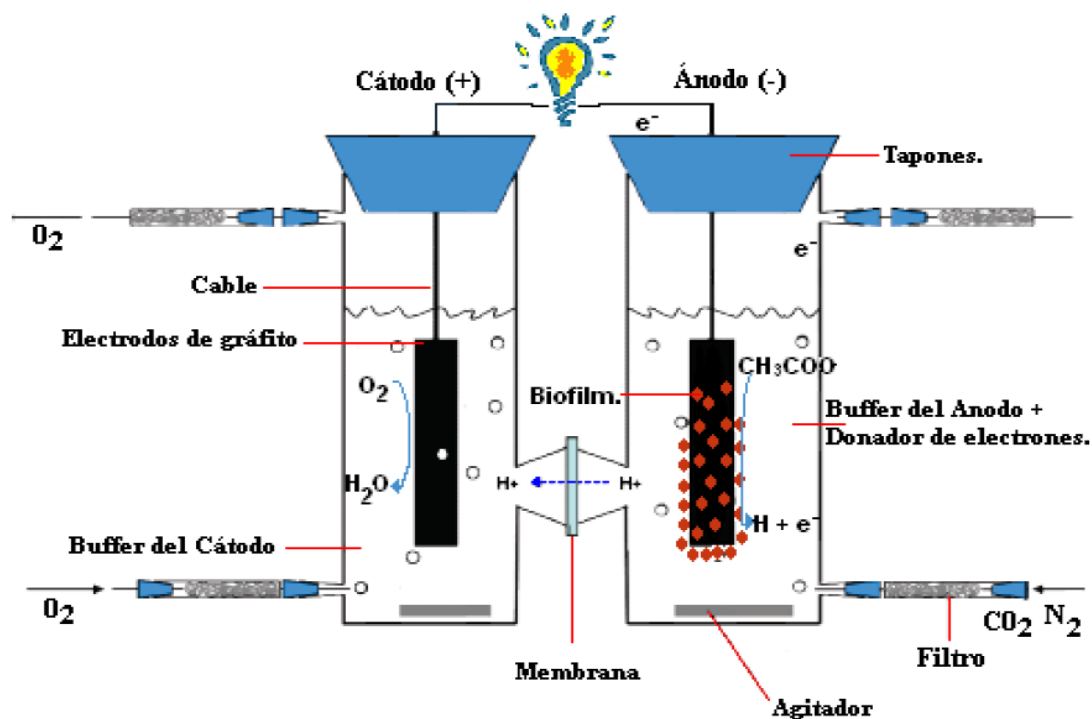


Figura 4. Esquema de celda de combustible microbiana (MFC) tipo H (36).

#### 1.5.4. Desempeño eléctrico de las celdas de combustible microbiana

El desempeño eléctrico se estudia con las mediciones del voltaje que se realizan en la resistencia externa conectada entre el ánodo y el cátodo y los cálculos a partir de ellas. Las unidades importantes evaluadas son la densidad de potencia (DP), eficiencia coulombica (EC) (36) y la resistencia interna (RI) (37).

La densidad de potencia es definida como la potencia por unidad de área del electrodo anódico [1] (38) o la potencia por unidad de volumen del sustrato [2] (39), calculándose así:

$$P_A = \frac{IU}{A} \quad [1]$$

$$P_V = \frac{IU}{V} \quad [2]$$

Donde:

I= Corriente eléctrica en amperios

U= Potencial eléctrico en voltio

A= Área de la superficie del electrodo anódico en m<sup>2</sup>

V= Volumen del sustrato de la cámara anódica

La eficiencia coulombica (EC) ayuda a obtener la fracción de energía eléctrica que se puede generar en una celda de combustible microbiana a partir de un sustrato determinado. Este factor se determina como la razón entre la carga generada y la carga teórica presente en el sustrato de la cámara anódica, donde expresado matemáticamente sería así:

$$EC\% = \frac{\sum_{i=1}^n U_i t_i}{RFb\Delta SV} M \times 100 \quad [3]$$

Donde:

U<sub>i</sub>= Voltaje de la CCM en el tiempo t<sub>i</sub>

R= Resistencia externa

F= Constante de Faraday

b= Numero de moles de electrones producidos por una mol de demanda química de oxígeno (DQO)

ΔS= Concentración removida de DQO

V= Volumen liquido (L)

M= Peso molecular del oxígeno

### 1.6. Membranas en la producción energética

La función de las membranas es para generar una cámara doble donde las bacterias puedan degradar un sustrato que es mantenido separado del cátodo (donde se encuentra el hidrógeno). Esta configuración es beneficiosa en la pérdida mínima de hidrógeno en el ánodo y en el líquido, o que el hidrógeno se mezcle con otros materiales gaseosos. En el caso de una celda de doble cámara el biogás generado de la oxidación es sustraído por la parte superior de la cámara anódica y el hidrógeno en la cámara catódica.

Por el contrario, en una sola cámara ambos gases son extraídos en la misma cámara. Se usa una fuente de energía para aplicar el potencial eléctrico y una resistencia externa para determinar la corriente como en la (Figura 5.) (17).

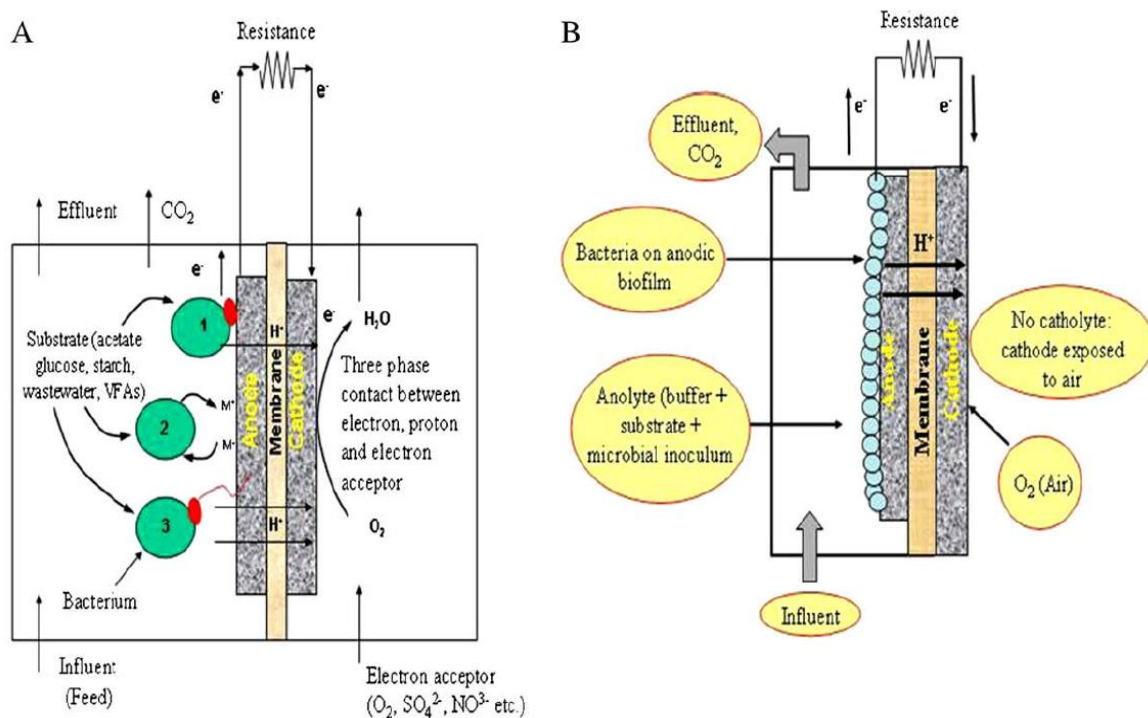


Figura 5. (A) Se muestra una vista simplificada de un MFC de dos cámaras. (B) MFC de una cámara con cátodo al aire libre (26).

Las membranas tienen diversas aplicaciones en varios bioprocesos; como la ósmosis inversa, ultrafiltración, separación de gases, membranas de contacto para la destilación, etc. Gugliuzza en el 2014, dio un listado de combinaciones de procesos con el uso de membranas para energías renovables (40), entre ellos tenemos:

- a) Energía renovable producto de la desalinización: La energía renovable es utilizada como suministro de energía de la planta de desalinización de membrana, cuyo proceso suele ser de alto consumo energético.
- b) Membranas de procesamiento de biocombustibles y la producción de biogás: Para la filtración y modernización de biogás.
- c) Celdas de combustible microbianas: Actúa como separador y electrolito sólido.

Para que una membrana pueda ser usada en una CCM debe cumplir con (41):

- 1) Tener una capacidad de intercambio de protones elevada.

- 2) Una alta conductividad, ya que por esta propiedad depende que se acumulen los protones en el ánodo (42).
- 3) Estabilidad química, térmica y resistencia mecánica, debido a que estas membranas normalmente se utilizan en entornos hostiles.
- 4) Deben tener baja permeabilidad al combustible usado (17), evitando así reacciones secundarias.

Lo negativo de usar estas membranas en las CCM's son el alto costo que añaden a todo el sistema. La membrana de Nafion tiene un precio aproximado de \$1400/m<sup>2</sup>, más costosa que una simple de intercambio de \$80/m<sup>2</sup>, por lo que el manejo del Nafion como membrana se abstiene en CCM's a gran escala. Aunque a pesar del elevado costo el Nafion 117 (Dipont Corp.) de 0.019 cm de grosor, es la membrana más usada hoy en día (17). La base de la membrana Nafion está justamente diseñada para que tenga varias regiones hidratadas, logrando así una buena migración de protones.

Nafion es una membrana polimérica, formada por un polímero de polietileno, en donde se reemplaza el hidrógeno con flúor formando una estructura PTFE (politetrafluoroetileno); así Nafion se transforma en una estructura química resistente, estable y duradera.

El electrolito se logra añadiendo bisulfito ( $HSO_3^-$ ), a la estructura del PTFE, el bisulfito añadido en su forma iónica es  $SO_3^-$  se une a los protones de hidrógeno. Esta estructura PTFE hidrofóbico y bisulfito hidrofílico tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua (43). La conductividad de los protones del Nafion, va a estar vinculado con el grado de hidratación debido al mecanismo de transporte asistido por agua (44). Pero a la vez, esto es un limitante ya que no puede sobrepasar los 100 °C, ya que la membrana se deshidrata, limitando así los protones (41).

### 1.7. Electroodos

Una cualidad importante en los electrodos debe ser tener una buena conductividad eléctrica, no corrosible, económico, y rápida fabricación. A parte de ello, los microorganismos deben adherirse a su superficie para la correcta conexión eléctrica (35). Un electrodo en una CCM, se define como un componente que conduce electricidad que hace contacto con una parte no

metálica del circuito; sea ánodo o cátodo (2). El cátodo es el electrodo por el cual los electrones entran a la celda y ocurre la reducción, y el ánodo por el contrario es el electrodo donde los electrones salen de la celda y ocurre la oxidación.

El único tipo de ánodo metálico que se podría llegar a usar es el acero inoxidable, el cobre no se usa debido a la toxicidad que causaría a los microorganismos (2). Es por todo ello, que el material más usado es el carbón, que se le encuentra en diversas formas, como el grafito, fibra, tela o papel; donde los últimos tomaron más auge por su mayor superficie de contacto (32).

Fuera de que la facilidad de encontrar el carbón, también es el material más elegido debido a que las bacterias tienen una afinidad por este material, tienen una buena estabilidad química, alta conductividad y es de bajo costo (45). En la Figura 6. Se muestran los materiales de carbón usados en una CCM, donde: (a) Papel carbón, (b) tela carbón, (c) malla carbón, (d) filtro carbón, (e) placa grafito, (f) grafito granulado, (g) carbono reticulado vitrificado, (h) cepillo carbón (31).

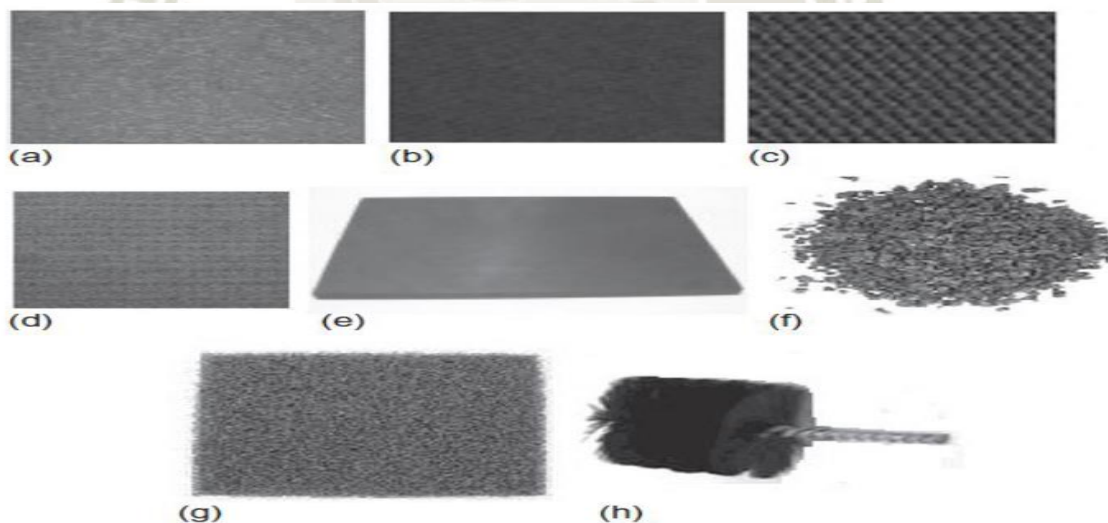


Figura 6. Materiales de carbón tradicionalmente empleados como electrodos en CCM's (31).

### 1.7.1. *Ánodo*

Un factor importante para la elección de un ánodo, es su afinidad hacia las bacterias de poder adherirse, y en las conexiones eléctricas. Para poder mejorar estas dos características mencionadas se han modificado el carbón por otro material como: cobre

(toxico), titanio (cero corriente), oro (no económico) y acero inoxidable (tiempos largos de operación) (31) (46) (47) (48).

El titanio y el acero inoxidable presentan problemas sobre todo a la hora de la adhesión de las bacterias al mismo y forman óxidos no conductores sobre toda su superficie (31).

### **1.7.2. Cátodo**

Lo normal es que el cátodo y el ánodo sean del mismo material, y están revestidos con metales como platino, cobalto y hierro para incrementar la velocidad de reducción del oxígeno (49).

La cámara donde se encuentra este electrodo, es donde se da la captura de electrones por ello es que se necesita un aceptor de electrones, siendo el oxígeno el recomendado, debido a su accesibilidad y bajo costo y no toxicidad (50) (51). El medio en la cámara catódica puede ser diversa, se puede usar desde agua destilada (52), buffer fosfato (53), como los más comunes. Pero tenemos también otros estudiados como el peróxido de hidrogeno, iones férricos, ferricianuro, que no son sustentables por el costo y continuo reemplazo contaminando la solución tratada (17) (46) (54).

En el Anexo 1 se puede visualizar una lista con todos los materiales que se pueden utilizar de ánodo o cátodo.

### **1.8. Sustratos en celda de combustible microbiana**

El sustrato elegido para una CCM, es un factor vital ya que determina la producción eléctrica (26). Este sustrato se puede precisar como la materia biodegradable que las bacterias van a usar y oxidar, liberando electrones hacia el ánodo. Uno de los sustratos más usados es el acetato, ya que es el producto final de varias rutas metabólicas para productos carbonados más grandes (55).

La glucosa es otro sustrato muy usado, en el año 2000 se vio una celda con *Proteus vulgaris* donde la eficiencia dependía de la fuente de carbono y las células iniciadas en un cultivo con glucosa duraron poco tiempo a las de galactosa (56).

Con lo mencionado anteriormente podemos decir, que cualquier fuente de carbono biodegradable puede ser utilizada en una celda de combustible microbiana incluyendo moléculas como carbohidratos y proteínas, o una mezcla de materia orgánica o aguas

residuales (57). Al elegir un compuesto puro aseguramos que se obtenga mayor generación de energía e hidrogeno (26), por el contrario, el uso de sustratos complejos son los más estudiados, debido a que fuera de la generación de electricidad, podrían ayudar a la degradación o biorremediación de estos. Pero claramente estos sustratos necesitan una comunidad de microorganismos más diversa y activa (26).

Otro factor importante a considerar es el costo, donde sobresalen los sustratos complejos porque son residuos domésticos o industriales, en cambio los sustratos puros son más costosos. Otro elemento importante es la concentración del sustrato que puede incrementar y mejorar la rapidez de reacción, y por ultimo las condiciones de operación (pH o temperatura), que no llega a afectar mucho debido a que la mayoría de sustratos se manejan a temperatura ambiente (58).

En la Figura 7. se observa que el factor más importante es el consorcio de microorganismos empleados para la degradación de la materia orgánica a compuestos como  $H_2O$  o  $CO_2$  y liberación de protones y electrones al sistema, este inoculo de microorganismos puede provenir de lodos activados anaerobios (59), aguas residuales (60). En el Anexo 2 se expone una Tabla de diversos microorganismos y su sustrato usado para el sistema.

Producción de energía eléctrica

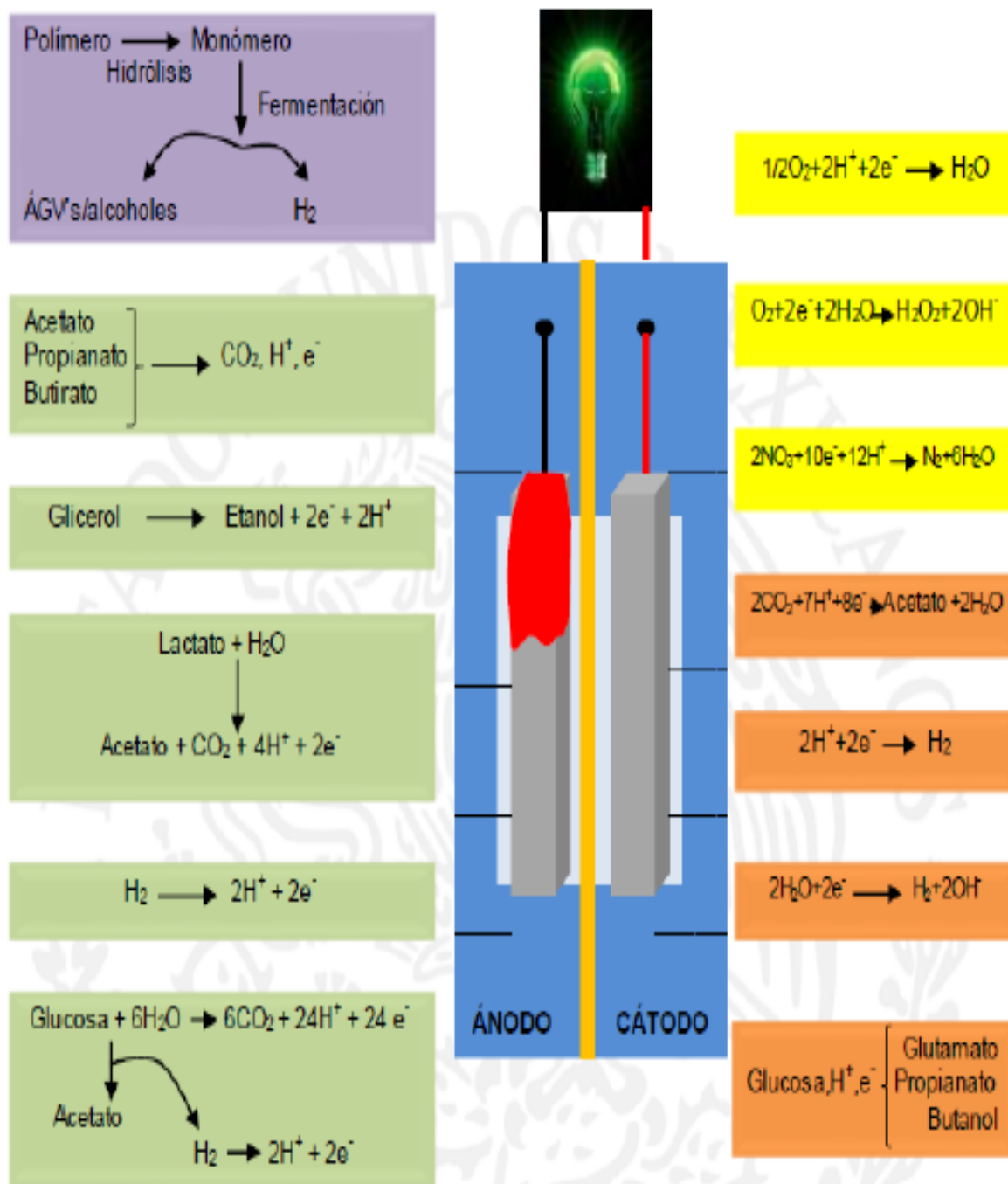


Figura 7. Funcionamiento y Desempeño de una celda de combustible microbiana (CCM) (59).

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Materiales

##### 2.1.1. Lugar de ejecución y recolección de muestra

La investigación se desarrolló en los laboratorios del Pabellón F, dentro de las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María. Y la recolección de la muestra de relave minero se realizó en las instalaciones del Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos Minera Porvenir S.A.C (CEPROMET) en la periferia de la ciudad en el distrito de Cerro Colorado.

##### 2.1.2. Vidrio

- Erlenmeyer 100 mL, 250 mL, 500 mL
- Vasos de precipitado 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Pipetas de 1 mL y 10 mL
- Baguetas
- Probeta 100 mL a 1000 mL
- Fiolas de 10 mL , 25 mL, 50 mL
- Matraces 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Pro pipetas
- Micro pipetas 10 uL, 100 uL, 1000 uL
- Frascos de vidrio
- Tubos de ensayo

##### 2.1.3. Unidades biológicas

- Relave minero (Lodos activos)

##### 2.1.4. Reactivos químicos y bioquímicos

- Ferricianuro de potasio 99.6%, Diproquim

- Ácido sulfúrico 96%
- Papel pH, Universal Test Paper pH 0-14
- Medio nutritivo Himedia ref. M002-500G
- Tween 80
- Agua destilada
- Alcohol medicinal 96%
- Agua oxigenada al 50% Diproquim
- Agua ultra pura
- Membrana de Nafion 117
- Primers de Reysenbach (27F/1429R)
- Primers de Takahashi (Pro341F/Pro805R)
- Kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (Qiagen)
- dNTPs
- $MgCl_2$
- Maxima HotStart DNA Polimerasa
- NFW
- Exo I
- FastAP

#### ***2.1.5. Instrumentación y equipos***

- Autoclave Tuttnauer 1730 M
- Multiparámetro, Hanna Multiparameter H9829
- Multímetro, Keysight Technologies U1272A
- Adquisitor de Datos, Keysight Technologies 3472A LX1 Data Acquisition/Switch unit
- Balanza analítica Ohaus Pionner (4 decimales)
- Termómetro Digital Vástago largo MOD-TBT-09
- Cabinas limpias de flujo laminar Airstream de Esco Modelo AHC-4D
- Thermo Scientific™ 88870005
- Termociclador Optimax TC9610

### 2.1.6. Otros

- Asa de Kolle
- Cortador
- Espátula
- Electrodo de grafito de alta densidad
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Plastifilm rollo 5 m x 15 cm
- Tubos y Unión de tubos
- Silicona caliente y Pistola
- Recipiente de plástico (Táper Hermético) de 8 cm cada lado
- Tubos Falcon 15 mL
- Pegamento Soldimix
- Placas Petri de plástico
- Caimanes
- Cables de cobre
- Resistencias 470  $\Omega$ , 500  $\Omega$ , 510  $\Omega$  y 560  $\Omega$
- Palas

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Recolección de muestra de relave minero

El muestreo y recojo de material se realizó en las instalaciones del Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos Minera Porvenir S.A.C (CEPROMET) con coordenadas 16°19'53.9"S 71°36'46.4"W. en la periferia de la ciudad de Arequipa en el distrito de Cerro Colorado, donde se procedió a recolectar el material, el cual estaba en una poza impermeabilizada sobre el suelo, como se ve en la Figura 8.



Figura 8. Lodo activado proveniente de relave minero, obtenido de CEPROMET (Centro de Entrenamiento y procesos metalúrgicos. Minera PORVENIR S.A.C).

A partir de una zona que mostraba todos los estratos (niveles diferenciados del material por su composición propia) del material se procedió a extraer el material aleatoriamente, tratando de recolectarlo de una manera homogénea con ayuda de una pala colocando el material en baldes totalmente estériles e inertes (Figura 9.).



Figura 9. Recolección de muestra de lodo activado (relave minero) en el Centro de entrenamiento y procesos metalúrgicos de la Minera PORVENIR S.A.C.

### ***2.2.2. Caracterización de la composición del relave minero***

La caracterización de los metales presentes en el relave minero se realizó en el Laboratorio de ensayo y control de calidad de la Universidad Católica de Santa María. Se dispuso 50 mL de muestra en un frasco estéril, esta muestra era homogénea y obtenida antes de ser usada en la celda de combustible microbiana.

Con el informe de resultados de la composición de metales realizado a la muestra de relave, se discernió los metales que no se presentaban dentro de la composición, así como los metales que se encontraban en mayor concentración.

### ***2.2.3. Aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos presentes en el relave minero***

#### ***2.2.3.1. Aislamiento de los microorganismos***

Se preparó 250 mL de agar nutritivo; para ello se hidrató 5.80 gramos de medio en 250 mL de agua destilada, se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos, se dejó enfriando hasta 45 °C aproximadamente y se vació en 12 placas Petri estériles, manteniéndolas en refrigeración entre 2 a 8 °C hasta su uso posterior.

Como se puede observar en la Figura 10. se realizaron tres tipos de tratamientos con el relave minero:

- Sin tratamiento: Se recolectó la parte líquida del lodo activado, y se sembró directamente en las placas Petri.
- Primera disolución con Tween 80: Se recolectó 10 mL de la muestra de relave y se le adicionó 90 mL de Tween 80 (aditivo que emulsiona y disuelve grasas) al 1%.
- Segunda disolución con Tween 80: Del tratamiento anterior se sacó 1 mL en otro tubo Falcon con 9 mL de Tween 80 al 1%.

Se sembró 10 uL de cada tratamiento en las placas Petri con agar nutritivo. Se dejó crecer las colonias por aproximadamente 5 días a temperatura ambiente.

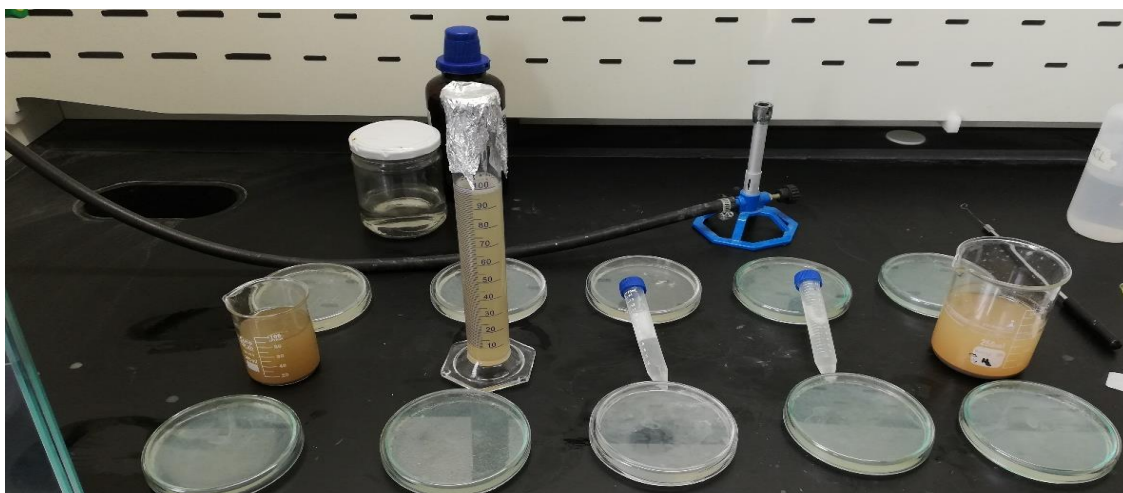


Figura 10. (De izquierda a derecha) Muestra sin tratamiento, primera disolución con Tween 80, primera disolución con Tween 80, segunda disolución con Tween 80 y segunda muestra sin tratamiento.

#### 2.2.3.2. Caracterización Macroscópica de los microorganismos del relave minero

Se seleccionó las diferentes colonias aisladas y en nuevas placas se procedió a hacer el repique de cada una de las colonias por separado. Se siguió utilizando medio nutritivo.

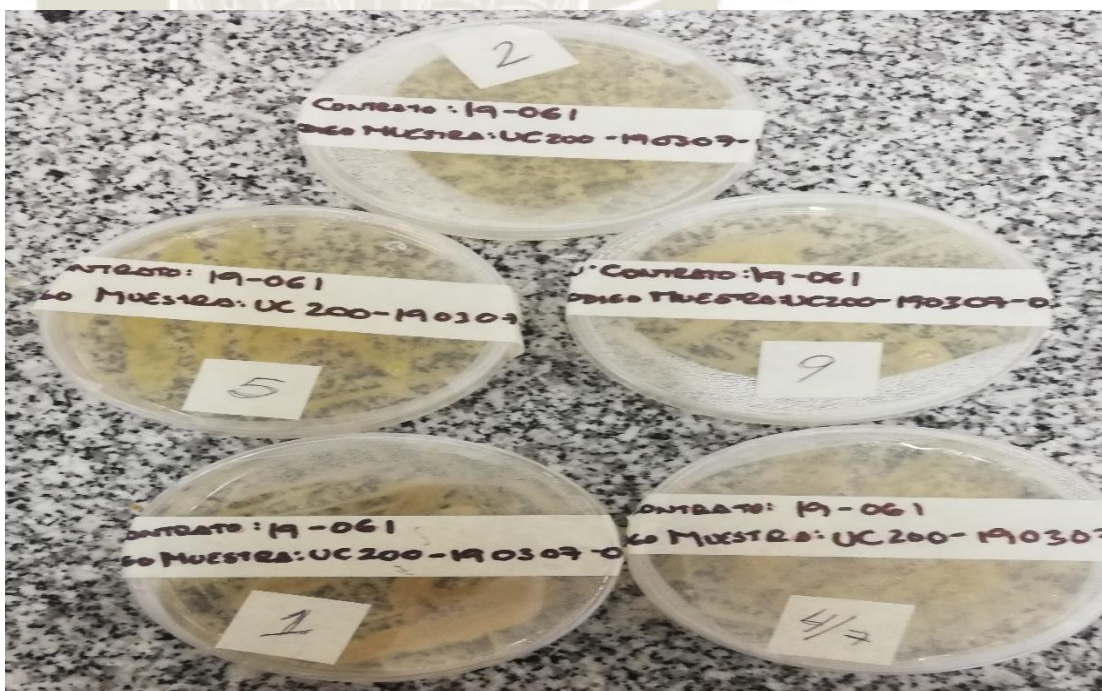


Figura 11. Rotulación y envío de muestras de microorganismos en agar nutritivos a la empresa BioAI para su secuenciación.

### 2.2.3.3. Caracterización Molecular de los microorganismos del relave minero

Una vez obtenidas las cepas aisladas se enviaron a la empresa BioAl para poder hacer la extracción de ADN, PCR y seguidamente una secuenciación de cada colonia definida que se aisló (Figura 11.). Las placas Petri con las colonias ya aisladas y ya formadas, se sellaron con Parafilm y se mandaron en una caja de tecnopor con gel packs para mantener una temperatura baja hasta la llegada a la empresa.

#### 2.2.3.3.1. Extracción del ADN bacteriano

Las cinco cepas aisladas se encontraban cada una en su respectiva placa Petri. Para la extracción de ADN se usó el método simplificado de Bazzicalupo & Fanceli (1997) el cual se describe a continuación (62):

- 1) Se picó una colonia bacteriana con un asa de siembra estéril la cual fue disuelta en 20 uL de agua estéril dentro de un tubo de 1.5 mL.
- 2) Se calentó el tubo con la colonia disuelta a 95 °C por 10 minutos en un termobloque.
- 3) 1 uL de este lisado suele ser suficiente para la PCR.
- 4) Este lisado puede ser guardado a -20 °C por bastante tiempo.

#### 2.2.3.3.2. Amplificación (PCR) de la región barcode para bacterias (16S)

Se utilizaron los ADN's obtenidos con el método simplificado de Bazzicalupo & Fanceli (1997) (62). Se emplearon para la PCR primers (Tabla 1.) que abarquen especies miembros del dominio Archaea (Takahashi et al 2014). Los ADN's fueron cuantificados por Qubit previo a cada PCR y diluido a la concentración requerida (64).

Tabla 1. Primers de Takahashi (Pro341F/Pro805R).

<b>NOMBRE DEL PRIMER</b>	<b>DIRECCIÓN</b>	<b>SECUENCIA 5' --&gt; 3'</b>	<b>REFERENCIA</b>
<i>Pro341F</i>	Forward	CCT ACG GGN BGC ASC AG	Takahashi et al 2014
<i>Pro805R</i>	Reverse	GAC TAC NVG GGT ATC TAA TCC	Takahashi et al 2014

La receta de amplificación utilizada para los primers de Takahashi fue la siguiente:

Tabla 2. Componentes para la amplificación con los primers de Takahashi.

<b>PREPARAR</b>	<b>CONCENTRACIÓN INICIAL</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL</b>	<b>POR <math>\mu</math>L DE MUESTRA</b>
<i>Buffer HotStart 10X</i>	10X	1X	2.50
<i>dNTPs</i>	2mM	0.2mM	2.50
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25mM	1.5mM	1.50
<i>Pro341F</i>	10 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	1.50
<i>Pro805R</i>	10 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	1.50
<i>Maxima HotStart DNA Polimerasa</i>	5U/ $\mu$ L	0.04U/ $\mu$ L	0.20
<i>NFW</i>	-	-	5.30
<i>ADN</i>	-	1-15 ng	10.00
		Vol. Final	25.00

El perfil térmico de amplificación utilizado fue el siguiente:

Tabla 3. Proceso de la PCR.

<i>Denaturación inicial</i>	95°C	4 minutos	35 ciclos
<i>Denaturación</i>	95°C	30 segundos	
<i>Annealing*</i>	63-52°C	30 segundos	
<i>Extensión</i>	72°C	1 minuto	
<i>Extensión final</i>	72°C	5 minutos	

2.2.3.3.3. Limpieza (Clean-Up) de amplicones

Luego de obtener amplicones de buena intensidad para cada cepa se procedió a purificarlos usando el método Exonucleasa – Fosfatasa (Exo-SAP). Esta purificación remueve remanentes de primers y dNTPs que podrían interferir con la secuenciación Sanger.

Tabla 4. Concentración de reactivos para la limpieza de amplicones.

REACTIVO	VOLUMEN
Exo I	1 µL
FastAP	2 µL
Producto de PCR	10 µL
Vol. Final	13 µL

Las mezclas son puestas en el termociclador y se siguió este perfil térmico: 37 °C por 15 minutos y 85 °C por 15 minutos.

2.2.3.3.4. Secuenciamiento Sanger

Los amplicones ya purificados fueron enviados por DHL-Express a MACROGEN-USA para el secuenciamiento Sanger en doble dirección (forward y reverse).

#### 2.2.3.3.5. Ensamblaje de secuencias y Blast

Las secuencias de cada cepa se componen de un forward y un reverse. Ambas fueron ensambladas usando la herramienta ClustalW disponible en el software Bioedit.

Las secuencias del gen RNAr 16S de las cepas nativas, obtenidas de la secuenciación, se analizaron y comparado en el GenBank individualmente, con ayuda del algoritmo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), seguidamente se obtuvo el porcentaje de similitud con otras especies.

### 2.2.4. *Construcción y ejecución de las celdas*

#### 2.2.4.1. Construcción de la celda de combustible microbiana

El diseño de la cámara de combustible microbiana se basó en un modelo tipo H (50). Para la estructura se siguieron los siguientes principios:

- Los gastos para la elaboración de la celda de combustible microbiana deben ser los mínimos posibles.
- Al igual que en los gastos de la elaboración, los gastos de la ejecución deben ser bajos, ya que lo que se quiere es comprobar que los microorganismos empleados y el sustrato van a llegar a producir más energía que la que gastan.
- No se va a hacer uso de termostatos, bombas o aireación, ya que lo que se pretende es que la celda de combustible funcione óptimamente a temperatura ambiente y condiciones normales.

Se eligió un diseño de dos cámaras presentado Logan en 2007, y se eligió como membrana de intercambio al Nafion 117, considerada especial para este tipo de sistemas (17).

El material elegido para ambas celdas tanto anódica como catódica, tenía que ser un material que no conduzca electricidad; ya que esto reduciría la eficiencia de la celda, además tiene que ser módico, duradero y reciclable. Los tapers herméticos de plástico cumplen con la mayoría de estas características, por lo que se decidió con este material.

Las celdas de combustible microbianas fueron hechas con tapers herméticos de plástico con dimensiones de 8 cm de cada lado y un espesor de material de 6 mm, siendo las dimensiones las mismas para la cámara anódica y catódica. En medio de las dos cámaras se creó el espacio necesario, con tubos y uniones, donde se va a encontrar la membrana de intercambio; el material elegido para los electrodos fue grafito de alta densidad y se usaron diferentes tipos de resistencias para ver si el desempeño variaba (470  $\Omega$ , 500  $\Omega$ , 510  $\Omega$ , 560  $\Omega$ , y una celda sin resistencia). En la Figura 12. se puede observar la cámara previa al ensamble del puente para la membrana.



Figura 12. Celdas listas para el ensamble total de la CCM, donde se puede visualizar el puente donde se encuentra la membrana de Nafion.

Todas las dimensiones, medidas o especificaciones se detallaron en un Autocad que figura en el Anexo 3, teniendo así dos cámaras de 8 cm cada lado y manteniendo un espesor igual de 6 mm.

Las celdas de combustible microbianas se desempeñan mejor con la ausencia de oxígeno en la cámara anódica, por lo que se selló esta cámara con Parafilm, dejando la cámara catódica sin sellar.

#### 2.2.4.2. Preparación del sustrato y el agua catódica

El sustrato en nuestro diseño experimental fue el mismo “lodo activado” de relave minero. Para el agua catódica se utilizó ferricianuro de potasio en proporción de 2.5 gramos por cada 1700 mL de agua destilada (Figura 13.).



Figura 13. Ferricianuro de Potasio disuelto en agua, dentro de una celda de combustible microbiana.

#### 2.2.4.3. Preparación del electrodo

El tamaño de los electrodos que se decidió tomar fue de 25 mm de ancho por 50 mm de largo, obtenidos de una plancha de grafito y conectados por un cable de 220 mm de largo que va a unir la celda al adquisidor como se puede observar en la Figura 14. Antes de instalarlos a la cámara se midió la resistencia con un Multiparámetro a modo de ver si existía conductividad.

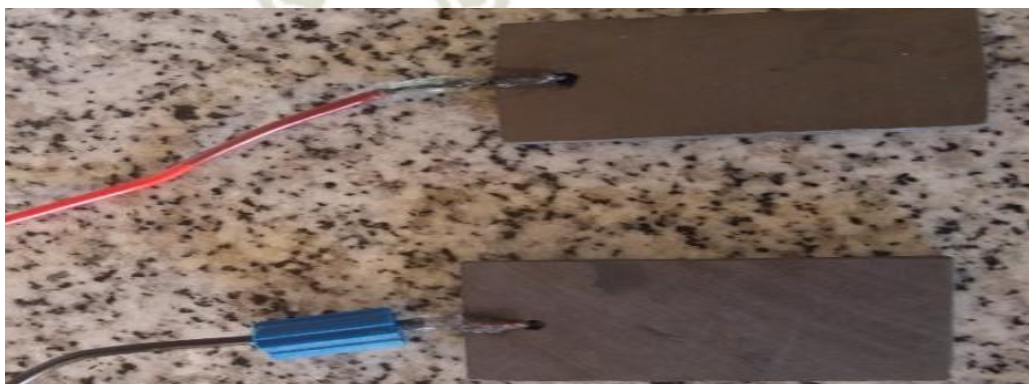


Figura 14. Electrodo de grafito empleado en la Celda de combustible microbiana.

#### 2.2.4.4. Membrana de Nafion 117

Se usó esta membrana ya que es muy empleada en el campo de las CCM, estas membranas fueron obtenidas de la empresa Fuel Cell Store de EEUU.

Para activar la membrana se determinó el área de la misma que fue de 3 cm X 3 cm, para luego seguir con el procedimiento estándar de 1 hora en una solución de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3% a 80 °C (Figura 15.), 1 hora en agua desionizada a 80 °C para remover las trazas de peróxido de hidrogeno, 1 hora en ácido sulfúrico 3M a 80 °C y finalmente 1 hora en agua des ionizada a 80 °C (65). Se guardó la membrana en recipientes cerrados con agua desionizada a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

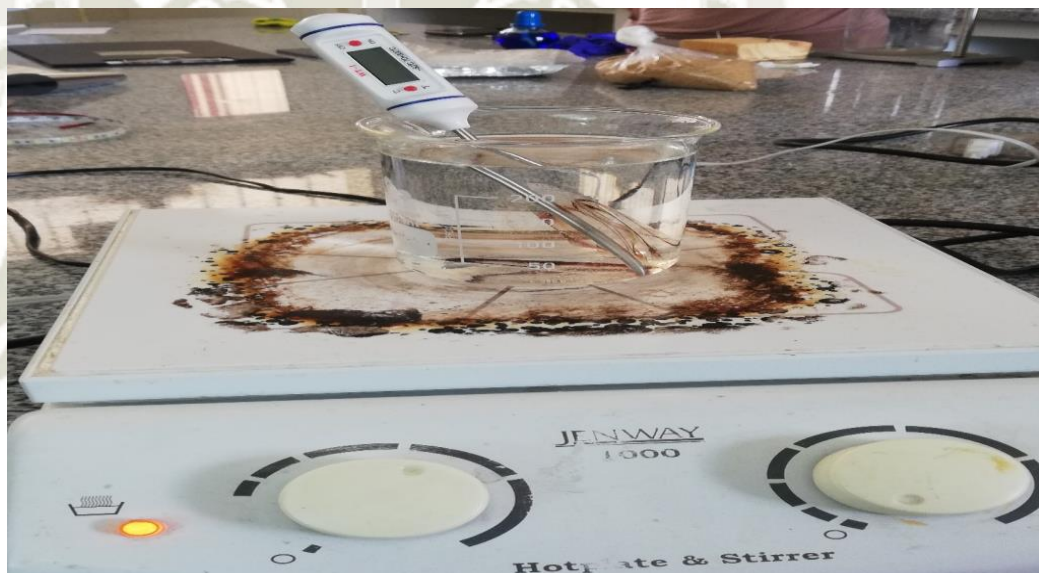


Figura 15. Primer paso para la activación de la Membrana de Nafion 117 (1 hora en una solución de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3% a 80 °C).

#### 2.2.4.5. Monitoreo de la ejecución de la celda de combustible microbiana

El desempeño de las CCM fue determinado por su voltaje (V), corriente eléctrica (I), potencia eléctrica (P), densidad de corriente (J) y densidad de potencia (P/A electrodo) (66).

Para obtener los datos se usaron dos equipos:

Un multímetro (Multímetro Keysight 34461) (Figura 16.), que al estar conectado a las resistencias externas (470  $\Omega$ , 500  $\Omega$ , 510  $\Omega$ , 560  $\Omega$  y sin resistencia), se pudo registrar el potencial de la celda, es decir el voltaje, en el periodo de operación.



Figura 16. Multímetro Keysight 34461 a exactitud básica % CD, 0.06 AC.

Un adquirente de datos (Data Loggers) (Figura 17.), este equipo nos ayuda a almacenar los datos obtenidos en el multímetro.



Figura 17. Sistema de monitoreo adquirente Keysight 34972.

#### 2.2.4.5.1. Determinación de Voltaje e Intensidad

Esta magnitud expresado como trabajo por unidad de carga ejercido por el campo sobre una partícula cargada para mover entre dos posiciones determinadas (cámara anódica y cámara catódica), donde no influye la longitud del camino recorrido por el electrón, marcando solo el potencial eléctrico de ambos puntos en el campo eléctrico.

Los datos del voltaje, también especificado como la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos, producidos se obtuvieron a partir del

adquisidor de datos empleado. Y para obtener la intensidad de corriente se utilizó la ley de Ohm.

$$I = \frac{V}{R_{\text{ext}}} = \frac{Q}{t} \quad [4]$$

Donde:

V= Voltaje (V)

I= Corriente eléctrica (A)

$R_{\text{ext}}$ = Resistencia Externa ( $\Omega$ )

Q= Carga (Coulomb)

t= Tiempo (s)

#### 2.2.4.5.2. Determinación de la potencia

La potencia viene a ser la relación de paso de energía de un flujo por unidad de tiempo, es decir, la cantidad de energía entregada en un periodo de tiempo determinado. Esta magnitud se calculó con ayuda de los resultados de voltaje e intensidad de corriente, según la fórmula para corriente continua, donde P es la potencia en watts, I es la intensidad de corriente en amperios y V es el voltaje en voltios (22).

$$P = V \times I = \frac{V^2}{R_{\text{ext}}} = I^2 \times R_{\text{ext}} \quad [5]$$

Donde:

P= Potencia (W) (1 Watt= 1 Joule/s)

V= Voltaje (V)

I= Corriente eléctrica (A)

$R_{\text{ext}}$ = Resistencia Externa ( $\Omega$ )

#### 2.2.4.5.3. Determinación de densidad de potencia

Es la potencia ejercida por cada  $m_2$  de ánodo, esta se calculó dividiendo la potencia calculada entre el área total de ánodo, expresándose en Watts/ $m^2$  (22).

$$A = 2\pi \times h \quad [6]$$

$$DP = \frac{V^2}{AR_{ext}} = \frac{P}{A} \quad [7]$$

Donde:

DP= Densidad de potencia ( $W/m^2$ )

V= Voltaje (V)

P= Potencia (W)

A=Área del electrodo ( $m^2$ )

$R_{ext}$ = Resistencia Externa ( $\Omega$ )

#### 2.2.4.5.4. Determinación de densidad de corriente

La densidad de corriente es los amperios producidos por cada  $m_2$  de ánodo, esta se calculó dividiendo la intensidad en amperios hallada entre el área total de ánodo, expresándose en  $A/m^2$ .

$$A = 2\pi \times h \quad [8]$$

$$DC = \frac{q}{At} = \left(\frac{1}{a}\right) \times \left(\frac{q}{t}\right) = \frac{I}{A} \quad [9]$$

Donde:

DC= Densidad de corriente ( $A/m^2$ )

I = corriente eléctrica (A)

A = área del electrodo ( $m^2$ )

#### 2.2.4.5.5. Determinación de la energía total producida

La determinación de la energía total (W, Joule) es la energía que logra generar el consorcio microbiano usando el sustrato único.

$$W = \left(\int_0^t \frac{V^2}{R_{ext}} dt\right) \left(\frac{R_{ext} + R_{int}}{R_{int}}\right) \quad [10]$$

Donde:

W= Energía experimental (J)

$\left(\int_0^t \frac{V^2}{R_{ext}} dt\right)$ = Energía real generada durante el periodo de tiempo (t) = P.

T

$V$  = Voltaje de salida de la CCM (V)

$R_{\text{int}}$  = Resistencia interna ( $\Omega$ )

$R_{\text{ext}}$  = Resistencia externa ( $\Omega$ )

$t$  = tiempo de reacción o ciclo de operación de l

La energía producida se calcula multiplicando el valor de potencia por el tiempo del funcionamiento de la CCM. Como no se tiene una potencia constante, se trabaja con cada valor individualmente y se toma al final la suma de todos estos valores (22).

$$W = P1 + P2 + P2 + \dots .PN$$

#### 2.2.4.6. Comparación de las características fisicoquímicas del relave minero antes y después de ser empleado en una celda de combustible microbiana.

Después de ser ejecutada las celdas de combustible microbianas, se volvió a analizar la concentración de estos metales, para poder identificar si alguno de ellos había incrementado o disminuido durante el uso de la CCM, realizando así un análisis más detallado posteriormente.

La caracterización de los metales presentes, después del tratamiento en la celda de combustible microbianas, se realizó en el Laboratorio de ensayo y control de calidad de la Universidad Católica de Santa María. Se dispuso 50 mL de muestra en un frasco estéril, esta muestra era homogénea y obtenida al instante de desconectada la celda.

#### 2.2.4.7. Análisis de resultados

Todos los datos obtenidos fueron registrados en el programa de Excel, y para las pruebas de comparación se utilizó el mismo Excel, realizando un ANOVA y una prueba de TUKEY (67).

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización de la composición del relave minero

Después de mandar la muestra al Laboratorio designado, se obtuvieron la determinación de los metales totales en mg/L de lodo activado. Se tomaron en cuenta los metales que se extraen en la minera Porvenir S.A.C, se observa en el informe de memoria anual 2017 la información suficiente respecto al desarrollo de la Mina.

Este documento indica que la producción de la mina Porvenir S.A.C es de concentrados de zinc, cobre y plomo con contenidos de oro y plata (Tabla 5.); por ello es que se van a seleccionar esos metales para el análisis respectivo. En el Anexo 4 se visualiza el informe del ensayo de metales realizado en el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María antes de estar en una CCM y después de la misma (68).

Tabla 5. Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM.

ANÁLISIS	RESULTADO ANTES DE LA CCM	LMP PARA LA DESCARGA DE EFLUENTES LIQUIDOS DE ACTIVIDADES MINERAS
Plata (Ag)	0.038 mg/L	0.002 mg/L
Cobre (Cu)	5.285 mg/L	0.05 mg/L
Plomo (Pb)	10.360 mg/L	0.2 mg/L
Zinc (Zn)	8.173 mg/L	1.5 mg/L

Como se puede observar la concentración de los metales es alta comparado con los límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos en actividades mineras, teniendo como valores elevados la presencia del cobre y plomo; esto nos indica que si se tienen organismos dentro de ellos, estos pueden resistir las concentraciones grandes de estos metales. Como se puede ver estos resultados elevados, nos confirman que nuestra muestra si es un residuo proveniente de una minera, por los valores de metales tan significativos.

Posterior a la experimentación realizada en la celda de combustible microbiana, se volvió a analizar la concentración de estos metales, para poder identificar si existió alguna variación en sus concentraciones durante el uso de la CCM, realizando así un análisis más detallado posteriormente.

### 3.2. Aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos presentes en el relave minero

#### 3.2.1. Caracterización Morfológica o Macroscópica de los microorganismos del relave minero

Después del aislamiento y siembra de la cepa en medio agar nutritivo, se realizó una caracterización macroscópica, donde se observaron las características de cada colonia, marcando así todas las cepas diferentes que se obtuvieron de los diferentes tratamientos, siendo cinco colonias definidas las que conforman el consorcio microbiano. Se sembró cada cepa por separado en una placa Petri con agar nutritivo, por el método microbiológico de siembra por estría donde con el asa de kolle en la superficie del agar se extiende haciendo un camino estriado.

Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente se obtuvo todas las colonias con las características detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6. Vista Macroscópica de las cepas aisladas.

<b>AGAR EN SUPERFICIE</b>					
	<b>CEPA 1</b>	<b>CEPA 2</b>	<b>CEPA 3</b>	<b>CEPA 4</b>	<b>CEPA 5</b>
<i>Forma</i>	Circular	Circular	Redondas	Ovalada	Lisa
<i>Borde</i>	Irregular	Entero	Irregulares	Regular	Entero
<i>Superficie</i>	Acuminada	Convexa	Plana	Elevada	Convexa
<i>Color</i>	Rosa claro	Rojo	Anaranjado claro	Transparente amarillo brillante	Amarillo intenso

En las siguientes Figuras 18., 19., 20., 21. y 22. Se puede observar las diferentes colonias elegidas para hacer el repique y mandar a secuenciar.

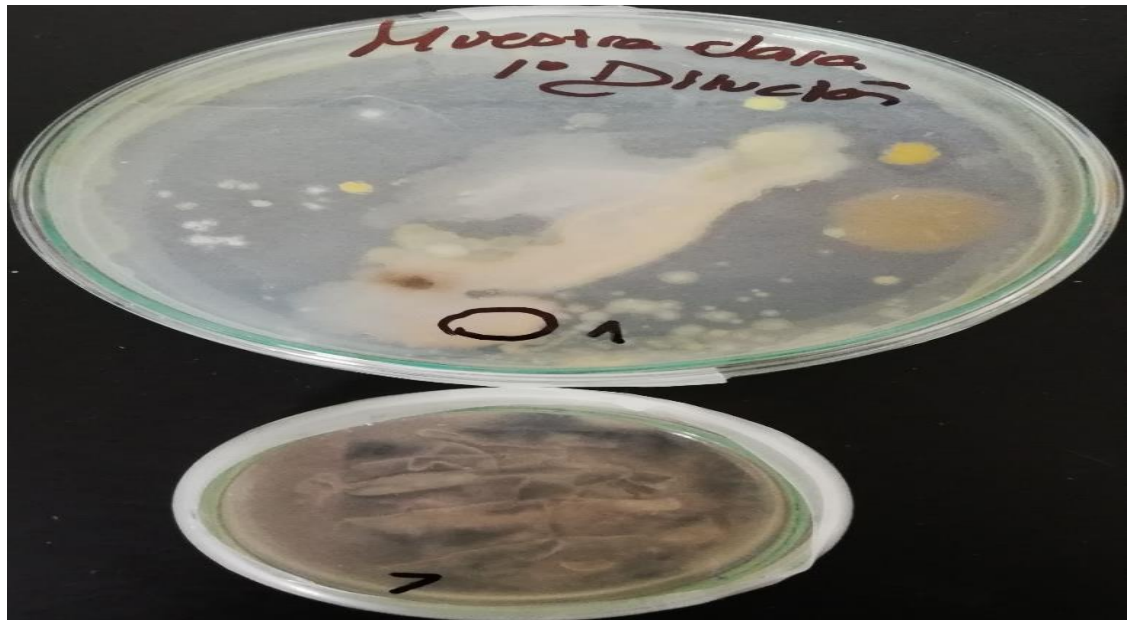


Figura 18. Vista macroscópica de la Cepa 1. Colonia rosa claro con una forma circular, incubada a 37 °C por 5 días.

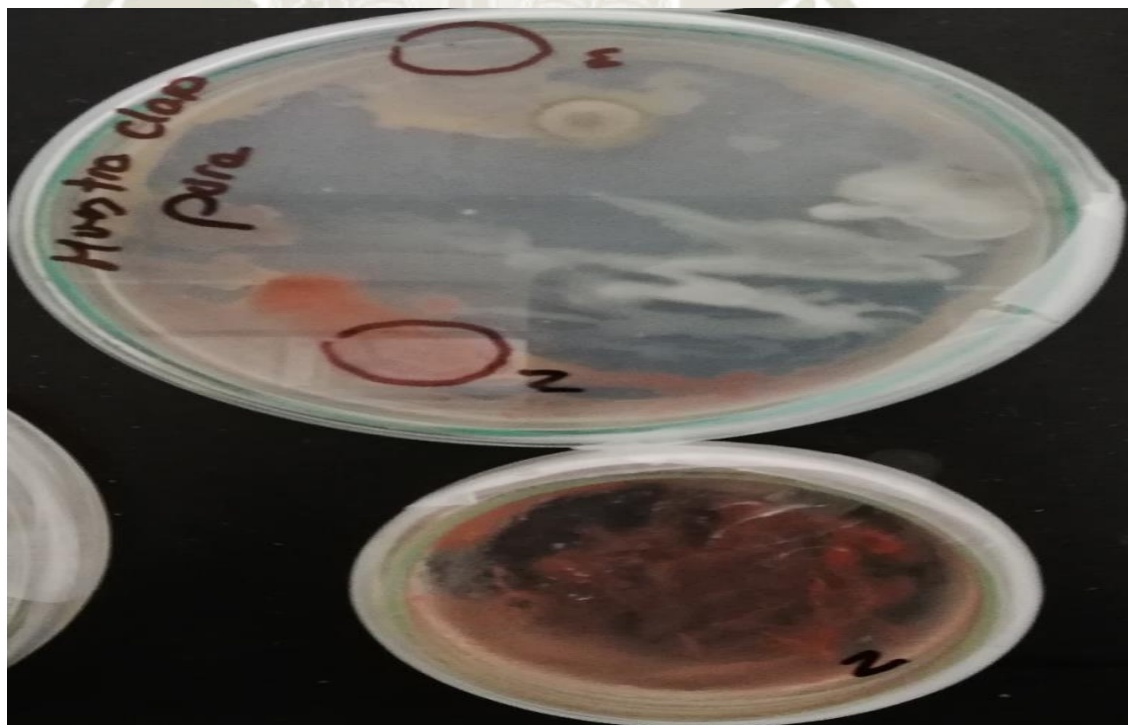


Figura 19. Vista macroscópica de la Cepa 2. Colonia roja con una forma circular, incubada a 37 °C por 5 días.

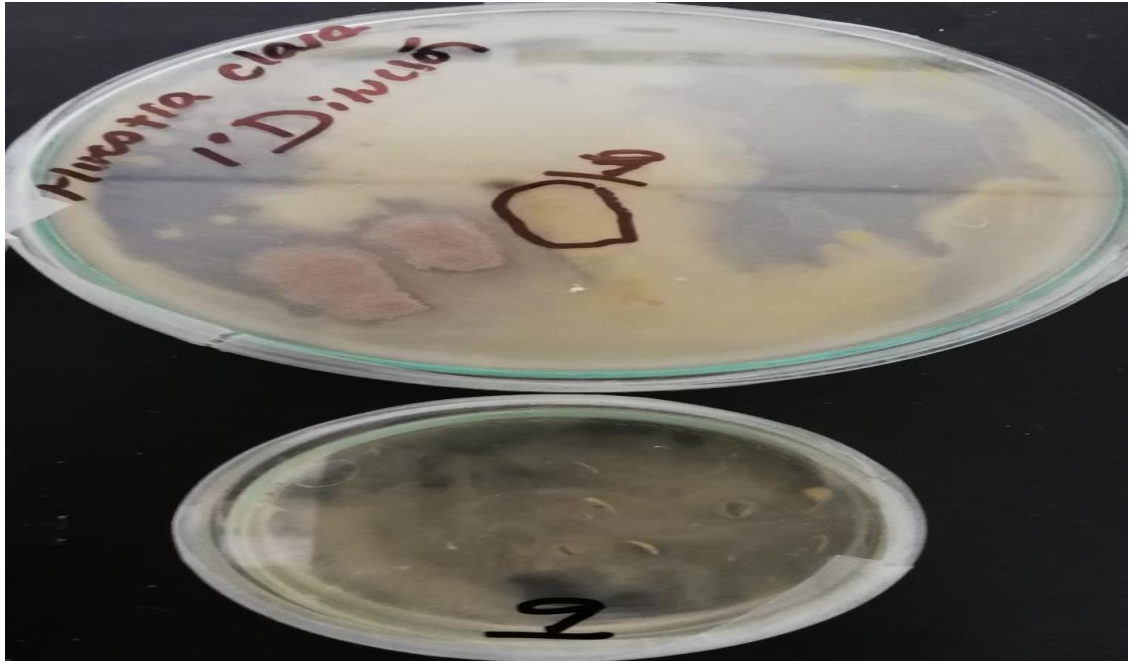


Figura 20. Vista macroscópica de la Cepa 3. Colonia anaranjada clara con una forma redonda, incubada a 37 °C por 5 días.

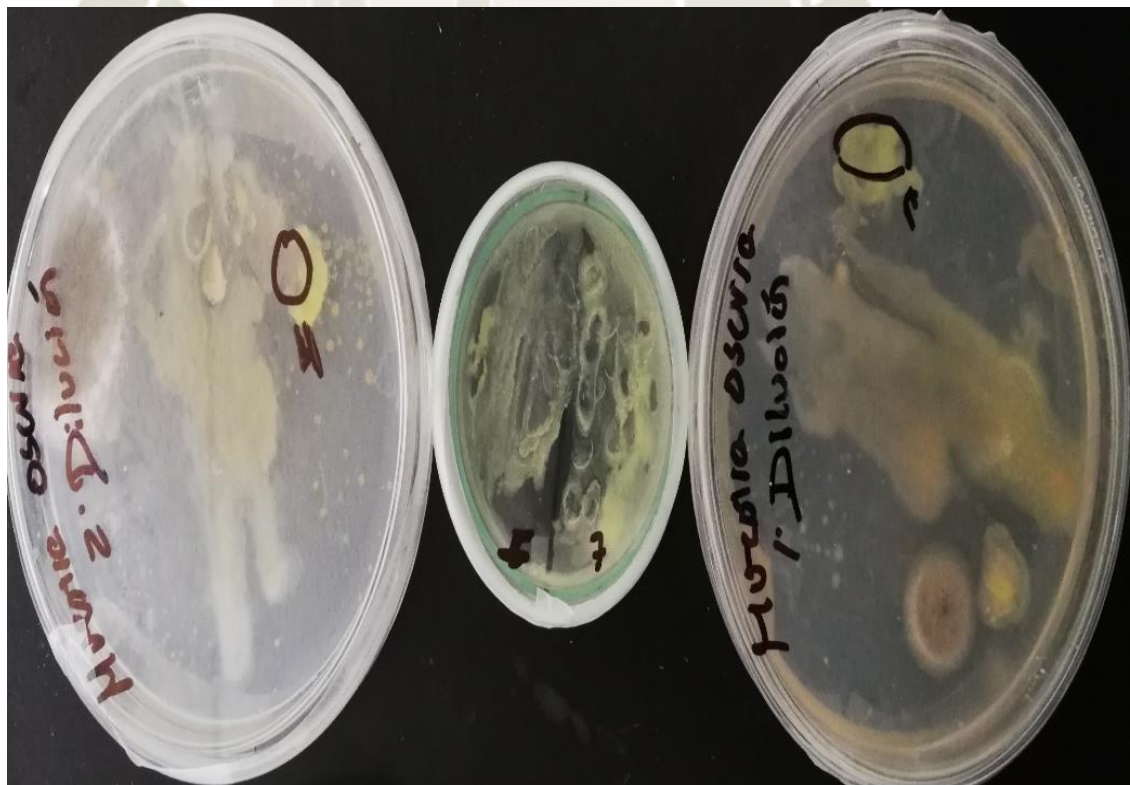


Figura 21. Vista macroscópica de la Cepa 4. Colonia transparente amarillo brillante con una forma ovalada, incubada a 37 °C por 5 días.

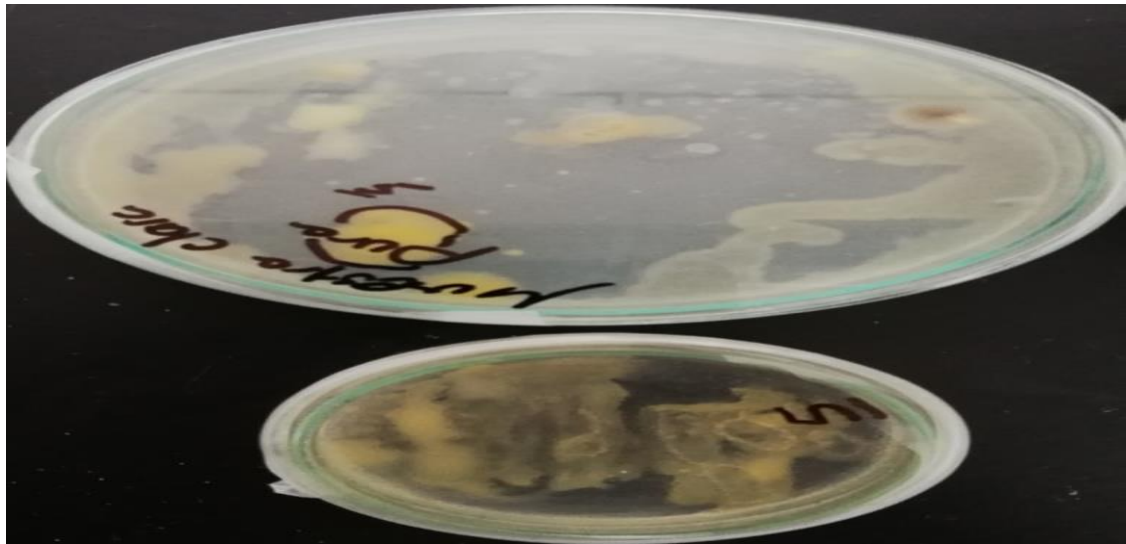


Figura 22. Vista macroscópica de la Cepa 5. Colonia amarilla intensa con una forma lisa, incubada a 37 °C por 5 días.

### 3.2.2. Caracterización e Identificación Molecular de los microorganismos del relave minero

#### 3.2.2.1. Amplificación (PCR) de la región barcode para bacterias (16s)

- PCR 1: Se probaron los primers de Takahashi (Pro341F y Pro05R). Se probaron dos concentraciones de ADN (1 ng vs 5 ng). Las cepas 1 y 2 amplificaron con éxito a 5ng de ADN por reacción mientras que las otras cepas tuvieron amplificación deficiente.

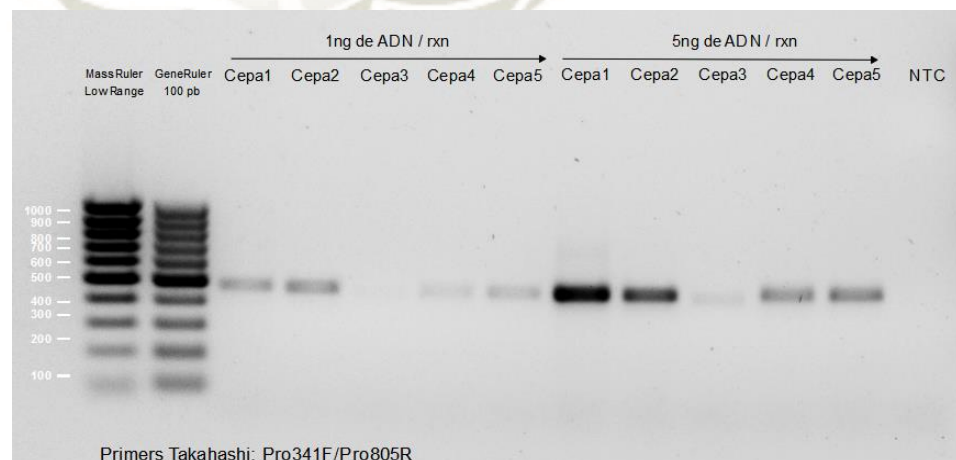


Figura 23. Electroforesis de la PCR 1 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de cada cepa.

- PCR 2: Se repitió la reacción para las cepas 3, 4 y 5 comparando 5 y 10 ng de ADN por reacción. Las cepa 3 no amplificó y la cepa 5 no amplificó bien. La cepa 4 sí amplificó a 10ng.

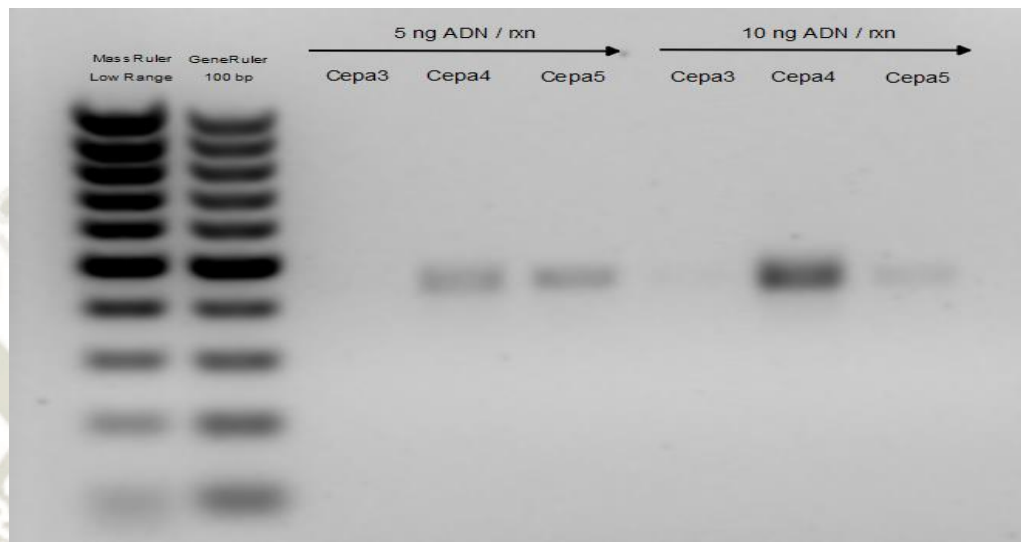


Figura 24. Electroforesis de la PCR 2 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de las cepas 3, 4 y 5.

- PCR 3: Se repitió nuevamente el PCR para las cepas 3 y 5 usando ADN's que se trataron con el kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (Qiagen). Se compararon 5ng y 10ng de ADN por reacción. La amplificación mejoró.

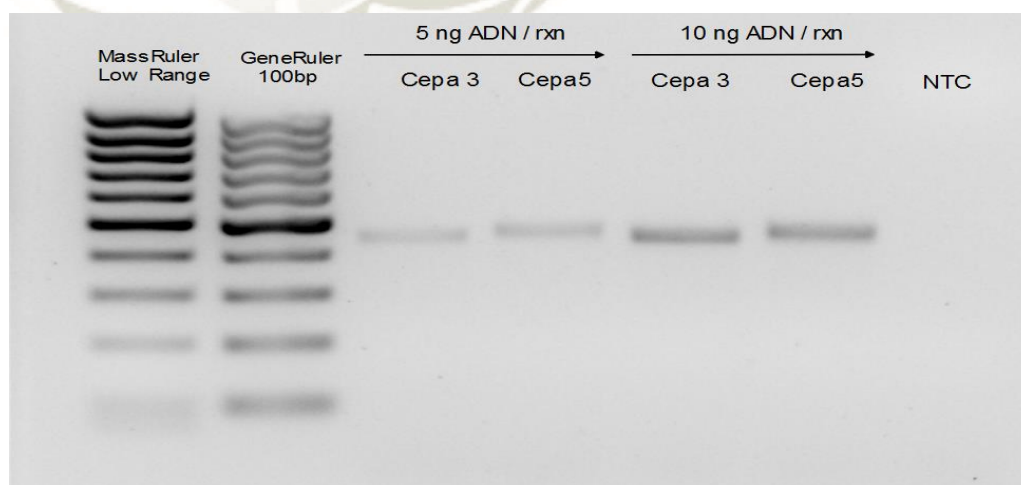


Figura 25. Electroforesis de la PCR 3 en gel de agarosa al 3%, cargando 5 y 10 ng de ADN de las cepas 3 y 5.

- PCR 4: Se repitió nuevamente la reacción para las cepas 3 y 5 usando el ADN purificado con el kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit (Qiagen) y subiendo la concentración a 15 ng por reacción. Las bandas mejoraron.

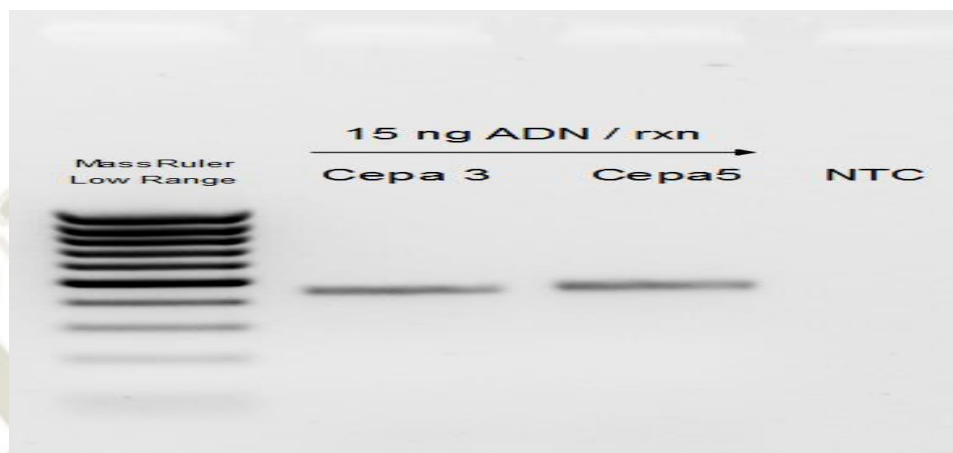


Figura 26. Electroforesis de la PCR 4 en gel de agarosa al 3%, cargando 15 ng de ADN de las cepas 3 y 5.

### 3.2.2.2. Secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa bacteriana

La secuencia enviada por la empresa BioAl de cada cepa fue:

- Cepa 1: *Serratia sp.*  
GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC  
TGGGCGTAAAGCGCGCGCCGGGGTCTGTTAAGTCAGATGTG  
AAATCCCCGAGCTTAACNTGGGAATTGCATTTGATACTGGCA  
GGCTAGAGTATGGTAGAGGAGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG  
CGC
- Cepa 2: *Erwinia sp.*  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT  
GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTC  
AGCGGGGAGGAAGGGGATGAGGTTAATAACCTCGTTCATTGA  
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG

GGCGTAAAGCGCACGCAGGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAA  
ATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGG  
CTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG  
GCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAG

- Cepa 3: *Rhodococcus* sp.

GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGAC  
GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTC  
AGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT  
GCAAGCGTTGTCCGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGG  
CGGTTTGTGCGGTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTG  
GCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGA  
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA  
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGAC  
GCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTA

- Cepa 4: *Agrobacterium* sp.

AATGGGCGCAAGCNTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATG  
ACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACT  
GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGA  
AATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTAT  
CTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATTGCGAGTGTAGAGGT  
GAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCATTGGCGAAGGCGG  
CTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGA

- Cepa 5: Acinetobacter sp.

```
CAGTGGGGAATCTTGGCTAATGGGCGGAAGCCTGATCCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTT
AAGCGAGGAGGAGGCTCCTTTAGTTAATACCTAAAGAGAGTG
GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTAAATCGGATTTAC
TGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTG
AAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAATTGCATTCGATACTGGAA
AGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
CAGCCATCTGGCCTGA
```

### 3.2.2.3. Análisis bioinformático de la secuencia

Como muestran investigaciones de Goujon, Morgulis y Zhang; mediante el uso del programa Bioinformático, BLAST, se va a lograr determinar según la secuencia del gen ribosomal 16S, a que bacteria pertenecían nuestras cepas, o a que microorganismos se asemejaban más (69) (70) (71). Resultado obtenido por el porcentaje de identidad y su score de cada una de cepas analizadas.

Fueron 5 las cepas aisladas que se mandaron a secuenciar al laboratorio BioAI para su identificación molecular, obteniendo los siguientes resultados.

Una vez realizado el análisis mediante el BLAST se determinó que: adicionalmente a partir de los resultados antes descritos se encontraron los microorganismos con mayor similitud, cuyos datos en resumen, basándonos en el porcentaje de identidad y score, los resultados se muestran en las siguientes Tablas 7., 8., 9., 10. y 11.

Tabla 7. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 1.

N°	DESCRIPCIÓN	MAX SCORE	% IDENTIDAD	ACCESSION
1	<i>Serratia plymuthica</i> strain 31upmr 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	403	95.26%	KJ729609.1
2	<i>Serratia fonticola</i> strain 4snr 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	403	95.26%	KJ577597.1
3	Uncultured Enterobacteriaceae bacterium partial 16S rRNA gene, isolate OTU829	401	95.24%	LT857511.1
4	<i>Gibbsiella</i> sp. Strain E13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	398	94.86%	MK490968.1

Tabla 8. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 2.

N°	DESCRIPCIÓN	MAX SCORE	% IDENTIDAD	ACCESSION
1	<i>Erwinia</i> sp. Strain KUDC3016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	804	100%	MK070134.1
2	<i>Erwinia</i> sp. Strain KUDC3014 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	804	100%	MK070133.1
3	<i>Pantoea</i> sp. Strain B44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	804	100%	MK229056.1
4	<i>Pantoea</i> sp. Strain P32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	804	100%	KY084473.1

Tabla 9. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 3.

N°	DESCRIPCIÓN	MAX SCORE	% IDENTIDAD	ACCESSION
1	Rhodococcus sp. Strain HSW1-54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	765	100%	MK995554.1
2	Rhodococcus sp. Strain D4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	765	100%	MK967820.1
3	Rhodococcus erythropolis strain B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	765	100%	MK929472.1
4	Bacterium strain A3A3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	765	100%	MK886619.1

Tabla 10. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 4.

N°	DESCRIPCIÓN	MAX SCORE	% IDENTIDAD	ACCESSION
1	Agrobacterium larrymoorei strain LB211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	712	99.49%	MK999936.1
2	Agrobacterium sp. RZME10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	712	99.49%	MK940276.1
3	Agrobacterium larrymoorei strain CFBP5473 chromosome linear.	2136	99.49%	CP039692.1
4	Agrobacterium larrymoorei strain CFBP5473 chromosome circular.	1424	99.49%	CP039691.1

Tabla 11. Bacterias con mayor similitud con la Cepa 5.

N°	DESCRIPCIÓN	MAX SCORE	% IDENTIDAD	ACCESSION
1	Acinetobacter schindleri strain ADT4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	99.23%	MH304272.1
2	Acinetobacter schindleri strain ADT2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	99.23%	MH301309.1
3	Acinetobacter sp. Strain TAGEM15-70-B21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	99.23%	MG685814.1
4	Acinetobacter johnsonii strain TAGEM15-70-B20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	99.23%	MG685688.1

Todos los datos anteriores de cada cepa han sido obtenidos a partir de los reportes TAX BLAST y BLAST de cada bacteria.

Las cepas encontradas en esta investigación, son nuevas en el uso de celdas de combustible microbianas, la mayoría de investigaciones de CCM's trabajan inoculando la cepa, que por investigaciones anteriores ya se sabe que van a generar electricidad, además que colocar sustrato para la bacteria. En el caso de esta investigación lo que se quería comprobar es que usando el mismo consorcio microbiano del relave se logre generar electricidad y reducir también las concentraciones de metales presente en el relave minero; cumpliendo así una doble función.

### 3.3. Construcción y ejecución de las celdas

Para el correcto diseño de la celda se usó principios básicos para su correcto funcionamiento, como:

- El uso de un material inerte o inactivo para evitar conducción de carga extra.
- La estructura de la celda no va a necesitar bombas, ahorrando así recursos, eligiendo un sistema tipo Batch y a temperatura ambiente.
- El uso de un material inerte es debido a que, al ser conductor, disminuiría la eficiencia de la celda por completo; también tiene que ser duradero, no corrosivo y reciclable. Por ello es que como material de las cámaras se eligió el plástico, ya que además que se adecúa con la mayoría de condiciones, al ser un material transparente va a permitir ver lo que ocurre en el sistema.

Se construyó el prototipo de tapers de plástico herméticos con las dimensiones mencionadas anteriormente:

- 6 mm de espesor
- 8 cm a cada lado

El volumen de cada una de las cámaras fue de 500 mL, y estas mismas cámaras unidas por la membrana de NaftionR de 3 cm<sup>2</sup>, como se puede observar en la Figura 27. Aparte de ello se tiene la salida de los cables que conecta a los electrodos con las resistencias externas.



Figura 27. Diseño del prototipo final y totalmente ensamblado para su uso como CCM.

El material utilizado para los electrodos fue el grafito de alta densidad, usando dimensiones de 25 mm de ancho por 50 mm de largo y un área superficial de 125 mm<sup>2</sup>. Todo se manejó a temperatura ambiente.

En la Tabla 12. Se indica los parámetros del diseño de la celda de combustible microbiana, operando a temperatura ambiente y usando como inóculo todo el consorcio microbiano del lodo activado.

Tabla 12. Parámetros del Diseño de una Celda de combustible microbiana.

<b>PARÁMETROS DEL DISEÑO DE LA CCM</b>	
<i>Cámara catódica</i>	Solución de Ferricianuro de potasio
<i>Inoculo del ánodo</i>	Consorcio microbiano (Relave minero o lodo activado)
<i>Volumen del ánodo y cátodo (mL)</i>	500
<i>Material de ánodo y cátodo</i>	Placas de grafito de alta densidad
<i>Superficie del área de los electrodos (mm<sup>2</sup>)</i>	125
<i>Membrana</i>	Naftion
<i>Temperatura de operación</i>	Temperatura ambiente
<i>Resistencias empleadas</i>	470 Ω, 500 Ω, 510 Ω y 560 Ω

La elección de grafito de alta densidad es debido a que posee la capacidad de conductividad necesaria y no es corrosivo, además que según bibliografía es el mejor material en torno a rendimiento y conductividad en las CCM's, es por ello que se usó para los electrodos del mismo tamaño en cada cámara de la celda.

### 3.3.1. Sistema bioelectroquímico

Todo el sistema consta de dos cámaras (anódica y catódica) hechas de material acrílico con un volumen total de 500 mL, los electrodos diseñados de grafito de alta densidad con una superficie de 125 mm<sup>2</sup>. Las cámaras unidas a través de la membrana de Nafion 117 de 3 cm<sup>2</sup>. Se cuenta con caimanes con cables de cobre para conectar con los electrodos a las resistencias que se encuentran en la parte externa, al multímetro y al dispositivo de adquisición de datos (Figura 28.).



Figura 28. Celdas de combustible microbianas en operación.

### 3.3.2. *Evaluación de la generación de electricidad*

#### 3.3.2.1. Determinación de voltaje

Se buscó determinar el rendimiento de nuestras CCM's empleando diferentes resistencias, por ello se manejó todo el sistema por separado con cada resistencia comparando así los resultados entre ellas. Se realizaron 5 gráficos diferentes mostrando en cada uno su generación de electricidad a través del tiempo, así tenemos:

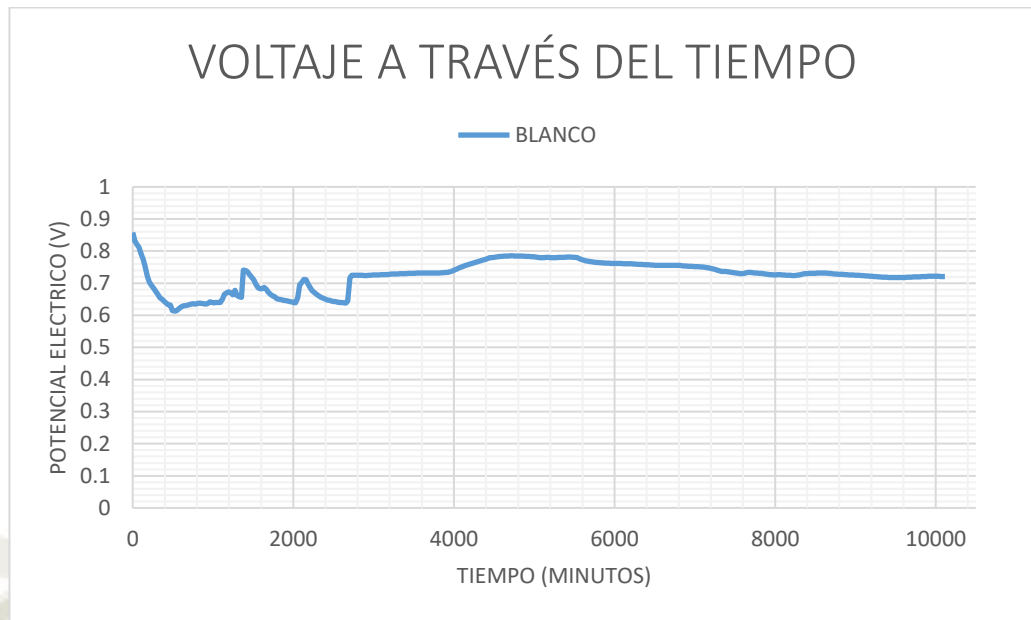


Figura 29. Resultados de la evaluación del efecto del consorcio microbiano en términos de voltaje sin el uso de resistencia externa.

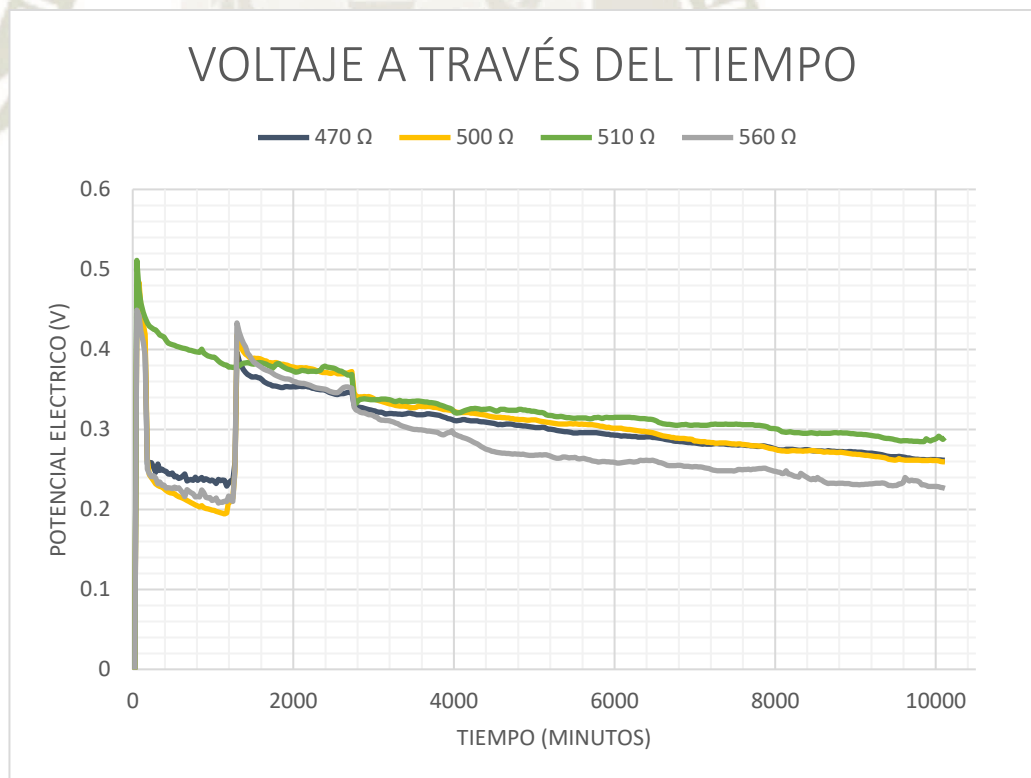


Figura 30. Resultados de la evaluación del efecto del consorcio microbiano en términos de voltaje con el uso de las diferentes resistencias.

En estos gráficos se puede observar que si hubo un rendimiento, notable más que todo en la CCM que no tenía resistencia, y en las demás celdas mostrando picos de hasta 0.51 voltios poco tiempo después que es conectado, esto puede ser debido al uso de los metales como sustrato donde la bacteria ha podido desarrollar una respiración celular óptima y se torna constante con el tiempo, ya que fue monitoreado por 54.652 minutos. Se ha podido comprobar que el consorcio microbiano encontrado dentro de este lodo activo ha tenido un buen rendimiento de energía, a pesar de las diferentes resistencias empleadas. Los picos máximos de cada una de las celdas de combustible microbiana no fueron muy variable con las diferentes resistencias, pero si se encontró una diferencia considerable en comparación con la celda sin presencia de resistencia externa (0.85 voltios), como se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 13. Resultados Máximos en torno al Voltaje de cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas.

<b>PICO MÁXIMO DE VOLTAJE</b>	
<i>Sin Resistencia</i>	0.8580
<i>Resistencia externa 470 Ω</i>	0.4617
<i>Resistencia externa 500 Ω</i>	0.4836
<i>Resistencia externa 510 Ω</i>	0.5112
<i>Resistencia externa 560 Ω</i>	0.4491

La producción de energía eléctrica por bacterias es un fenómeno derivado de su propio metabolismo, a partir de las reacciones que van a permitir disminuir materia orgánica en la naturaleza. La diferencia principal se ve en la separación del aceptor final de electrones naturales que se encuentran en su ambiente original, el cual es reemplazado en las celdas por un aceptor artificial (electrodos) haciendo así que la única vía de respiración celular sea transfiriendo electrones de la materia orgánica oxidada hacia el ánodo (cámara anódica).

En el caso de nuestras celdas de combustible microbianas, no se representa un fuerte estrés al consorcio microbiano, esto porque la fuente de alimentación se encontraba en el mismo relave minero donde estaba nuestro consorcio, y este mismo estaba adaptado al consumo de los metales presentes en el lodo activo.

Aparte de ello Hassan et al. (2017) (72) realizaron sus experimentos con cepas de *Bacillus subtilis*, obteniendo una densidad de corriente de 64 mA/m<sub>2</sub> en un proceso degradativo del compuesto 2,4 diclorofenol generando una densidad de poder de 9.5 mW/m<sub>2</sub>, donde utilizaron el persulfato de potasio como catolito, llegando a una corriente pico de 1.1 mA sobre un potencial de 0.45 V (72).

### 3.3.2.2. Determinación de intensidad de corriente

El primer parámetro en torno a la producción eléctrica analizado fue el de la intensidad de corriente. El adquisidor de Datos (Keysight Technologies 3472A LX1 Data Acquisition/Switch unit) nos ayudó realizando el registro de la corriente eléctrica en términos de voltaje, logrando obtener con la Ley de Ohm la intensidad respectiva según la resistencia externa colocada.

En esta investigación se utilizaron distintos valores de resistencias externas (470 Ω, 500 Ω, 510 Ω y 560 Ω), y basándonos en artículos donde se trabajaba con valores de resistencias entre 10 y 1000 Ω, dependiendo esencialmente del tipo de celda y el periodo de operación. Es importante recalcar que durante todo el proceso de operación se mantuvo cada celda con su respectiva resistencia.

En las figuras a continuación se muestra la intensidad de la corriente obtenida durante el periodo de la operación de la celda. Cada uno de los puntos representa un valor importante en el amperaje.

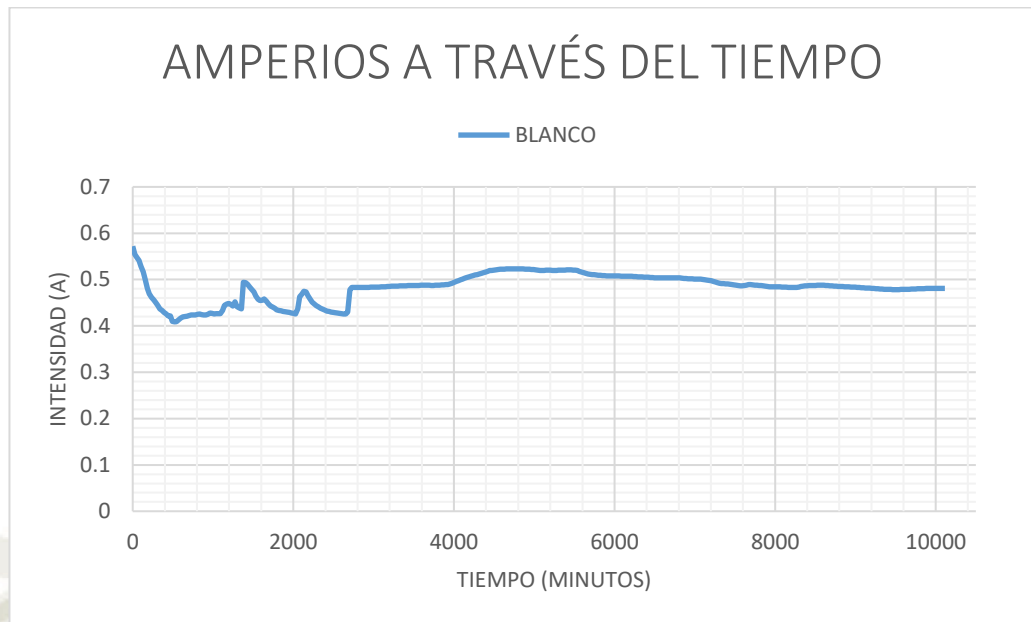


Figura 31. Resultados de la determinación de intensidad de corriente sin el uso de resistencia externa.

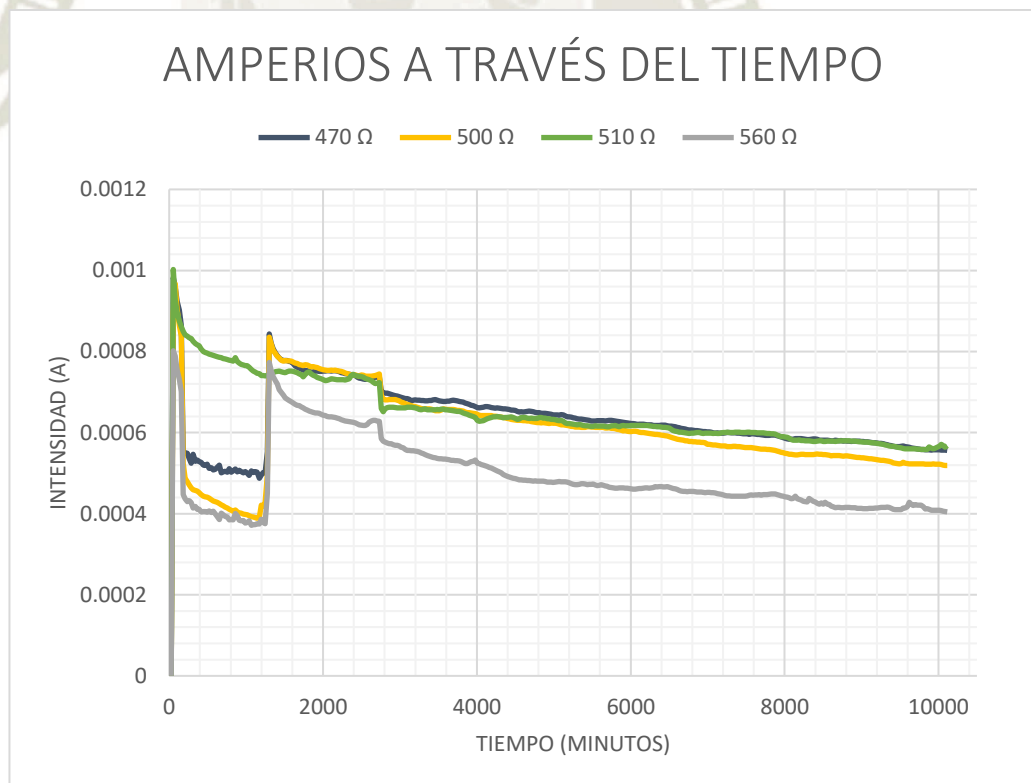


Figura 32. Resultados de la determinación de intensidad de corriente con el uso de las diferentes resistencias.

Se puede observar que desde el inicio de la operación de la celda de combustible microbiana, el amperaje máximo entre las celdas fue cercano a 0.001, y con el transcurso del tiempo se puede ver que casi llega al mismo pico máximo y poco a poco comienza a descender; esto debido a que ya se generaba menos electricidad por falta de sustrato o el consorcio se estaba muriendo. Al último en todas las gráficas ya se ve que decrecen hasta llegar a una fase exponencial y latente.

En la Tabla 11. Se marcan los valores máximos de cada celda de combustible microbiana; mostrando así todo lo recalcado anteriormente, y mostrando que la diferencia entre la celda sin resistencia y las demás, sigue siendo notoria.

Tabla 14. Resultados Máximos de los Amperios generados en cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas.

<b>PICO MÁXIMO DE AMPERIOS</b>	
<i>Sin Resistencia</i>	0.5720
<i>Resistencia externa 470 Ω</i>	0.0010
<i>Resistencia externa 500 Ω</i>	0.0010
<i>Resistencia externa 510 Ω</i>	0.0010
<i>Resistencia externa 560 Ω</i>	0.0008

### 3.3.2.3. Determinación de la potencia

La potencia es la cantidad de energía recibida por un elemento en un tiempo específico, esta se expresa en Watts. En las Figuras siguientes se observa claramente que los picos y curvas tienen el mismo comportamiento que los gráficos anteriores. En la mayoría de investigaciones, el hallar la potencia tiene vital importancia para poder determinar la densidad de potencia (que es más específico ya que está involucrado el ánodo).

Según Logan, el desempeño total de una celda es evaluada de muchas maneras, pero principalmente a través de la potencia (32).

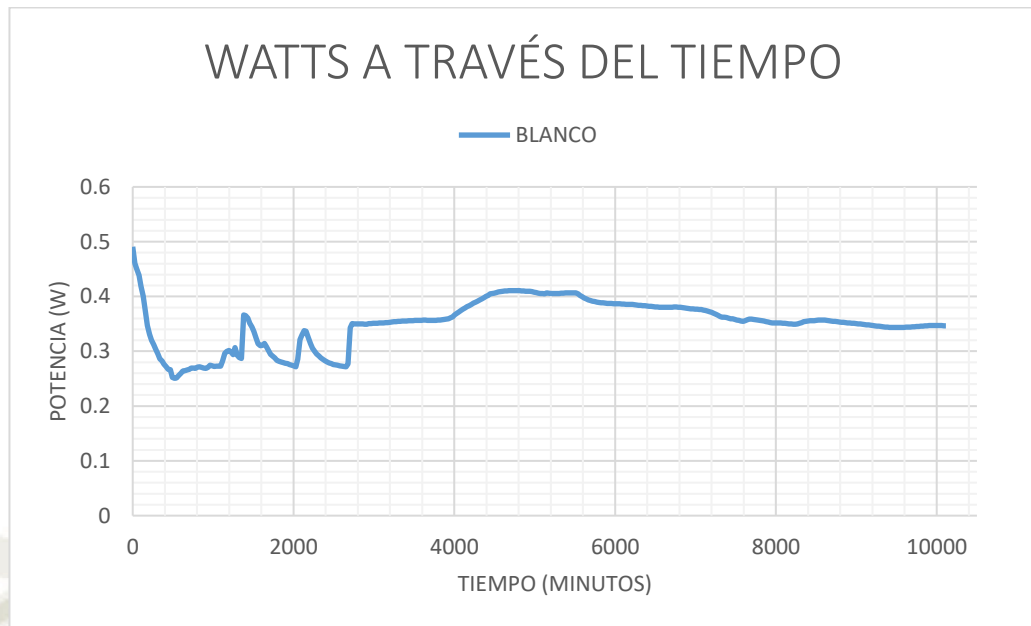


Figura 33. Resultados de la determinación de la potencia sin el uso de resistencia externa.

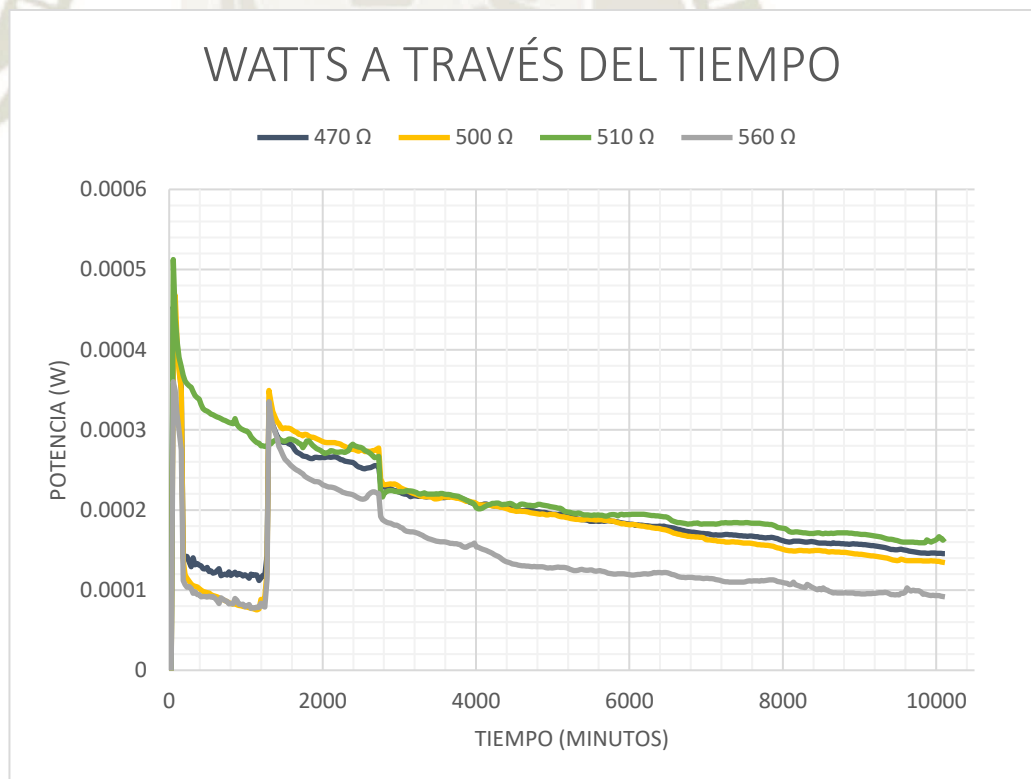


Figura 34. Resultados de la determinación de la potencia con el uso de las diferentes resistencias.

En la Tabla 12. Se marcan los valores máximos de cada celda de combustible microbiana; en esta se puede comprobar que la celda sin resistencia sigue marcándose diferencia muy evidente. Todas las demás celdas de combustible microbianas muestran un poco más de similitud entre ellas recalcando que la celda con resistencia con un valor más alto es la de la celda con resistencia 510  $\Omega$ .

Tabla 15. Resultados Máximos de los Watts generados en cada Celda de combustible microbiana con el empleo de las diferentes resistencias externas.

<b>PICO MÁXIMO DE WATTS</b>	
<i>Sin Resistencia</i>	0.4908
<i>Resistencia externa 470 <math>\Omega</math></i>	0.0005
<i>Resistencia externa 500 <math>\Omega</math></i>	0.0005
<i>Resistencia externa 510 <math>\Omega</math></i>	0.0005
<i>Resistencia externa 560 <math>\Omega</math></i>	0.0004

#### 3.3.2.4. Determinación de la densidad de la potencia

Uno de los parámetros más importantes de analizar dentro de una CCM es la densidad de potencia, ya que esta describe específicamente el desempeño de la celda de combustible microbiana. A parte de lo mencionado anteriormente, este parámetro nos ayuda a poder comparar diseños de celdas, al poder normalizar los datos de potencia proyectándolos a la superficie del ánodo (donde se dan las reacciones biológicas).

La máxima densidad de potencia que se registro es de 0.40 W/m<sup>2</sup> del sistema bioelectroquímico, como se puede observar en la Tabla 13.

Nuestra investigación en particular no se puede comparar mucho con otras investigaciones ya que en la mayoría de estas usan un solo tipo de cepas, mientras que nosotros queríamos demostrar que se puede utilizar el empleo de un consorcio microbiano (ya acostumbrados entre ellos) para generar electricidad.

Pero aun así tenemos bases diferentes, como es la de Li-Chun Wu que usando *Enterococcus Faecium* tuvo un rendimiento de  $0.1213 \text{ W/m}^2$  (73).

Tabla 16. Resultados Máximos de  $\text{W/m}^2$  generados en cada ánodo de la CCM's.

<b>PICO MÁXIMO DE <math>\text{W/m}^2</math></b>	
<i>Sin Resistencia</i>	392.6187
<i>Resistencia externa 470 <math>\Omega</math></i>	0.3628
<i>Resistencia externa 500 <math>\Omega</math></i>	0.3742
<i>Resistencia externa 510 <math>\Omega</math></i>	0.4010
<i>Resistencia externa 560 <math>\Omega</math></i>	0.2881

En las gráficas se puede observar que entre las diferentes celdas de combustible microbianas, sigue existiendo una diferencia entre ellas (aunque es mínima). La celda sin resistencia externa resalta sobre las demás (de la misma forma que en las gráficas anteriores) mostrando que hay esa varianza notable entre el empleo o no de las resistencias externas.

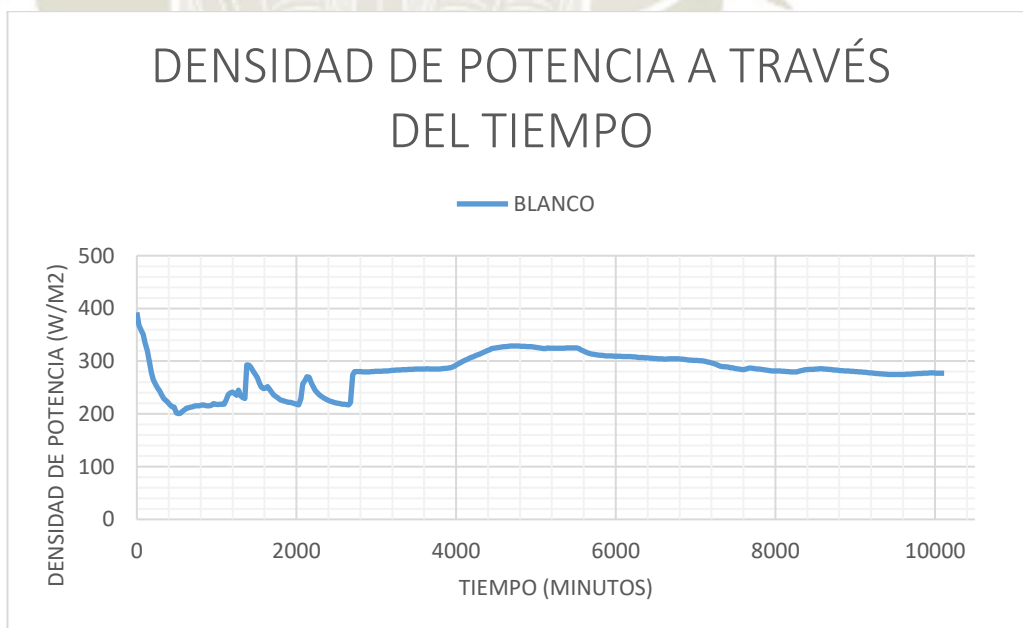


Figura 35. Resultados de la determinación de la densidad de potencia sin el uso de una resistencia externa.

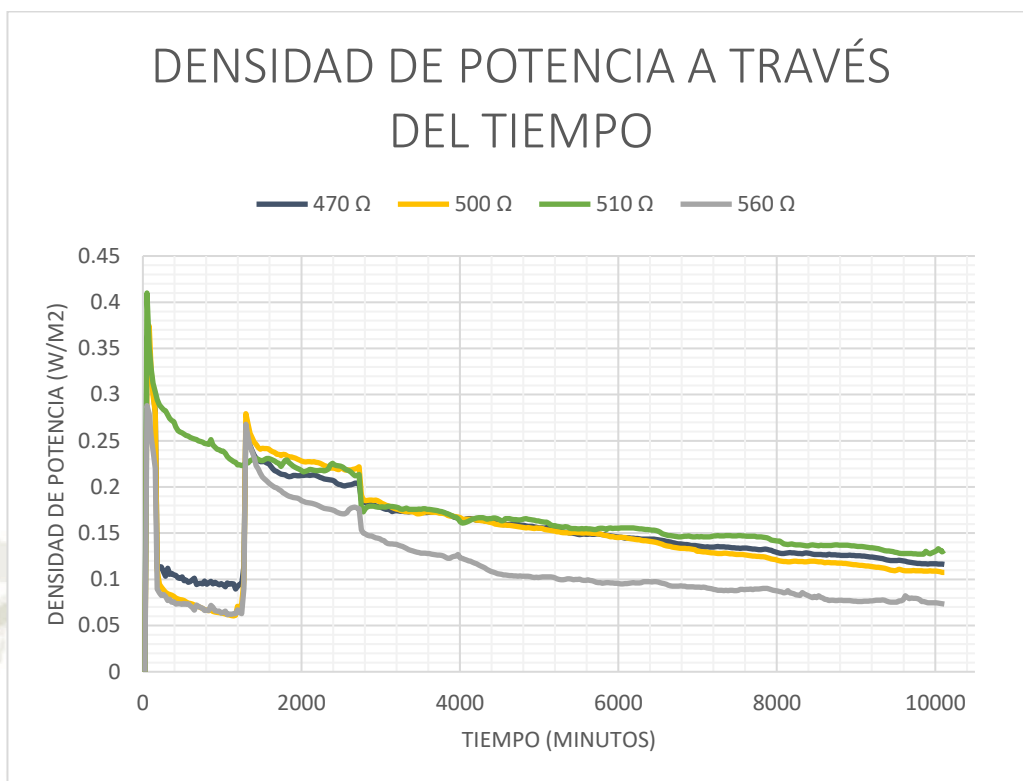


Figura 36. Resultados de la determinación de la densidad de potencia con el uso de las diferentes resistencias.

### 3.3.2.5. Determinación de la densidad de corriente

La densidad de corriente nos señala la corriente producida por m<sup>2</sup> de electrodo. como se puede comprobar en la Tabla 14. se observa un pico promedio máximo de casi 0.80 amperios/m<sup>2</sup> mostrando después una disminución progresiva (en todas las celdas) conforme el paso de los minutos de ejecución. Comparando esto, Sun en el 2015, haciendo empleo de la cepa *Geobacter Sulfurreducens* obtuvo una densidad de corriente máxima de 690±30 mA/m<sup>2</sup>, dándole a la bacteria acetato como sustrato (52).

Otro caso resaltante fue el glicerol como sustrato para la producción de biodiesel en una CCM, llegando a generar electricidad usando un consorcio mixto (11.7 mW/m<sup>2</sup>) y *E. Coli* (9.8 mW/m<sup>2</sup>) (74). Como todas las investigaciones antes descritas se pueden encontrar diversos estudios sobre la capacidad electrogénica de diversos microorganismos.

Tabla 17. Resultados Máximos de los  $A/m^2$  generados en cada ánodo de la CCM's.

<b>PICO MÁXIMO DE <math>A/m^2</math></b>	
<i>Sin Resistencia</i>	457.5988
<i>Resistencia externa 470 <math>\Omega</math></i>	0.7859
<i>Resistencia externa 500 <math>\Omega</math></i>	0.7737
<i>Resistencia externa 510 <math>\Omega</math></i>	0.8020
<i>Resistencia externa 560 <math>\Omega</math></i>	0.6415

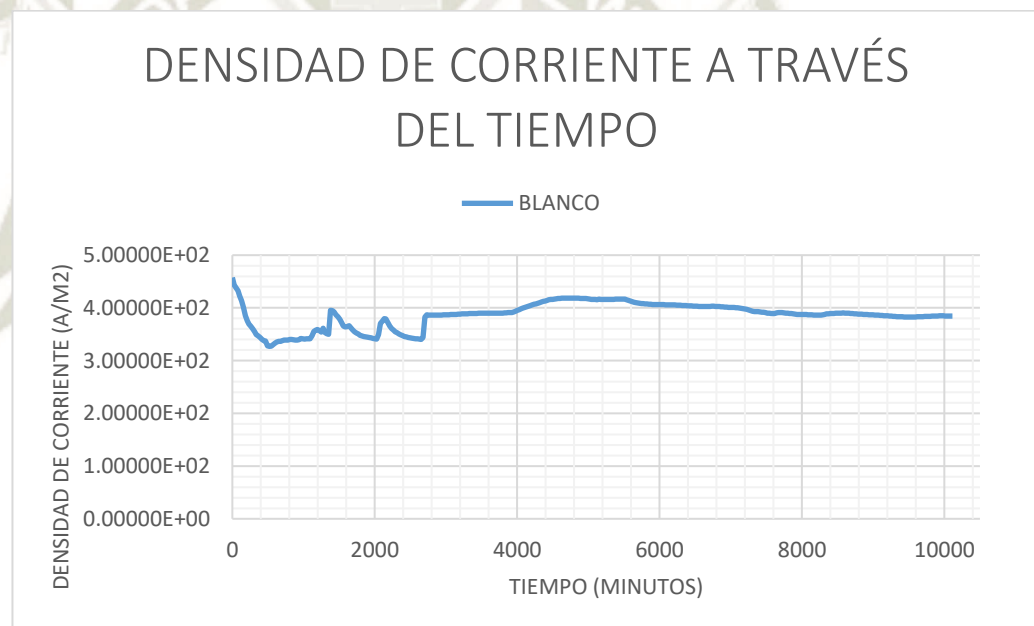


Figura 37. Resultados de la determinación de la densidad de corriente sin el uso de una resistencia externa.

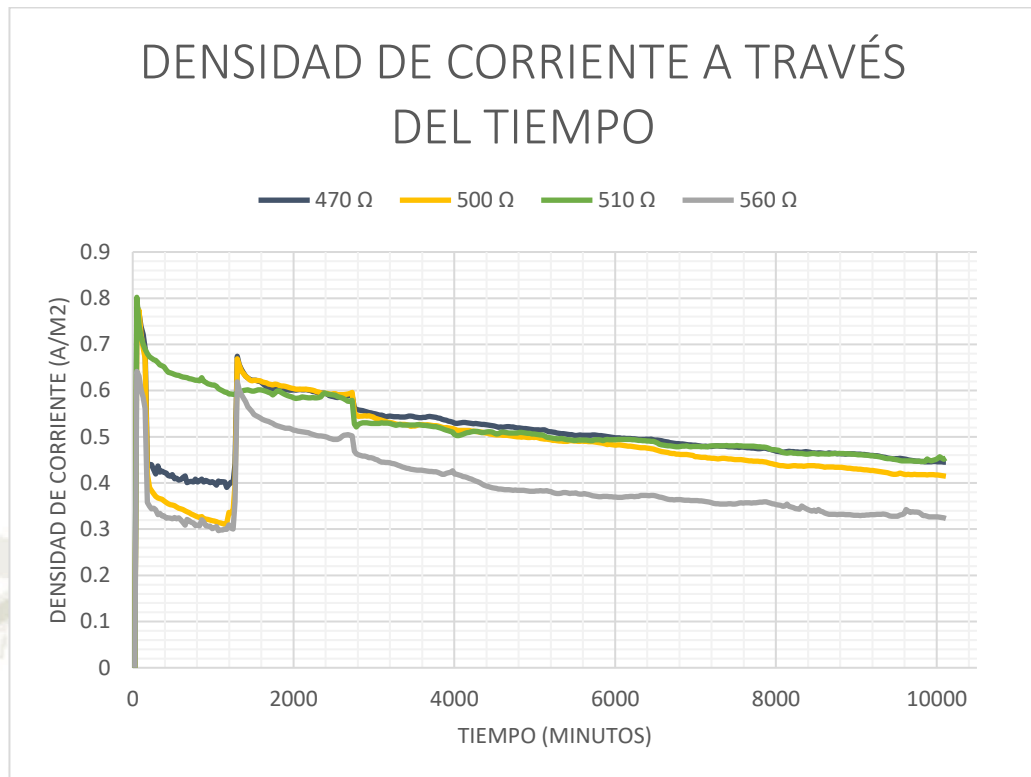


Figura 38. Resultados de la determinación de la densidad de corriente con el uso de las diferentes resistencias.

#### 3.3.2.6. Determinación de la energía total producida

Este parámetro lo que nos permite observar es los Joule de energía que se han producido en la celda, este resultado nos indica la máxima cantidad de energía total producida por la celda de combustible microbiana. En nuestra Tabla 15. se ve toda la energía producida por celda de combustible microbiana junto con su respectiva resistencia; se observa claramente que la diferencia entre celda y celda llega a ser mucho más notoria ahora, ya que este parámetro es analizado con el tiempo en segundos.

Tabla 18. Energía total producida generada en cada CCM's.

<b>ENERGÍA TOTAL PRODUCIDA</b>	
<i>Sin Resistencia</i>	1609304.995
<i>Resistencia externa 470 <math>\Omega</math></i>	1487.222064
<i>Resistencia externa 500 <math>\Omega</math></i>	1533.72831
<i>Resistencia externa 510 <math>\Omega</math></i>	1694.37794
<i>Resistencia externa 560 <math>\Omega</math></i>	1180.816272

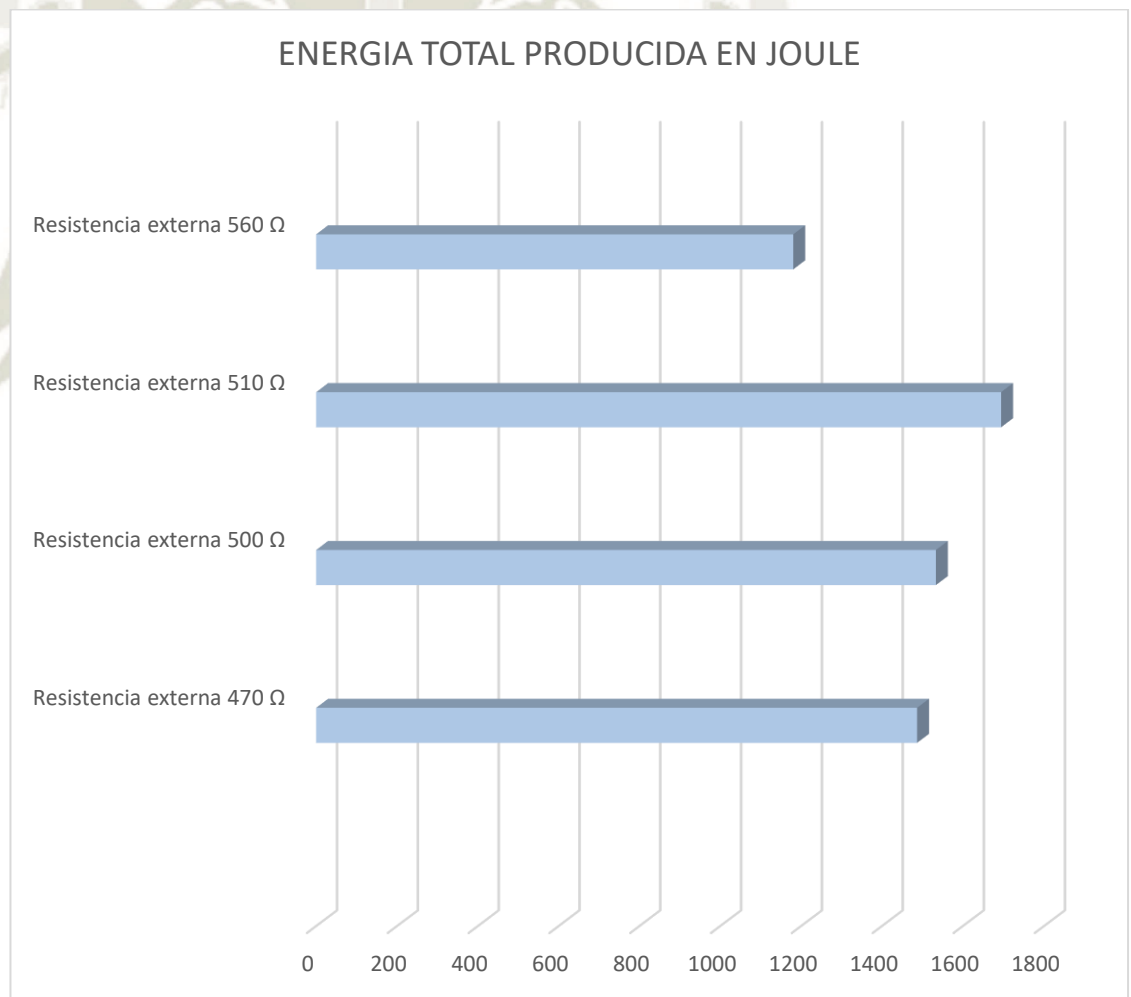


Figura 39. Resultados de la determinación de energía total producida (J).

**3.3.3. Comparación de las características fisicoquímicas del relave minero antes y después de ser empleado en una celda de combustible microbiana.**

Después de ser ejecutada las celdas de combustible microbianas, se volvió a analizar la concentración de estos metales, para poder identificar si alguno de ellos había incrementado o disminuido durante el uso de la CCM, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 19. Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM.

<b>ANÁLISIS</b>	<b>RESULTADO ANTES DE LA CCM</b>	<b>RESULTADO DESPUÉS DE LA CCM</b>	<b>LMP PARA LA DESCARGA DE EFLUENTES LIQUIDOS DE ACTIVIDADES MINERAS</b>
<i>Plata (Ag)</i>	0.038	0.012	0.002 mg/L
<i>Cobre (Cu)</i>	5.285	9.772	0.05 mg/L
<i>Plomo (Pb)</i>	10.360	5.276	0.2 mg/L
<i>Zinc (Zn)</i>	8.173	3.896	1.5 mg/L

Como se puede observar en el caso de la Plata (Ag), Plomo (Pb) y Zinc (Zn); que son metales pesados, bajaron drásticamente las concentraciones en el relave minero, pudiéndose decir que el consorcio de bacterias presente utilizó en mayor cantidad los metales como sustrato para su crecimiento y desempeño microbiano dentro de la celda de combustible microbiana.

En el caso del incremento notorio de Cobre (Cu), se puede deber a un error experimental, donde por más que los cables de electrodos (conectaban el electrodo con los caimanes para las resistencias) que se encontraban fijados y cubiertos con la goma aislante en todo el alrededor, puede que esta goma se haya movido, dejando libre fibras de cobre de los cables, liberando con el tiempo cobre al medio (en este caso nuestro lodo activo).

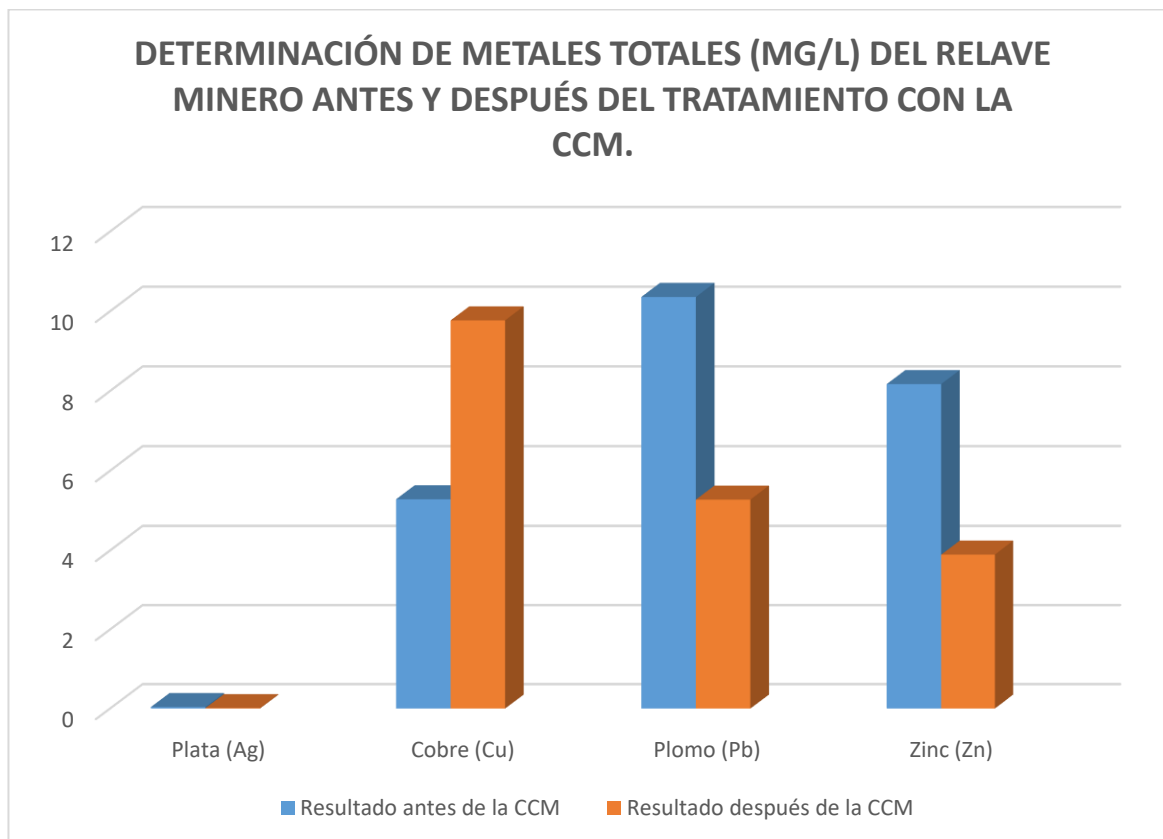


Figura 40. Gráfico de la Determinación de Metales Totales (mg/L) del relave minero antes y después del tratamiento con la CCM.

Pero también es un resultado que nos muestra que a pesar de esta liberación de cobre al medio, el consorcio bacterias presente pudo tolerar y soportar lo suficiente para sobrevivir y crecer en el medio, generando con el tiempo voltaje (por más mínimo que sea).

### 3.3.4. *Análisis de resultados*

Todos los datos obtenidos fueron registrados en el programa de Excel, y para las pruebas de comparación se utilizó el mismo Excel, realizando un ANOVA y una prueba de TUKEY (67). Tanto el ANOVA como el TUKEY se realizaron para determinar si existe una diferencia estadística significativa en el promedio de voltaje entre los 5 grupos, y para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado.

Sabiendo la diferencia entre el método ANOVA y la prueba de TUKEY se obtuvieron los siguientes resultados (Anexo 5):

- ANOVA
  - Valor prueba F: 20143.1
  - Valor P: 0.00
  - ¿Existe diferencia estadísticamente significativa en el promedio de voltaje entre los 5 grupos? SI
  - En al menos un grupo el promedio de voltaje es distinto, con 95% de confiabilidad
- PRUEBA DE TUKEY

Tabla 20. Prueba de Tukey empleada a las diferentes CCM con sus resistencias respectivas.

	<b>BLN</b>	<b>470 Ω</b>	<b>500 Ω</b>	<b>510 Ω</b>	<b>560 Ω</b>
<i>BLN</i>		0.543523562	0.550495247	0.517534746	0.586319713
<i>470 Ω</i>	-0.543523562		0.006971685	-0.025988816	0.042796151
<i>500 Ω</i>	-0.550495247	-0.006971685		-0.032960501	0.035824466
<i>510 Ω</i>	-0.517534746	0.025988816	0.032960501		0.068784967
<i>560 Ω</i>	-0.586319713	-0.042796151	-0.035824466	-0.068784967	

Con estas pruebas estadísticas se demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre cada CCM con las diferentes resistencias.

## CONCLUSIONES

Primero: Se logró identificar el consorcio microbiano proveniente de un relave minero y se comprobó que este mismo consorcio utilizaba como sustrato metales y nutrientes del lodo activado para generar electricidad en una CCM.

Segundo: Se caracterizó fisicoquímicamente el relave minero usado como muestra, determinando así un pH de 7.5 aproximadamente y las concentraciones de los metales que extraía la minera de donde se tomó la muestra, obteniendo así, la Plata (0.038 mg/L), el Cobre (5.285 mg/L), el Plomo (10.360 mg/L) y el Zinc (8.173 mg/L). Todo esto para poder comprobar una vez ejecutada la celda si se lograba disminuir la concentración; indicando así que los microorganismos presentes los utilizaban como sustrato.

Tercero: Se logró a aislar los microorganismos pertenecientes al consorcio microbiano del relave minero, resultando la primera disolución con Tween 80 al 1% el mejor tratamiento, se logró identificar a: *Serratia*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*. Esto se determinó por medio de la extracción del ADN y la obtención de la secuencia del gen ribosomal 16S a que familia pertenecían y de que especie se trataba. Esto nos sirve a un futuro para poder hacer pruebas específicas en cada especie y ver si pueden llegar a trabajar en una celda de combustible microbiana y generar electricidad por su cuenta.

Cuarto: Se diseñó una CCM de tipo H, presentando dos cámaras de similitud física, con un puente donde se adhería la Membrana de Naftion 117, y el empleo esencial de electrodos de grafito de alta densidad, donde la generación de electricidad se dio por una reacción de óxido-reducción. Cada una de estas celdas poseen una capacidad de 500 mL de sustrato (en nuestro caso lodo activo). El sustrato empleado fue el mismo relave minero, de donde se obtuvo el aislamiento e identificación de cada microorganismo presente en el consorcio microbiano, además de su trabajo extra a la hora de eliminación de metales.

Quinto: Se comparó el efecto de la resistencia externa dentro de las celdas de combustible microbianas, demostrando así en la investigación que tiene un gran impacto dentro de ella; ya analizando los resultados obtenidos y el análisis mediante el ANOVA y la prueba de TUKEY, se pudo observar que si hay una diferencia estadísticamente significativa entre cada una de las celdas manejadas con las diferentes resistencias.

Sexto: Se comprobó que el consorcio microbiano dentro del relave minero, utilizaba los metales presentes como sustrato para poder utilizarlo dentro de las celdas de combustible microbianas y poder generar energía, como se pudo ver en el caso de la Plata (de 0.038 mg/L a 0.012 mg/L), Zinc (de 8.173 mg/L a 3.896 mg/L) y Plomo (de 10.360 mg/L a 5.276 mg/L) donde la concentración se disminuyó a menos de la mitad de mg/L. El consorcio microbiano logro la generación de electricidad con picos de hasta 0.5 voltios, además de poder ver también que estas mismas bacterias pueden llegar a emplearse como tratamiento de limpieza de metales y como efecto secundario la generación de electricidad.

## RECOMENDACIONES

Primero: Probar las condiciones óptimas de temperatura y pH para mejorar el crecimiento y desempeño de las mismas dentro de las celdas de combustible microbianas.

Segundo: Evaluar y comparar el desempeño de las celdas de combustible microbianas empleando electrodos de mayor tamaño, área y material, para tener un mayor rendimiento eléctrico.

Tercero: Analizar y emplear diferentes métodos de aislamiento con el fin de encontrar nuevas bacterias dentro de estos lodos activos, y comprobar si pueden ser microorganismos electrogénicos.

Cuatro: Implementar un prototipo a mayor escala de la celda de combustible microbiana propuesta en esta investigación, para así poder generar mayor energía eléctrica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Luzzi A, Bonadio , McCann M. Reasearch Towards the Realisation of Hydrogen Energy Systems. *Nature*. 2004; 414(353).
2. Zhuwei D, Li H, Gu T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*. 2007; 25(5): p. 464-482.
3. Morales J, Oshiro J, Mas J, Porles F. Balance Nacional de Energía. Estadístico. Lima: Ministerio de Energia y Minas (MEM), Lima.
4. Álvarez C. Bacterias que generan electricidad. *El País*. : p. 41-42.
5. Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*. 2005; 23(6): p. 291-298.
6. Franks AE, Nevin KP. Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*. 2010; 3: p. 899-919.
7. Al-Gwaiz M, Chao X, Wu OQ. Understanding How Generation Flexibility and Renewable Energy Affect Power Market Competition. *Manufacturing and Service Operations Management*. 2016; 19(1): p. 114-131.
8. Mansoorian H, Mahvi AH, Jafari AJ, Khanjani N. Evaluation of dairy industry wastewater treatment and simultaneous bioelectricity generation in a catalyst-less and mediator-less membrane microbial fuel cell. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2016; 20(1): p. 88-100.
9. Dirección General de E. Evolución de Indicadores del Sector Eléctrico 1995-2015. Estadístico. Lima: Ministerio de Energia y Minas MEM, Lima.
- 10 Fondo Nacional del A. Promoción de la participación pública y privada en proyectos de . Energía Renovable y Fortalecimiento de la capacidad de FONAM. FNA, FNA.

- 11 Astete J, Cáceres W, Gastañaga MdC, Lucero M, Sabastizagal I, Oblitas T, et al. Intoxicación . por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. Scielo. 2009; 26(1): p. 15-19.
- 12 Cruzado E, Bravo F. Impacto de los relaves mineros en el Perú. Temático. Lima: . Departamento de Investigación y Documentación Parlamentaria (DIDP), Lima.021.
- 13 Pinillos JA. Universidad Nacional Federico Villarreal. Tecnologías Ecologicamente racional. . Manejo de las aguas en los depósitos de relaves mineros. [Online].; 2015. Acceso 20 de Junio de 2019. Disponible en: [http://www.ana.gob.pe/media/1072911/manejo\\_aguas\\_depositos\\_relaves\\_mineros.pdf](http://www.ana.gob.pe/media/1072911/manejo_aguas_depositos_relaves_mineros.pdf).
- 14 Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. Nature Reviews . Microbiology. 2009; 7(5): p. 375-81.
- 15 Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, Verhaege M, Verstraete W. Biofuel Cells Select for . Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70(9): p. 5373-5382.
- 16 Tamakloe RY, Agamasu H, Singh K. Power Generation by double chamber membrane-less . Microbial Fuel Cells (MLMFCs). International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET). 2014; 5(7): p. 30-38.
- 17 Logan BE. Microbial Fuel Cells. Primera ed. Canadá: Wiley; 2008.
- 18 Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, et al. Electrically . conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). 2006; 103(30): p. 11358-11363.
- 19 Bellaev AS, Saffarini DA, McLaughlin JL, Hunnicutt D. MtrC, an outer membrane decahaem . c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. Molecular Microbiology. 2001; 39(3): p. 722-730.

- 20 Champine JE, Underhill B, Johnston JM, Lilly WW, Goodwin S. Electron Transfer in the . Dissimilatory Iron-reducing Bacterium *Geobacter metallireducens*. *Anaerobe*. 2000; 6(3): p. 187-196.
- 21 Mastwijk HC, Timmermans RAH, Van Boekel MAJS. The Gauss-Eyring model: A new . thermodynamic model for biochemical and microbial inactivation kinetics. *Food Chemistry*. 2017; 237: p. 331-341.
- 22 Hermosa A. Principios de Electricidad y Electrónica I. Tercera ed. España: Marcombo; 2009.
- 23 Boylestad RL. Introducción al análisis de circuitos. Décima ed. México: Pearson Educación; . 2004.
- 24 Alexander CK, Sadiku MNO. Fundamentos de circuitos eléctricos. Tercera ed. México: . McGraw-Hill; 2006.
- 25 Sleutels THJA, Hamelers HVM, Rozendal RA, Buisman CJN. Ion transport resistance in . Microbial Electrolysis Cells with anion and cation exchange membranes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009; 34(9): p. 3612-3620.
- 26 Pant D, Van Bogaert G, Diels L, Vanbroekhoven K. A review of the substrates used in . microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*. 2010; 101(6): p. 1533-1543.
- 27 Schröder U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy . efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007; 9(21): p. 2619-2629.
- 28 Passos VF, Aquino Neto S, Rodrigues de Andrade A, Reginatto V. Energy generation in a . Microbial Fuel Cell using anaerobic sludge from a wastewater treatment plant. *Scientia Agricola*. 2016; 73(5): p. 424-428.
- 29 Fan Lp, Xue S. Overview on Electricigens for Microbial Fuel Cell. *The Open Biotechnology . Journal*. 2016; 10: p. 398-406.

- 30 Zhuwei D, Qinghai L, Meng T, Shaohua L, Haoran L. Electricity Generation Using . Membrane-less Microbial Fuel Cell during Wastewater Treatment. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2008; 16(5): p. 772-777.
- 31 Scott K, Hao Yu E. Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and . Applications. Primera ed. Cambridge: Elsevier; 2016.
- 32 Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguía S, et al. Microbial Fuel . Cells: Methodology and Technology. Environmental Science and Technology. 2006; 40(17): p. 5181-5192.
- 33 Min B, Cheng S, Logan BE. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial . fuel cells. Water Research. 2005; 39(9): p. 1675-1686.
- 34 Scott K, Cotlarciuc I, Hall D, Lakeman JB, Browning DD. Power from marine sediment fuel . cells: the influence of anode material. Journal of Applied Electrochemistry. 2008; 38: p. 1313-1319.
- 35 Wrana N, Sparling R, Cicek N, Levin DB. Hydrogen gas production in a microbial . electrolysis cell by electrohydrogenesis. Journal of Cleaner Production. 2010; 18(1): p. 105-111.
- 36 Rismani-Yazdi H, Christy AD, Carver SM, Yu Z, Dehority BA, Tuovinen OH. Effect of . external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. Bioresource Technology. 2011; 102(1): p. 278-283.
- 37 Borole AP, Hamilton CY, Vishnivetskaya T, Leak D, Andras C. Improving power production . in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems. Biochemical Engineering Journal. 2009; 48(1): p. 71-80.
- 38 Wang CT, Chen WJ, Huang RY. Influence of growth curve phase on electricity performance . of microbial fuel cell by Escherichia coli. International Journal of Hydrogen Energy. 2010; 35(13): p. 7217-7223.

- 39 Luo Y, Zhang R, Liu G, Li J, Li M, Zhang C. Electricity generation from indole and microbial . community analysis in the microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 176(1-3): p. 759-764.
- 40 Gugliuzza A, Basile A. *Membranes for clean and renewable power applications* Philadelphia: . Woodhead Publishing; 2014.
- 41 Logan BE, Call D, Cheng S, Hamelers HVM, Sleutels THJA, Jeremiassen AW, et al. Microbial . Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter. *Environmental Science and Technology*. 2008; 42(23): p. 8630-8640.
- 42 Harnisch F, Uwe S. Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in . Microbial Bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem*. 2009; 2(10): p. 921-6.
- 43 Revankar ST, Majumdar P. *Fuel Cells: Principles, Design, and Analysis*. Primera ed. Boca . Raton: CRC Press; 2014.
- 44 Zhang X. Preparation and characterization of proton exchange membranes for direct methanol . fuel cells. Ph.D. Thesis. Engineering DoC, editor. España: Universitat Rovira i Virgili (URV); 2005.
- 45 Wei J, Liang P, Huang X. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource . Technology*. 2011; 102(20): p. 9335-9344.
- 46 Heijne At, Hamelers HVM, de Wilde V, Rozendal RA, Buisman CJN. A Bipolar Membrane . Combined with Ferric Iron Reduction as an Efficient Cathode System in Microbial Fuel Cells. *Environmental Science and Technology*. 2006; 40(17): p. 5200-5205.
- 47 Qian F, Baum M, Gu Q, Morse DE. A 1.5  $\mu$ L microbial fuel cell for on-chip bioelectricity . generation. *Lab on a Chip*. 2009; 9(21): p. 3076-3081.
- 48 Choi S, Chae J. Optimal biofilm formation and power generation in a micro-sized microbial . fuel cell (MFC). *Sensors and Actuators A: Physical*. 2013; 195: p. 206-212.

- 49 Logan BE, Regan JM. Microbial challenges and fuel cell applications. *Environmental Science and Technology*. 2006; 40(17): p. 5172-5180.
- 50 Falcón A, Lozano JE, Juárez K. Bioelectricidad. *BioTecnología*. 2009; 13(3): p. 62-78.
- 51 Tardast A, Najafpour G, Rahimnejad M, Amiri A. Bioelectrical Power Generation in a Membrane less Microbial Fuel Cell. *World Applied Sciences Journal*. 2012; 16(2): p. 179-182.
- 52 Sun G, Rodrigues DdS, Thygesen A, Daniel G, Fernando D, Meyer AS. Inocula selection in microbial fuel cells based on anodic biofilm abundance of *Geobacter sulfurreducens*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2016; 24(3): p. 379-387.
- 53 Zhu G, Onodera T, Tandukar M, Pavlostathis SG. Simultaneous carbon removal, denitrification and power generation in a membrane-less microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2013; 146: p. 1-6.
- 54 You S, Zhao Q, Zhang J, Jiang J, Zhao S. A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor. *Journal of Power Sources*. 2006; 162(2): p. 1409-1415.
- 55 Biffinger JC, Byrd JN, Dudley BL, Ringeisen BR. Oxygen exposure promotes fuel diversity for *Shewanella oneidensis* microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008; 23(6): p. 820-826.
- 56 Namjoon Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000; 70(1): p. 109-114.
- 57 Liu Z, Su Z, Liu J, Zhang S. Study of operational performance and electrical response on mediator-less microbial fuel cells fed with carbon- and protein-rich substrates. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 45(3): p. 185-191.

- 58 Sharma Y, Li B. Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic . hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC). *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010; 35(8): p. 3789-3797.
- 59 Rabaey K, Lissens G, Siciliano SD, Willy V. A microbial fuel cell capable of converting . glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology Letters*. 2003; 25(18): p. 1531-1535.
- 60 Min B, Logan BE. Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic . Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environmental Science and Technology*. 2004; 38(21): p. 5809-5814.
- 61 Aldovandi A, Marsili E, Stante L, Paganin P, Tabacchioni S, Giordano A. Sustainable power . production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2009; 100(13): p. 3252-3260.
- 62 Bazzicalupo M, Fancelli S. DNA Extraction from Bacterial Cultures. In: Micheli M.R., Bova . R. (eds) *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*. Springer Lab Manuals. Berlin, Heidelberg: Springer; 1997.
- 63 Reysenbach AL, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink . filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60(6): p. 2113-2119.
- 64 Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a Prokaryotic . Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *Plos One*. 2014; 9(8).
- 65 Pujiastuti S, Onggo H. Effect of various concentration of sulfuric acid for Nafion membrane . activation on the performance of fuel cell. *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1711(1): p. 060006.
- 66 Kim JR, Min B, Logan BE. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for . electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005; 68(1): p. 23-30.

- 67 Bergoña Bermejo F. Análisis de los datos en un proyecto de investigación. *Matronas . profesión*. 2005; 6(3): p. 30-36.
- 68 NEXA Resources Perú S.A.A. Memoria Anual 2017 Compañía Minera Milpo S.A.A. . [Online]. Lima; 2018. Acceso 19 de 06 de 2019. Disponible en: <https://www.bvl.com.pe/hhii/B20010/20180222163001/MEMORIA32ANUAL32NEXA32PER21832VF.PDF>.
- 69 Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA. Database . indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*. 2008; 24(16): p. 1757-1764.
- 70 Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA . Sequences. *Journal of Computational Biology*. 2000; 7(1/2): p. 203-214.
- 71 Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, et al. A new bioinformatics . analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acid Research*. 2010; 38(Web Server Issue): p. W695–W699.
- 72 El-Nagar GA, Hassan MA, Fetyan A, Kayarkatte MK, Lauermann I, Roth C. A promising N- . doped carbon-metal oxide hybrid electrocatalyst derived from crustacean’s shells: Oxygen reduction and oxygen evolution. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2017; 214(C): p. 137-147.
- 73 Chun Wu L, Kuang Huang C, Wang H, Chien Chung Y. High Bioelectricity Generation by . Microbial Fuel Cells (MFCs) Inoculated *Enterococcus faecium* YC 201. *Advanced Materials Research*. 2013; 838-841: p. 2461-2465.
- 74 Reiche A, Kirkwood KM. Comparison of *Escherichia coli* and anaerobic consortia derived . from compost as anodic biocatalysts in a glycerol-oxidizing microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2012; 123: p. 318-323.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Tabla 21. Materiales que pueden ser empleados en cada componente de una celda de combustible microbiana (2).

Items	Materials	Remarks
Anode	Graphite, graphite felt, carbon paper, carbon-cloth, Pt, Pt black, reticulated vitreous carbon (RVC)	Necessary
Cathode	Graphite, graphite felt, carbon paper, carbon-cloth, Pt, Pt black, RVC	Necessary
Anodic chamber	Glass, polycarbonate, Plexiglas	Necessary
Cathodic chamber	Glass, polycarbonate, Plexiglas	Optional
Proton exchange system	Proton exchange membrane: Nafion, Ultrex, polyethylene.poly (styrene-co-divinylbenzene); salt bridge, porcelain septum, or solely electrolyte	Necessary
Electrode catalyst	Pt, Pt black, MnO <sub>2</sub> , Fe <sup>3+</sup> , polyaniline, electron mediator immobilized on anode	Optional



ANEXO 2

Microbes	Substrate	Applications
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Glucose	Neutral red or thionin as electron mediator (Park and Zeikus, 2000; Park and Zeikus, 1999; Park et al., 1999)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Acetate	Mediator-less MFC Pham et al. (2003)
<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose	Self-mediate consortia isolated from MFC with a maximal level of $4.31 \text{ W m}^{-2}$ . Rabaey (2004)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Starch, glucose, lactate, molasses	Fermentative bacterium Niessen et al. (2004b)
<i>Clostridium butyricum</i>	Starch, glucose, lactate, molasses	Fermentative bacterium (Niessen et al., 2004b; Park et al., 2001)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sucrose	Sulphate/sulphide as mediator (Ieropoulos et al., 2005a; Park et al., 1997)
<i>Erwinia dissolven</i>	Glucose	Ferric chelate complex as mediators Vega and Fernandez, (1987)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose sucrose	Mediators such as methylene blue needed. (Schroder et al., 2003; Ieropoulos et al., 2005a; Grzebyk and Pozniak, 2005)
<i>Geobacter metallireducens</i>	Acetate	Mediator-less MFC Min et al. (2005a)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetate	Mediator-less MFC (Bond and Lovley, 2003; Bond et al., 2002)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Glucose	Mediator (HNQ, resazurin or thionine) needed Lee et al. (2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glucose	HNQ as mediator biomineralized manganese as electron acceptor (Rhoads et al., 2005; Menicucci et al., 2006)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glucose	Ferric chelate complex as mediators (Vega and Fernandez, 1987)
<i>Proteus mirabilis</i>	Glucose	Thionin as mediator (Choi et al., 2003; Thurston et al., 1985)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose	Pyocyanin and phenazine-1-carboxamide as mediator (Rabaey et al., 2004, 2005a)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Glucose, xylose sucrose, maltose	Mediator-less MFC (Chaudhuri and Lovley, 2003; Liu et al., 2006)
<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate	Anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) as mediator (Ringeisen et al., 2006)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Lactate, pyruvate, acetate, glucose	Mediator-less MFC (Kim et al., 1999a,b); but incorporating an electron mediator like Mn (IV) or NR into the anode enhanced the electricity production (Park and Zeikus, 2002)
<i>Streptococcus lactis</i>	Glucose	Ferric chelate complex as mediators (Vega and Fernandez, 1987)

Tabla 22. Microorganismos y sustratos utilizados en una MFC's (2).

**ANEXO 3**

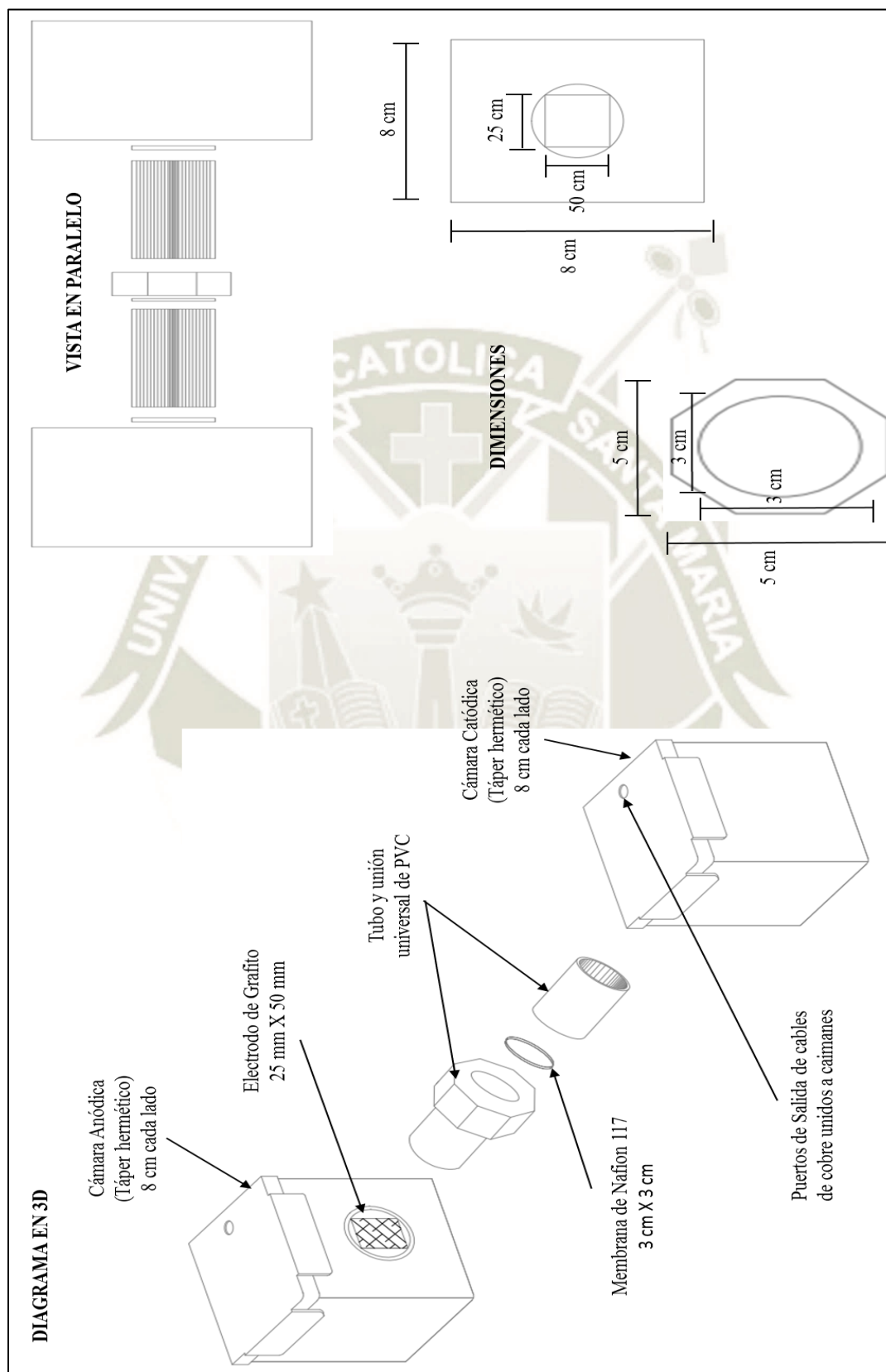


Figura 41. Diseño en programa Autocad previo al ensamble de la CCM.

ANEXO 4

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD  
Urb. San José S/N Umecollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204209 • 51 54 302208 ANEXO 1186  
laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe • http://www.ucsm.edu.pe • Apto. 1350  
AREQUIPA - PERU

INFORME DE ENSAYO  
N° DE INFORME: ANA16D19.003925A

Nombre del Cliente : Rina Rodríguez Rendón  
Dirección del Cliente : Urb Tahuaycani E22  
RUC : No corresponde  
Condición del Muestreado : Por el cliente  
Descripción : Relave minero T1-REL-004 pre tratamiento  
Tamaño de muestra : 100 mL  
Fecha de Recepción : 16/04/2019  
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019  
Fecha de Emisión de Informe : 25/04/2019  
Página : 1 de 2

I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:

DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)  
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7

ANALISIS	RESULTADO
Plata (Ag)	0,038
Aluminio (Al)	86,070
Arsénico (As)	4,101
Boro (B)	0,195
Bario (Ba)	0,544
Berilio (Be)	0,000
Calcio (Ca)	29,150
Cadmio (Cd)	0,000
Cobalto (Co)	1,530
Cromo (Cr)	1,210
Cobre (Cu)	5,285
Hierro (Fe)	54,154
Potasio (K)	50,290
Litio (Li)	0,087
Magnesio (Mg)	6,782
Manganeso (Mn)	3,134
Molibdeno (Mo)	0,000
Sodio (Na)	32,300
Níquel (Ni)	0,058
Fósforo (P)	1,677
Plomo (Pb)	10,360
Antimonio (Sb)	0,000



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD  
Urb. San José S/N Umecollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204209 • 51 54 302208 ANEXO 1186  
laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe • http://www.ucsm.edu.pe • Apto. 1350  
AREQUIPA - PERU

INFORME DE ENSAYO  
N° DE INFORME: ANA16D19.003925A

Nombre del Cliente : Rina Rodríguez Rendón  
Dirección del Cliente : Urb Tahuaycani E22  
RUC : No corresponde  
Condición del Muestreado : Por el cliente  
Descripción : Relave minero T1-REL-004 pre tratamiento  
Tamaño de muestra : 100 mL  
Fecha de Recepción : 16/04/2019  
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019  
Fecha de Emisión de Informe : 25/04/2019  
Página : 2 de 2

Selenio (Se)	0,000
Silicio (Si)	60,457
Estaño (Sn)	0,000
Estroncio (Sr)	0,000
Titanio (Ti)	2,709
Talio (Tl)	0,000
Vanadio (V)	0,000
Zinc (Zn)	8,173

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

O.F. Ricardo A. Abri Ramirez  
COPIA 0024  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Figura 42. Resultados de la determinación de metales totales (mg/L) para la muestra de relave minero antes pre-tratado. Laboratorio de Control de Calidad de la UCSM.

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Unasanta CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 ☎ +51 54 382038 ANEXO 1100  
E laboratorioensayo@ucsm.edu.pe | http://www.ucsm.edu.pe | Agosto 1300  
AREQUIPA - PERU

INFORME DE ENSAYO  
N° DE INFORME: ANA16D19.003925B

Nombre del Cliente : Rina Rodríguez Rendón  
Dirección del Cliente : Urb Tahuaycani E22  
RUC : No corresponde  
Condición del Muestreado : Por el cliente  
Descripción : Relave minero T1-REL-004 post tratamiento  
Tamaño de muestra : 100 mL  
Fecha de Recepción : 16/04/2019  
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019  
Fecha de Emisión de Informe : 25/04/2019  
Página : 1 de 2

I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:

DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)  
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7

ANALISIS	RESULTADO
Plata (Ag)	0,012
Aluminio (Al)	63,450
Arsénico (As)	2,336
Boro (B)	0,777
Bario (Ba)	0,391
Berilio (Be)	0,000
Calcio (Ca)	20,110
Cadmio (Cd)	0,000
Cobalto (Co)	0,051
Cromo (Cr)	0,053
Cobre (Cu)	9,772
Hierro (Fe)	23,600
Potasio (K)	58,030
Litio (Li)	0,063
Magnesio (Mg)	5,536
Manganeso (Mn)	1,728
Molibdeno (Mo)	0,000
Sodio (Na)	72,810
Niquel (Ni)	0,029
Fosforo (P)	3,233
Plomo (Pb)	5,276
Antimonio (Sb)	0,000



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Unasanta CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 ☎ +51 54 382038 ANEXO 1100  
E laboratorioensayo@ucsm.edu.pe | http://www.ucsm.edu.pe | Agosto 1300  
AREQUIPA - PERU

INFORME DE ENSAYO  
N° DE INFORME: ANA16D19.003925B

Nombre del Cliente : Rina Rodríguez Rendón  
Dirección del Cliente : Urb Tahuaycani E22  
RUC : No corresponde  
Condición del Muestreado : Por el cliente  
Descripción : Relave minero T1-REL-004 post tratamiento  
Tamaño de muestra : 100 mL  
Fecha de Recepción : 16/04/2019  
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019  
Fecha de Emisión de Informe : 25/04/2019  
Página : 2 de 2

Selenio (Se)	0,000
Silicio (Si)	75,457
Estaño (Sn)	0,000
Estroncio (Sr)	2,072
Titanio (Ti)	0,000
Talio (Tl)	0,000
Vanadio (V)	3,896
Zinc (Zn)	3,896

OBSERVACIONES:  
- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA.  
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

*Ricardo*  
Q.F. Ricardo A. Abñi Ramirez  
COPDA 08024  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Figura 43. Resultados de los metales totales (mg/L) para la muestras de las celdas después de su operación. Laboratorio de Control de Calidad de la UCSM.

ANEXO 5

RESUMEN	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	2102	1512.297802	0.719456614	0.001940265	
Columna 2	2102	369.8112748	0.175933052	0.006462909	
Columna 3	2102	355.1567932	0.168961367	0.006882578	
Columna 4	2102	424.4397661	0.201921868	0.008584937	
Columna 5	2102	279.8537663	0.133136901	0.007950073	
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	512.775581	4	128.1938953	20143.12	0
Dentro de los grupos	66.85542167	10505	0.006364152		2.37277757
Total	579.6310027	10509			
HSD=	0.006715				
MULTIPLICADOR=	3.86				
MSE=	0.006364152				
N=	2103				

Figura 44. Resultados estadísticos para la determinación de la producción de energía eléctrica obtenida.